

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

Antonio Fernando da Purificação Júnior

**Desenvolvimento de Aptâmeros Neutralizantes Dirigidos à Proteína E2 do Vírus
Chikungunya**

Recife

2022

Antonio Fernando da Purificação Júnior

**Desenvolvimento de Aptâmeros Neutralizantes Dirigidos à Proteína E2 do Vírus
Chikungunya**

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

Orientador: Dr. Roberto Dias Lins Neto

Coorientadora: Dr^a. Isabelle Freire Tabosa Viana

Recife

2022

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

P985d Purificação Júnior, Antonio Fernando da.
Desenvolvimento de
aptâmeros neutralizantes dirigidos à proteína E2 do
vírus chikungunya / Antonio Fernando da
Purificação Júnior. — Recife: [s. n.], 2022.
190 p.: il.; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Aggeu Magalhães,
Programa de Pós-graduação em Biociências e
Biotecnologia em Saúde, Recife, 2022.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto.
coorientadora: Isabelle Freire Tabosa Viana.

1. Vírus Chikungunya. 2. Aptâmeros de
Peptídeos. 3. Infecções por Alphavírus. 4.
Anticorpos Neutralizantes. I. Lins Neto, Roberto
Dias. II. Viana, Isabelle Freire Tabosa. III. Título.

Antonio Fernando da Purificação Júnior

**Desenvolvimento de Aptâmeros Neutralizantes Dirigidos à Proteína E2 do Vírus
Chikungunya**

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

Aprovado em: 19 de maio de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Roberto Dias Lins Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Rafael Dhalia
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Danilo Fernandes Coêlho
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Virginia Maria Barros de Lorena
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Carlos Henrique Bezerra Cruz
Universidad Complutense de Madrid

AGRADECIMENTOS

A Roberto Lins e à Isabelle Viana, meus orientadores, por terem aceitado me conduzir no desenvolvimento deste trabalho, pela dedicação, disponibilidade e estímulo. Aos professores e a coordenação do programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães pela atenção e contribuição em minha formação profissional. À FACEPE, pela bolsa de doutorado.

A Antonio (meu Pai) e às mulheres da minha vida, Dona Maria Lúcia (minha mãe), Juliana e Joice (minhas irmãs), por todo amor dispensado e pelo apoio e incentivo a conquistar mais uma vitória na minha vida. A Renan por todo o carinho e incentivo e por ter ouvido as reclamações quase que diárias.

Aos familiares que diretamente e indiretamente me ajudaram nesta caminhada. Em especial à minha avó que a ausência física não me faz esquecer a sua importância para essa conquista e a certeza de que, se presente, estaria muito feliz, a minha admiradora, muito obrigado pelo seu amor.

A todos os mestres que fizeram parte da minha formação educacional pela paciência, carinho, compreensão e pelos ensinamentos oferecidos.

Agradeço aos meus amigos do LAVITE por se tornarem minha família em Recife e que também contribuíram para realização deste sonho. Em especial aos meus amigos Elisa, Morganna, Thaíse, Matheus e Danilo que alegraram meus dias durante esse curso, pelas conversas descontraídas que deixaram esse percurso mais leve e pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis. Ao meu amigo e irmão Jefferson, companhia e auxílio em muitos momentos difíceis desta caminhada e de outras.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

“Tente mover o mundo – o primeiro passo será mover a si mesmo”

Platão(427-347 a.C.)

RESUMO

PURIFICAÇÃO JÚNIOR, Antonio Fernando. Desenvolvimento de aptâmeros neutralizantes dirigidos à proteína E2 do vírus chikungunya. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A infecção por CHIKV provoca uma grave doença febril caracterizada por uma poliartrite debilitante, que pode persistir por anos. Atualmente, não há nenhum tratamento e vacina contra o CHIKV. A proteína de envelope E2 de CHIKV é o principal sítio de interação com receptores celulares durante a infecção de células hospedeiras. Ademais, o mapeamento de epítomos de anticorpos induzidos por CHIKV mostrou que a proteína E2 é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Neste contexto, nós hipotetizamos que o desenvolvimento de moléculas inspiradas em anticorpos neutralizantes dirigidas contra epítomos específicos do domínio B da proteína E2 podem ser capazes de ligar-se e neutralizar o CHIKV em ensaios *in vitro*. Para tal, este trabalho explorou as características estruturais de epítomos da E2Bafim de criar aptâmeros de alta afinidade. As propriedades estruturais e dinâmicas dos candidatos mais promissores foram avaliadas, e com base nas previsões teóricas foram selecionados três aptâmeros CETZDT-2, CETZDT-3 e CETZDT-7 para serem expressos em *E. coli*. Usando ensaios de termoforese em microescala, foi determinada a afinidade de ligação desses aptâmeros ao CHIKV e o CETZDT-2 foi capaz de reconhecer seu alvo antigênico com afinidade comparável a de anticorpos naturais ($K_D = 100\text{nM}$). A avaliação da manutenção das propriedades estruturais, por dicroísmo circular, mostraram que CETZDT-2 é extremamente estável, preservando seu conteúdo de estrutura secundária mesmo em altas temperaturas. Ensaio de neutralização (redução de placa e microneutralização) demonstraram que o CETZDT-2 foi capaz de neutralizar a infecção por CHIKV *in vitro*, com EC_{50} iguais à $31,44\mu\text{M}$ e $107,4\mu\text{M}$. Devido a similaridade de epítomos da E2B entre os alfavírus, resolvemos testar a capacidade de neutralização do CETZDT-2 frente ao MAYV, e verificou-se que com EC_{50} de $79,45\mu\text{M}$ a proteína apresenta potencial neutralizante *in vitro*. Diante disso, nossos resultados indicam que a proteína desenhada tem potencial aplicação como marcador de diagnóstico de infecções agudas, bem como em novas estratégias terapêuticas contra a infecção por CHIKV e MAYV.

Palavras-chave: vírus chikungunya; aptâmeros, desenho de proteínas, neutralização viral

ABSTRACT

PURIFICAÇÃO JÚNIOR, Antonio Fernando. Development of neutralizing aptamers targeting chikungunya virus E2 protein. 2022. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

CHIKV infection causes a severe febrile illness and is characterized by debilitating polyarthrititis, which can persist for years. Currently, there is no treatment or vaccine against CHIKV. The CHIKV E2 envelope protein is the main site of interaction with cellular receptors for the infection of host cells. Furthermore, epitope mapping of CHIKV-induced antibodies showed that the E2 protein is the main target of neutralizing antibodies. In this context, we hypothesized that the development of molecules inspired by neutralizing antibodies directed against specific epitopes of the B domain of the E2 protein may be able to bind and neutralize CHIKV in *in vitro* assays. To this end, this project explored the structural characteristics of epitopes in E2B protein, to create high affinity aptamers. The structural and dynamic properties of the most promising candidates were evaluated and based on the theoretical predictions, three aptamers CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 were selected to be expressed in *E. coli*. Using microscale thermophoresis assays, the binding affinity of these aptamers to CHIKV were determined and the CETZDT-2 was able to recognize their antigenic target with affinity comparable to that of natural antibodies ($K_D = 100\text{nM}$). The evaluation of the maintenance of structural properties, by circular dichroism, showed that CETZDT-2 is extremely stable, preserving its secondary structure content even at high temperatures. Neutralization assays (plaque reduction and microneutralization) demonstrated that CETZDT-2 was able to neutralize CHIKV infection *in vitro*, with an EC_{50} of $31.44\mu\text{M}$ and $107.4\mu\text{M}$. Due to the similarity of E2B epitopes between alphaviruses, we decided to test the neutralization capacity of CETZDT-2 against MAYV, and it was found that with EC_{50} of $79.45\mu\text{M}$ the protein has neutralizing potential *in vitro*. Therefore, our results indicate that the designed protein has potential application as a diagnostic marker for acute infections, as well as in new therapeutic strategies against CHIKV and MAYV infection.

Keywords: chikungunya virus; aptamers; protein design; viral neutralization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Linha do tempo dos principais surtos causados pelo CHIKV	24
Figura 2- Países com seus respectivos períodos de identificação dos primeiros casos autóctones de transmissão do CHIKV	26
Figura 3- A Organização genômica e a estrutura da partícula do CHIKV	28
Figura 6- Representação das glicoproteínas de superfície do CHIKV	34
Figura 7- Ciclo de transmissão do CHIKV	35
Figura 9- Resumo das formas de transmissão e amplificação do CHIKV no ciclo urbano	39
Figura 11- Ilustração esquemática de possíveis forma de entrada do vírus CHIKV na célula hospedeira.....	43
Figura 12- Ciclo de replicação do CHIKV	45
Figura 13- Assinaturas imunes de infecção e inflamação pelo CHIKV	52
Figura 15- Sintomas comuns na fase aguda da infecção por CHIKV	55
Figura 16- Evolução da infecção e diagnóstico clínico do CHIKV	63
Figura 18- Modelo estrutural de uma IgG humana	77
Figura 19- Abordagens conceitualmente diferentes para moléculas miméticas de anticorpos	80
Figura 20- Fluxograma de trabalho do protocolo de <i>motifgraft</i>	84
Figura 21- fluxograma de trabalho do <i>RosettaDock</i>	88
Figura 22- Esquemática operacional do <i>RosettaScript</i>	92
Figura 23- Esquema metodológico das etapas realizadas para o desenvolvimento e caracterização dos aptâmeros neutralizantes para CHIKV.....	100
Figura 24- Representação da seleção das estruturas para construção do complexo para estudo da interação de interface antígeno-anticorpo.....	101
Figura 25- Representação das estruturas geradas pelos cálculos de docking molecular do complexo Fab-CHIKV-265 e E2B produzido para estudo.....	114
Figura 26- RMSD dos átomos do <i>backbone</i> das proteínas e representação do comportamento das estruturas secundárias ao longo do tempo de simulação.....	116
Figura 27- Análise de porcentagem de ocupância e de ligações de hidrogênio dos resíduos na interface do complexo montado, Fab-CHIKV-265 e E2B	117
Figura 28- Contribuição energética dos resíduos de maior interação do Fab-CHIKV-265 com a E2B	118
Figura 29- Representação das proteínas utilizadas como carreadores	120
Figura 30- Representação dos aptâmeros interagindo com o domínio E2B.....	121

Figura 31- Fluxograma de desenho e seleção aptâmeros	123
Figura 32- Representação das 100.000 estruturas geradas para cada aptâmero depois do <i>docking molecular</i> e o redesenho da interface dos aptâmeros.....	126
Figura 33- Análise estrutural para a proteína nativa (1JB3), aptâmero (CETZDT-1) e aptâmero com reversões de mutações (CETZDT-1).....	129
Figura 34- Análise estrutural da proteína nativa (1TZV), aptâmero (CETZDT-2) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-2).....	131
Figura 35- Análise estrutural da proteína nativa (2ZPD), aptâmero (CETZDT-3) e aptâmero modificado (CETZDT-3).....	132
Figura 36- Análise estrutural da proteína nativa (4YME), aptâmero (CETZDT-4) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-4).....	133
Figura 37- Análise estrutural da proteína nativa (5H9K), aptâmero (CETZDT-5) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-5).....	134
Figura 38- Análise estrutural da proteína nativa (5UMR e 6ANR) e de 4 desenhos com esses carreadores.....	137
Figura 39- Estabilidade dos aptâmeros selecionados	138
Figura 40- Análise de flutuação dos aptâmeros selecionados	140
Figura 41- Expressão e purificação da proteína CETZDT-2.....	144
Figura 42- Afinidade entre CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-6 e a E2B medida por meio de MST	145
Figura 44- Neutralização do CHIKV pelo CETZDT-2.....	148
Figura 45- Neutralização do MAYV pelo CETZDT-2	150

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sinais e sintomas que podem contribuir no diagnóstico diferencial entre dengue, chikungunya e zika.....	61
Quadro 2- Os testes baseados em ELISA estão disponíveis no mercado.....	66
Quadro 3- Principais modelos animais para estudar a infecção por CHIKV.....	71

LISTA DE QUADROS

Tabela 1- Critérios de classificação CAPRI para predição de interação.....	90
Tabela 2- Os aspectos energéticos dos aptâmeros selecionadas depois das etapas <i>docking</i> e <i>design</i> da interface.....	124
Tabela 3- Comparação da energia de ligação entre aptâmeros sem reversão de mutações ($\Delta\Delta G$ inicial) e com reversão ($\Delta\Delta G$ final).....	127
Tabela 4- Estruturas melhores ranqueadas segundo os critérios CAPRI.....	136
Tabela 5- Classificação dos aptâmeros selecionados.....	141
Tabela 6- O <i>score</i> das estruturas depois de modificações baseadas na PSSM.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
ADE	aprimoramento dependente de anticorpos
ADP	Adenosina difosfato
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AS	<i>Alaninescanning</i>
°C	Graus Celsius
C	Proteína do capsídeo
CAPRI	Avaliação Crítica de Interações Previstas
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
DM	Dinâmica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECSA	África Oriental e Central-Sul
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fab	Fragmento de ligação com o antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
H insat	Ligações de hidrogênio insaturadas
HEK293T	Células de rim embrionárias humanas
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IFA	Ensaio imunofluorescente
IFN-I	Interferon do tipo I
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β

IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IL-12	Interleucina 12
IOL	Ásia e Oceano Índico
ISG	Genes estimulados por interferon
Kb	Kilobyte
kDa	Kilodalton
K_D	Constante de dissociação
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop
LLC-MK2	Células epiteliais do rim de macaco Rhesus
mAbs	Anticorpos monoclonais
MAC-ELISA	Teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina de classe M
MAYV	Vírus Mayaro
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
Mab	Anticorpos monoclonais
MC	Monte Carlo
MD	Docking Molecular
MDA5	Proteína Associada à Diferenciação de Melanoma
MN	Microneutralização
MST	Termoforese em Microescala
NPT	<i>Ensemble</i> isobárico-térmico
nsP	Proteínas não estruturais
NK	Células <i>natural killer</i>
NTP	Nucleosídeo trifosfato
NTPase	nucleotídeo trifosfatase
NTR	Região não traduzida
ONNV	Vírus O'nyong-nyong
ORFs	Fase de leitura aberta
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PARPs	Poli (ADP-ribose) polimerases

Pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Banco de dados de Proteínas
PFU	Unidades formadoras de placas
pH	Potencial hidrogeniônico
PHB	Proibitinas, do inglês: <i>Prohibitin</i>
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
prM	Proteína precursora de membrana
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PSSM	Matriz de pesos de posições específicas
RE	Retículo endoplasmático
REU	Unidades de Energia do Rosetta
RMSD	O desvio da raiz quadrada média ou da raiz quadrada média
RMSF	Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática Média
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAseq	Sequenciamento de RNA
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RIG-I	Genes indutores de ácido retinóico – I
RRV	Vírus Ross River
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa
sPs	Proteínas estruturais
SFB	Soro fetal bovino
SFV	Vírus da floresta de Semliki
SINV	Vírus Sindbis
TF	Proteína transfame
TIM-1	Imunoglobulina da célula T da glicoproteína de superfície celular e a mucina 1
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

VLP
WA

Partículas semelhante a vírus
África Ocidental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	22
2.1 História e Epidemiologia do CHIKV	22
2.2 Genoma e estrutura da partícula viral	27
2.3 Transmissão viral e permanência em fluidos biológicos.....	35
2.4 Ciclo de replicação na célula do hospedeiro.....	39
2.5 Resposta imune do hospedeiro	46
2.5.1 Fase aguda da doença (≤ 3 meses após o início da infecção).....	46
2.5.2 Fase crônica da doença (> 3 meses após o início da infecção).....	49
2.6 Sinais e Sintomas Clínicos.....	53
2.6.1 Fase Aguda (primeiras três semanas)	54
2.6.2 Fase Crônica (depois do terceiro mês)	56
2.6.3 Outros sintomas	59
2.7 Diagnóstico	61
2.7.1 Diagnóstico Molecular	63
2.7.2 Diagnóstico Sorológico	64
2.7.4 Isolamento Viral	68
2.8 Tratamento.....	69
2.8.1 Terapia para alívio de sintomas	72
2.8.2 Terapia específica com pequenos inibidores	73
2.8.3 Terapia específica com uso de anticorpos	74
2.10 Engenharia de anticorpos terapêuticos	76
2.11 Desenho computacional de proteínas.....	81
2.11.1 Princípios fundamentais do programa Rosetta	81
2.11.2 Motifgraft e Design de Aptâmeros	83
2.11.3 Ancoragem Molecular	85
2.11.4 Desenho da Interface	91
2.11.5 Mecânica molecular.....	92
2.11.6 Campo de força.....	94
2.11.7 Dinâmica Molecular (DM)	95
2.11.8 Condições Periódicas de Contorno	96
3 JUSTIFICATIVA	97

4 OBJETIVOS	98
4.1 Objetivo Geral.....	98
4.2 Objetivos Específicos.....	98
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	99
5.1 Local do Experimento	99
5.2 Metodologia Computacional.....	99
5.2.1 Montagem de um complexo antígeno-anticorpo modelo para estudo das interações de interface proteína-proteína.....	100
5.2.2 Refinamento do modelo por ancoragem molecular.....	102
5.2.3 Avaliação das interações moleculares da interface do complexo por dinâmica molecular	102
5.2.4 Verificação da contribuição dos resíduos da interface por mutagênese computacional de varredura de alanina.....	103
5.2.5 Desenho dos Aptâmeros	104
5.2.6 Redesenho da superfície de interação para otimização dos aptâmeros desenhados.....	105
5.2.7 Seleção dos desenhos por meio do protocolo <i>AbInitioRelax</i>	106
5.2.8 Otimização das sequências das proteínas desenhadas por critérios evolutivos.....	106
5.3 Metodologia Experimental.....	107
5.3.1 Cultivo de células VERO	107
5.3.2 Produção de Estoque Viral de CHIKV e MAYV.....	107
5.3.3 Titulação Viral de CHIKV e MAYV	108
5.3.4 Expressão e purificação dos aptâmeros selecionados.....	108
5.3.5 Estudo das constantes de afinidade por termoforese em microescala.....	109
5.3.8 Avaliação da estabilidade por dicroísmo circular.....	109
5.3.6 Teste de neutralização por redução de placas - PRNT	110
5.3.7 Microneutralização	111
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
6.1 Ancoragem molecular para refinamento da estrutura modelo.....	113
6.2 Dinâmica Molecular	115
6.3 <i>Desenho dos aptâmeros</i>	119
6.4 Seleção dos mutantes e otimização por meio de ancoragem molecular e redesenho da interface	124
6.5 Reversão de mutações não positivas para o desenho dos aptâmeros.....	126
6.6 Seleção dos aptâmeros por meio de <i>AbInitioRelax</i>	127

6.7 Seleção dos aptâmeros por meio de dinâmica molecular.....	128
6.7 Filtrando outros aptâmeros por meio de parâmetros CAPRI	134
6.9 Expressão e purificação dos aptâmeros.....	143
6.10 Avaliação da afinidade entre os aptâmeros e o CHIKV	144
6.11 Verificação da estabilidade do CETZDT-2.....	145
6.12 Avaliação do potencial de neutralização viral dos aptâmeros.....	147
7 CONCLUSÃO.....	153
REFERÊNCIAS.....	154
APÊNDICE A- FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES.....	156
APÊNDICE B - INPUT PARA O ROSETTA.....	185
ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS NO PERÍODO DO DOUTORADO	188
ANEXO B - PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA TESE PUBLICADO	189
ANEXO C - PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA TESE E EM PROCESSO DE SUBMISSÃO	190

INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é considerado um arbovírus que pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* que se disseminou principalmente, em áreas tropicais e subtropicais do globo devido a ampla distribuição dos seus vetores mais relevantes, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (HALSTEAD, 2015). Em meados de 2015, a febre Chikungunya, assim como é conhecida a doença causada pela infecção do CHIKV, ganhou notoriedade devido a sua disseminação e suas manifestações clínicas intensas e debilitantes (CDC, 2019).

O genoma do CHIKV contém quatro proteínas não estruturais, ou seja, nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, codificadas na extremidade 5' do genoma, e cinco proteínas estruturais codificadas na extremidade 3' do genoma, incluindo três proteínas glicosiladas, E1, E2, E3, e uma pequena glicoproteína 6K, de 64 aminoácidos, e uma proteína C do nucleocapsídeo não glicosilada (SINGH *et al.* 2018). A proteína de envelope E2 consiste de 3 domínios (C, A e B), os quais são considerados potenciais sítios de interação com receptores celulares. O mapeamento de epítomos de anticorpos induzidos por uma infecção por CHIKV em humanos mostrou que a proteína E2 é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes de CHIKV. Fox e colaboradores (2015) (FOX *et al.*, 2015) mostraram que anticorpos monoclonais utilizados contra epítomos da proteína E2 inibiram várias etapas no ciclo de vida viral e protegem *in vivo* contra infecção em modelos de camundongos. Além disso, foi detectada imunização cruzada para outros vírus da mesma família, inclusive para o vírus mayaro (MAYV). Sugerindo que anticorpos neutralizantes produzidos contra epítomos do domínio B da proteína E2, podem ser alvos estratégicos para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias contra o CHIKV e outros alfavírus.

Mesmo com a relevância médica evidente, com indivíduos apresentando sequelas graves tais como deformação nas articulações, danos no cérebro que dificultam a coordenação motora e prejudicam as atividades cotidianas, a infecção pelo CHIKV ainda não tem profilaxia e tratamento específicos, como vacinas e medicamentos. Sendo assim, estudos que sejam direcionados para esses objetivos, são cada vez mais necessários. Uma ferramenta que vem sendo amplamente utilizada na busca de novos alvos terapêuticos ou vacinais consiste na análise de anticorpos monoclonais. Os anticorpos vêm sendo utilizados ao longo dos anos com diferentes finalidades (terapêuticas, diagnósticas), muito em virtude da alta afinidade e especificidade de suas interações com seus alvos. Produzir anticorpos monoclonais consiste na obtenção de imunoglobulinas secretadas por células híbridas, derivadas de um único clone

específico denominado hibridoma, a partir de prévia imunização de camundongos com o antígeno específico. No entanto, a produção de anticorpos para imunoterapia apropriada é um processo muito dispendioso. Existem vários problemas enfrentados na produção e farmacocinética de anticorpos imunoterápicos, como a dificuldade de garantir a biodisponibilidade para um órgão ou região específica, contaminação do hibridoma, alta taxa de imunogenicidade, quando não são totalmente produzidos em humanos, e baixo rendimento de produção (NIMJEE *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2012)

Os aptâmeros (anticorpos sintéticos) representam uma nova alternativa terapêutica devido às suas vantagens de produção e nas propriedades químicas que superam alguns dos problemas mencionados anteriormente relacionados aos anticorpos convencionais. Podem ainda ser sintetizados de forma relativamente barata e rápida, sem variabilidade de lote e baixa imunogenicidade (VARASTEH e SANKIAN, 2016; NOZARI e BEREZOVSKI, 2017). A produção de aptâmeros é um processo controlado com menor probabilidade de contaminação por microorganismos, em contraste com a produção biológica *in vivo* de anticorpos que tendem à contaminação viral ou bacteriana (KEEFE *et al.*, 2010). Os aptâmeros podem, ainda, ser engenheirados para apresentar estabilidade térmica (processo que reduz a necessidade do sistema de cadeia de frio) e ganho de afinidade e especificidade (diminuir reações cruzadas por outros vírus da mesma família por exemplo), indicando uma nova abordagem terapêutica contra o CHIKV.

Nesta perspectiva, o presente trabalho propõe-se a desenhar computacionalmente e avaliar o potencial neutralizante dos aptâmerosengenheirados frente à infecção por CHIKV e MAYV, contribuindo assim com uma alternativa e viável estratégia terapêutica como forma de contornar a problemática relacionada à atual falta de vacinas patenteadas ou fármacos antivirais no tratamento da infecção por CHIKV e MAYV.

Para testar nossa hipótese de que moléculas inspiradas em anticorpos neutralizantes dirigidas contra epítomos específicos do domínio B da proteína E2 podem ser desenhadas computacionalmente e apresentar capacidade de ligar-se ao CHIKV com alta afinidade e neutralizar a infecção *in vitro* de alfavírus, esta tese foi desenvolvida em duas partes. A primeira discorre sobre o estudo e compreensão das interações entre um anticorpo monoclonal descrito na literatura como capaz de neutralizar os alfavírus, em particular o CHIKV. Depois dessa compreensão teórica dos mecanismos de reconhecimento, resíduos pontuais foram usados para construção de proteínas quiméricas de estruturas simplificadas que se mostram estáveis, com potencial de reconhecer o domínio B da proteína de envelope E2.

Na segunda parte, essas proteínas foram sintetizadas em laboratório e testadas frente ao CHIKV e MAYV. Uma dessas proteínas quando avaliada a estabilidade estrutural se mostrou estável suportando altas temperaturas sem perda de estrutura secundária. Durante os ensaios de afinidade mostrou se ligar a proteína E2 do CHIKV e neutralizou a infecção de CHIKV E MAYV *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

Os tópicos a seguir apresentam uma revisão acerca de diversos aspectos relacionados ao vírus Chikungunya, tais como aspectos gerais relacionados a epidemiologia, transmissão, diagnóstico e tratamento, além de alguns detalhes da teoria por trás da engenharia de proteínas utilizada neste estudo.

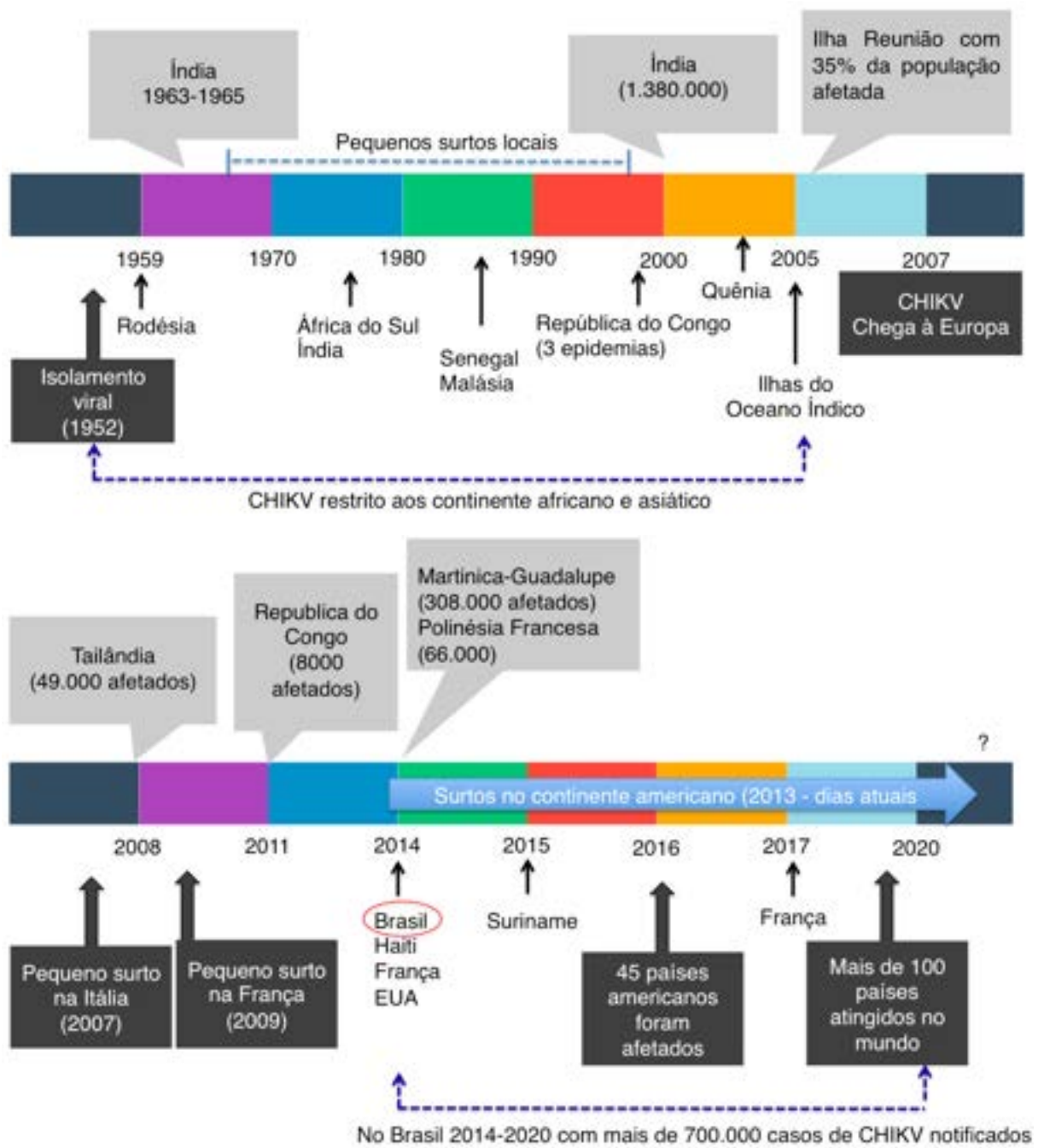
2.1 História e Epidemiologia do CHIKV

Há menos de 20 anos, o CHIKV era apenas um vírus endêmico do continente africano causando, pequenos e esporádicos, surtos locais (REZZA; WEAVER, 2019; WIKAN; SMITH, 2016). No entanto, as manifestações clínicas causadas por essa arbovirose são descritas desde 1779 (CAREY, 1971; HALSTEAD, 2015; KUNO, 2015). A primeira descrição detalhada desse vírus e os efeitos de sua infecção em humanos foi realizada por Robinson (ROBINSON, 1955) e Lumsden (LUMSDEN, 1955) que relataram um surto de uma doença semelhante à dengue que ocorreu entre 1952 e 1953, no planalto de Makonde, na província do sul de Tanganica (atual Tanzânia). Durante esse surto, pessoas de todas as idades relataram sintomas de uma doença febril com erupção cutânea e artralgia. Porém, algo chamava mais a atenção, a artralgia intensa e duradoura que impedia o doente de mudar de posição sem ajuda. Dessa maneira, a doença ganhou o nome de chikungunya que é derivada do verbo raiz de Makonde “kungunyala”, que significa "aquilo que se dobra", referindo-se às posições distorcidas daqueles que foram afetados pelo início repentino e grave de uma artralgia. Entre 1952 e 1953, estima-se que 60% a 80% da população nessa região desenvolveu sintomas de febre, erupção cutânea e artralgia (ROBINSON, 1955). Na tentativa de se isolar o agente patológico foi feita a inoculação em camundongos de amostras de soro de indivíduos sintomáticos que resultaram na morte desses animais. Em contraste a essa observação, já se tinha o conhecimento de que a infecção pelo vírus Dengue (DENV) era difícil de se estabelecer em camundongos (ROSS, 1956). Esses dados, juntamente com a artralgia intensa, apontavam que a causa da síndrome denominada chikungunya era de fato distinta da dengue e, em 1952, o CHIKV foi finalmente isolado (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

Posteriormente, surtos dessa doença foram posteriormente relatados nas Filipinas, Tailândia, Camboja, Vietnã, Índia, Mianmar e Sri Lanka (WHO, 2013). Uma característica distinta do CHIKV diz respeito à sua capacidade de causar surtos explosivos, depois de

aparentemente desaparecer por vários anos ou décadas. Devido o ressurgimento do CHIKV em 2004 (Figura 1), quase meio milhão de casos foram registrados em um surto ocorrido no LamuAtoll, no Quênia. O vírus migrou para regiões próximas e no ano de 2005 chegou às ilhas Madagascar, Maurício e Reunião. No ano seguinte foi responsável por uma grande epidemia na Ilha da Reunião no Oceano Índico, envolvendo cerca de 35% de toda a população, seguida rapidamente por outra epidemia na Índia que afetou quase 1,5 milhões de pessoas (CAVRINI; GAIBANI; PIERRO; ROSSINI *et al.*, 2009; NARESH KUMAR; SAI GOPAL, 2010; RENAULT; BALLEYDIER; D'ORTENZIO; BÂVILLE *et al.*, 2012; YERGOLKAR; TANDALE; ARANKALLE; SATHE *et al.*, 2006).

Figura 1- Linha do tempo dos principais surtos causados pelo CHIKV



Fonte: Adaptado de Brasil (2016, 2018, 2019, 2020a, 2020b) e Mascarenhas *et al.* (2018).

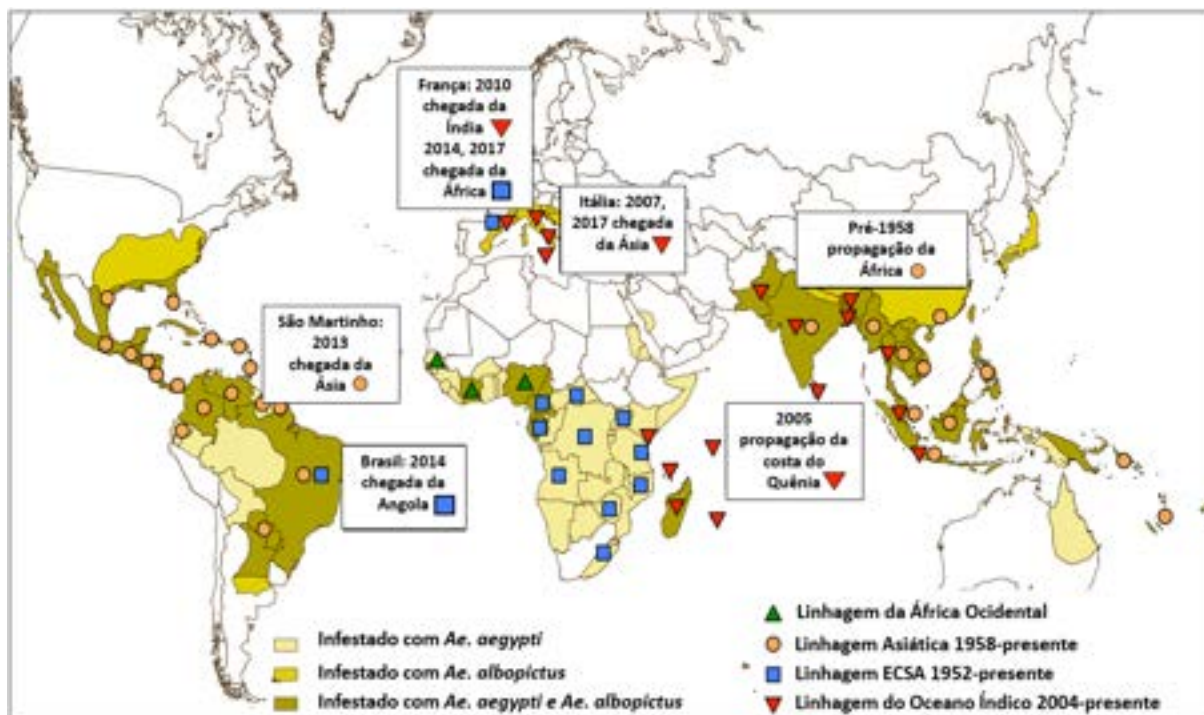
Nos últimos anos, à medida que as viagens globais aumentaram, houve um crescimento do número de casos de CHIKV descritos em regiões não endêmicas (ENSERINK, 2008). Durante os surtos no Oceano Índico e no sul da Ásia, milhares de viajantes infectados transportaram o CHIKV para quase todo o mundo, inclusive para a Europa, iniciando pequenos surtos na França e na Itália (Figura 1) (PISTONE; EZZEDINE;

SCHUFFENECKER; RECEVEUR *et al.*, 2009; REZZA; NICOLETTI; ANGELINI; ROMI *et al.*, 2007). Essas situações já apontavam para a possibilidade de importação de casos da doença para a América e, ainda mais grave, o risco de estabelecimento endêmico do vírus no continente. Esse risco se mostrava real tendo em vista que as condições eram favoráveis: ausência de imunidade prévia, baixa qualidade das moradias, saneamento básico deficiente e a abundância de mosquitos vetores (JOHANSSON, 2015).

Em dezembro de 2013, foram reportados os primeiros casos autóctones de infecções por esse vírus nas Américas quando uma cepa da linhagem asiática foi detectada na ilha caribenha de St. Martin (Figura 2). Esse surto se espalhou rapidamente pelas Américas Central, do Sul e do Norte, onde as principais epidemias atingiram o seu pico em 2016 com aproximadamente 2 milhões de casos distribuídos em 45 países (LEPARC-GOFFART; NOUGAIREDE; CASSADOU; PRAT *et al.*, 2014; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). Até setembro de 2019, foram relatados casos autóctones em mais de 100 países distribuídos nas Américas, África, Europa e Ásia, um aumento alarmante e sem precedentes, afetando milhões de pessoas (CDC, 2019).

Em agosto de 2014, a transmissão local do CHIKV foi detectada no Brasil pela primeira vez (BRASIL, 2014) (Figura 2), com casos relatados quase simultaneamente em Oiapoque (Amapá, norte do Brasil) e Feira de Santana (Bahia, nordeste do Brasil), se espalhando para outros estados brasileiros. No mesmo ano, foram notificados 2.768 casos autóctones do CHIKV, confirmados por critérios clínico-epidemiológicos e/ou laboratoriais. Desde 2014 e até a 20ª semana epidemiológica de 2020, um total de 733.801 casos de CHIKV foram notificados no Brasil (BRASIL, 2016; 2018; 2019; 2020a; b).

Figura2- Países com seus respectivos períodos de identificação dos primeiros casos autóctones de transmissão do CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor deRezza e Weaver (2019).

Legenda: O mapa exhibe a distribuição geográfica do CHIKV e dos seus principais vetores. As regiões em amarelo escuro apresentam alta infestação dos mosquitos vetores do gênero *Aedes*. O vírus foi isolado pela primeira vez na África em 1952, causando apenas pequenos surtos locais por meio das linhagens da África Ocidental e a ECSA. O CHIKV migra, posteriormente, para a Ásia, onde uma nova linhagem a IOL, mais adaptada ao *Ae. Albopictus* conseguiu se disseminar rapidamente causando grandes epidemias principalmente na Índia. Viajantes espalham o vírus para a Europa causando surtos na Itália e na França. Em 2013, o vírus foi detectado pela primeira vez no continente Americano em São Martinho. Em 2014 duas linhagens do CHIKV chegam ao Brasil, entrando pelo norte e nordeste do país e depois se espalhando rapidamente para os demais estados da federação.

As análises filogenéticas do CHIKV identificaram três linhagens principais: Linhagem da África Ocidental (*West Africa- WA*), Linhagem Leste, Central e Leste/Central/África do Sul (*East/Central/South African- ECSA*), Linhagem Asiática (VOLK; CHEN; TSETSARKIN; ADAMS *et al.*, 2010). Em 2004, uma epidemia da linhagem ECSA ressurgiu na África e no Oceano Índico e evoluiu para uma nova linhagem do Oceano Índico (IOL), que assolou esta região causando uma série de surtos explosivos e depois acometendo a Itália e a França (REZZA; WEAVER, 2019; VENTURI; DI LUCA; FORTUNA; REMOLI *et al.*, 2017; VOLK; CHEN; TSETSARKIN; ADAMS *et al.*, 2010; WEAVER; FORRESTER, 2015).

Usando modelos filogenéticos, Cherian et al. (2009) estimaram que o genótipo asiático de CHIKV surgiu entre 50 e 310 anos atrás, enquanto os genótipos da África Ocidental e Oriental divergiram entre 100 e 840 anos atrás. Acredita-se que o CHIKV tenha evoluído na

África com base no relacionamento próximo com o O'nyong-nyongvirus (ONNV), um alfavírus restrito a este continente (CHERIAN; WALIMBE; JADHAV; GANDHE *et al.*, 2009).

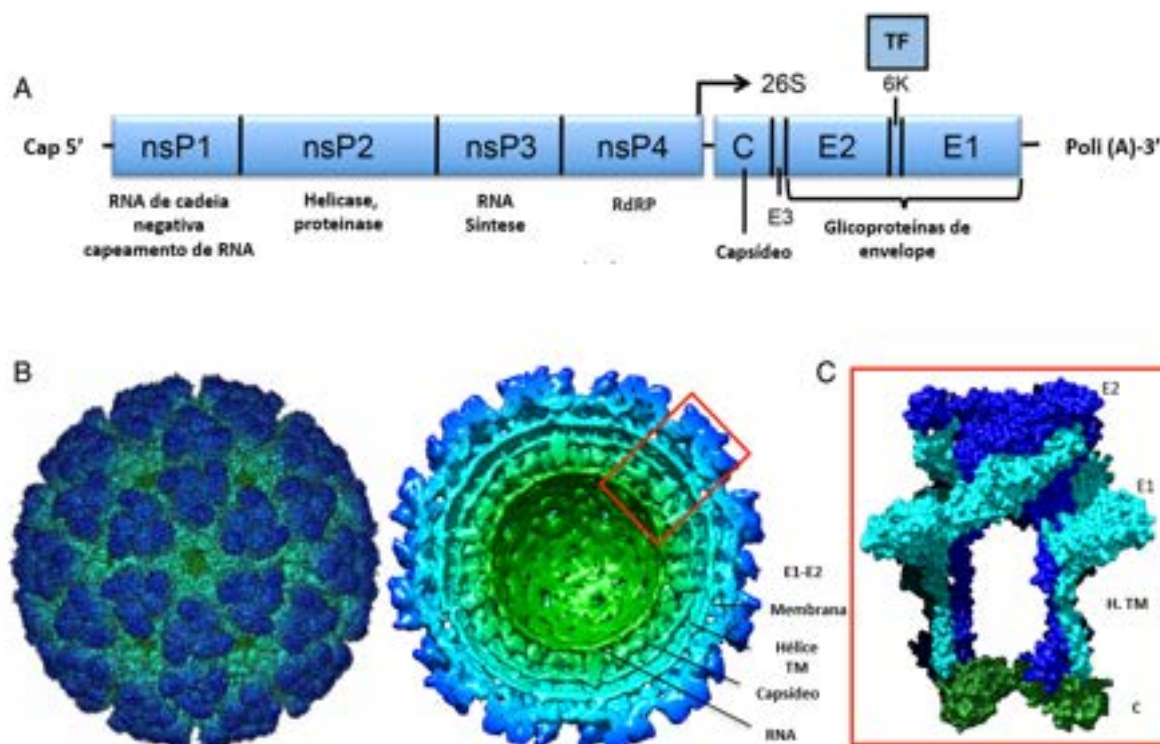
A linhagem da IOL causou a maioria dos surtos de CHIKV entre 2004 e 2012, enquanto a linhagem asiática e a linhagem ECSA são as principais responsáveis pelos surtos nas Américas (CASSADOU; BOUCAU; PETIT-SINTUREL; HUC *et al.*, 2014; WEAVER, 2014; WEAVER; FORRESTER, 2015). O genótipo ECSA do CHIKV veio diretamente da África para o Brasil, causando um surto na Bahia, enquanto o genótipo asiático CHIKV veio da região do Caribe para a região norte (NUNES; FARIA; DE VASCONCELOS; GOLDING *et al.*, 2015).

Todas as linhagens de CHIKV constituem essencialmente um único sorotipo (95,2-99,8% de identidade dos aminoácidos), e a imunidade de rebanho com proteção cruzada provavelmente regula a natureza periódica das principais epidemias (CHUA; SAM; MERITS; CHAN, 2016; LANGSJOEN; HALLER; ROY; VINET-OLIPHANT *et al.*, 2018; VOLK; CHEN; TSETSARKIN; ADAMS *et al.*, 2010).

2.2 Genoma e estrutura da partícula viral

O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphaviridae*, que inclui outros alfavírus artritogênicos, como ONNV, o vírus Ross River (RRV) e o vírus Mayaro (MAYV) (LWANDE; OBANDA; BUCHT; MOSOMTAI *et al.*, 2015; STRAUSS; STRAUSS, 1994). O CHIKV tem aproximadamente 65nm de diâmetro, com nucleocapsídeo icosaédrico e envelopado. O genoma, RNA fita simples sentido-positivo de ~11.8kb de tamanho possui dois quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames*- ORFs) (Figura 3) codificando duas poliproteínas: não-estrutural (nsPs) de 2472 aminoácidos e estrutural (sPs) de 1244 aminoácidos (GANESAN; DUAN; REID, 2017; KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002). A tradução da ORF que codifica para as nsPs produz uma poliproteína que é clivada nas proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, que tem a função de replicar o genoma, modular funções celulares essenciais para a replicação, infecção e patogênese viral, entre outras funções (STRAUSS; STRAUSS, 1994). As sPs são traduzidas de um RNA subgenômico que é produzido pelo reconhecimento de um promotor interno pela replicase, produzindo uma RNA intermediário de sentido-negativo. As sPs consistem na proteína do capsídeo, E3, E2, 6K/TF e E1 (GARMASHOVA; GORCHAKOV; VOLKOVA; PAESSLER *et al.*, 2007; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

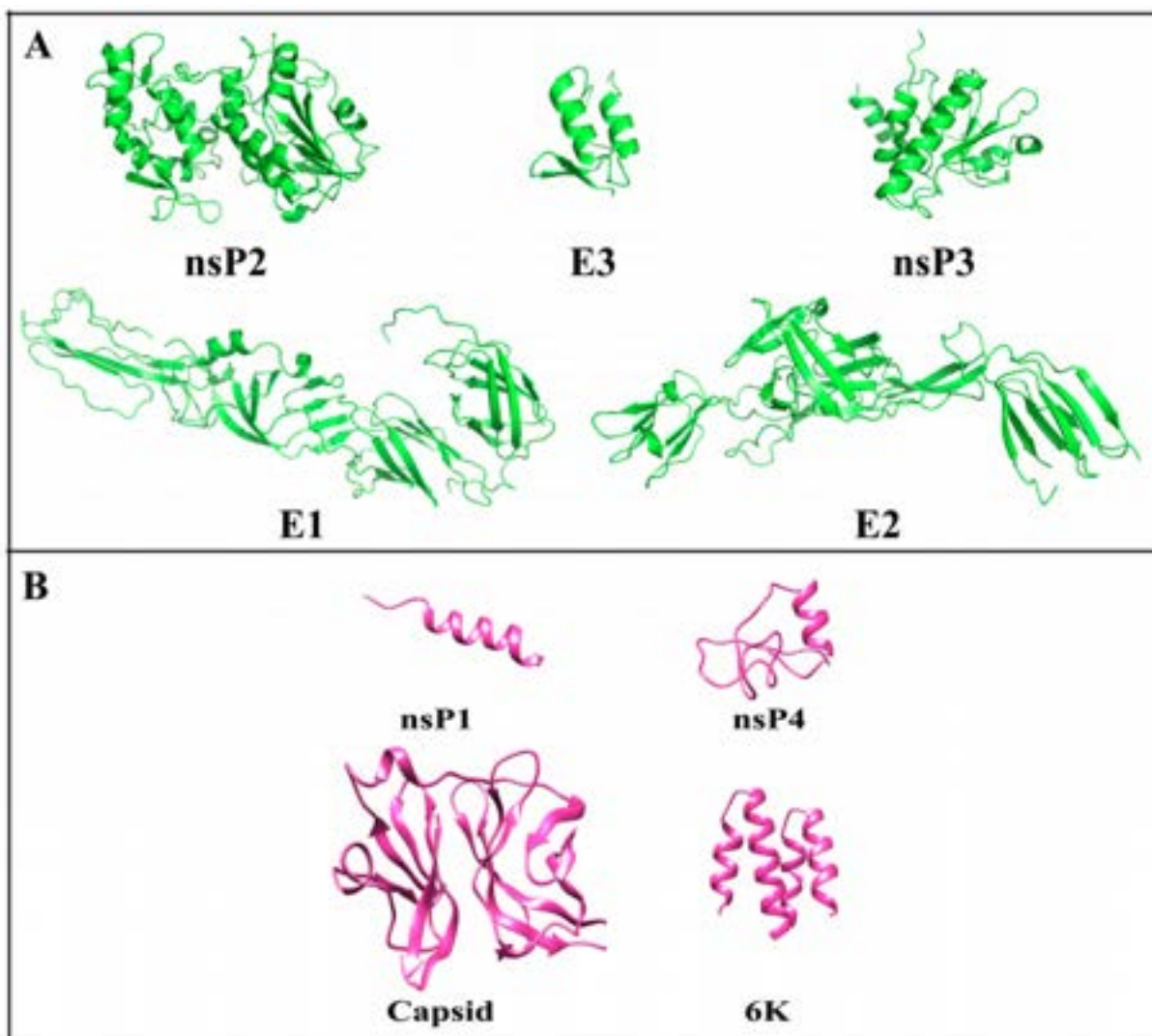
Figura3- A Organização genômica e a estrutura da partícula do CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de: Erasmus; Rossi; Weaver *et al.*, (2016)

Legenda: A – Organização do genoma e papéis funcionais dos quadros de leitura abertos da poliproteína não estrutural e estrutural, bem como do promotor subgenômico 26S. Durante a tradução, o ribossomo no gene da 6K muda para a posição -1 o quadro de leitura, levando à produção de proteína TF. B e C – Reconstrução microscópica crio-eletrônica de partículas semelhantes ao vírus CHIKV e representação aumentada dos picos triméricos consistindo em heterodímeros de glicoproteínas de envelope E1 e E2. Abreviações: E, envelope; TM, transmembrana.

A proteína nsP1 (Figura 4) (535 aminoácidos, ~60 kDa) possui atividade de guanina-7-metiltransferase e guanilil transferase, responsável pelo capeamento tanto do RNA viral genômico, quanto do RNA subgenômico 26S (KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). Interessantemente, ela faz esse processamento do capeamento do RNA viral de uma maneira não canônica (AHOLA; KAARIAINEN, 1995; DECROLY; FERRON; LESCAR; CANARD, 2011). Acredita-se que o capeamento do RNA do CHIKV seja uma estratégia para conferir proteção contra a degradação pelas exonucleases do hospedeiro e também permitir a tradução eficiente do RNAm viral (AHOLA; KAARIAINEN, 1995).

Figura 4- Representação *cartoon* das proteínas do CHIKV

Fonte: Jain; Kumari; Somvanshi; Grover *et al.*, (2017)

(A) Estruturas de raios-X de nsP2, E3, nsP3, E1 e E2. (B) Estruturas modeladas por homologia de nsP1, Capsid, nsP4 e 6K. Não foi encontrado representação para a proteína TF.

A proteína nsP2 (Figura 4) é a maior nsP, consistindo em 798 aminoácidos com um peso molecular aproximado de 90 kiloDalton (kDa) (KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). A nsP2 multifuncional possui atividade crucial na replicação viral sendo capaz de realizar pelo menos quatro funções enzimáticas: i. atividade de helicase (DAS; MERITS; LULLA, 2014), ii. participa do emparelhamento complementar de bases do RNA de fita simples (DAS; MERITS; LULLA, 2014), iii. exibe atividades de nucleotídeo trifosfatase (NTPase) e iv. é capaz de hidrolisar todos os desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e nucleosídeo trifosfato (NTPs) sem qualquer preferência (DAS; MERITS; LULLA, 2014; KARPE; AHER; LOLE, 2011). A atividade NTPase é essencial para preparar as cadeias de RNA para atuar

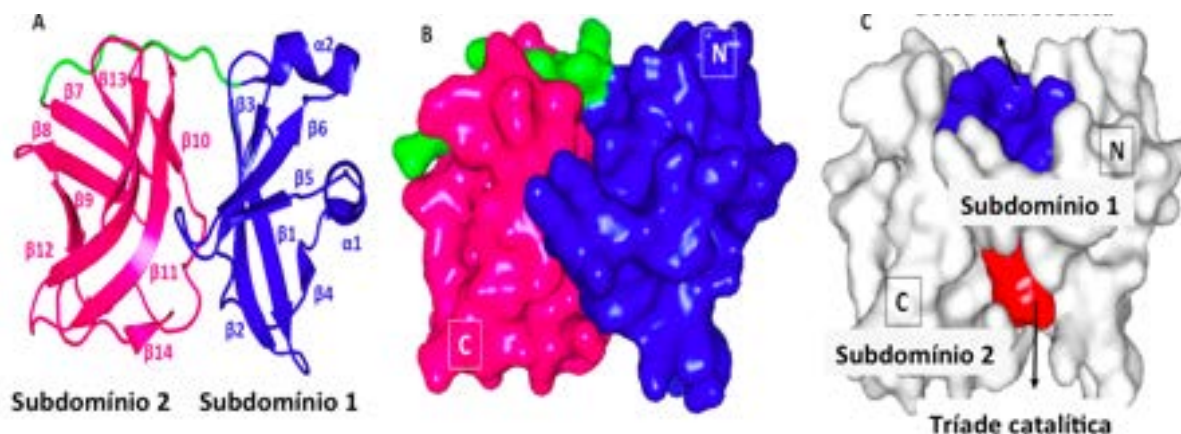
como substratos da enzima nsP1. Além disso, a nsP2 é responsável pelo processamento da poliproteína nsP (RAMAKRISHNAN; KUTUMBARAO; SUHITHA; VELMURUGAN, 2017; VASILJEVA; VALMU; KAARIAINEN; MERITS, 2001).

A proteína nsP3 (Figura 4) (530 aminoácidos, ~60 kDa) possui três domínios, um domínio macro N-terminal altamente conservado (~160 aminoácidos (aa)), seguido por um domínio de ligação Zn^{2+} (~165 aa) e uma região terminal de cauda variável (~205 aa) (KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). Acredita-se que o domínio macro funcione, principalmente, como uma hidrolase de adenosina difosfato (ADP) que remove as marcas de mono ou poli ADP-ribose nas proteínas. As marcas de ADP-ribose ocorrem, geralmente, nos resíduos Asp, Glu e Lys e são indicativas de modificações pós-traducionais pelas poli (ADP-ribose) polimerases (PARPs) (DANIELS; ONG; LEUNG, 2015; VYAS; MATIC; UCHIMA; ROOD *et al.*, 2014). McPherson e colaboradores (2017) mostraram que a perda da função de hidrolase compromete significativamente a capacidade do CHIKV de se replicar. Além disso, verificou-se que os clones infecciosos de CHIKV que codificam as hidrolases com atividades diminuídas se replicam mais lentamente em células NSC-34 neuronais de camundongos. Estes resultados indicam que o domínio macro das proteínas nsP3 desempenha um papel importante na replicação viral e na virulência do CHIKV (MCPHERSON; ABRAHAM; SREEKUMAR; ONG *et al.*, 2017).

A maior parte da proteína nsP4 (Figura 4) (611 aa, ~70 kDa) consiste de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (~500 aa), com o motivo que possui a sequência Gly-Asp-Asp (GDD) altamente conservada característico, responsável pela síntese de RNA viral em seu C-terminal (AHOLA; KAARIAINEN, 1995; KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). O remanescente (~100 aa) em seu N-terminal apesar de ser um trecho relativamente desconhecido e desordenado, é importante para a função normal do nsP4 no SINV (Sindbisvirus) (RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). Semelhante à proteína nsP3, descobriu-se que a proteína nsP4 interage com outras proteínas, como a Hsp90 e a Hsp90 α , por exemplo. A inibição da Hsp90 α resultou em uma diminuição nos níveis de RNA viral e proteína (RATHORE; HAYSTEAD; DAS; MERITS *et al.*, 2014).

A proteína do capsídeo do CHIKV (Figura 4, 5) é uma proteína multifuncional compacta de 261 aminoácidos com um peso molecular de cerca de 30 kDa (THOMAS; RAI; JOHN; GUNTHER *et al.*, 2010), composta de três regiões principais (regiões 1, 2 e 3) (HONG; PERERA; KUHN, 2006). A região 1 (1-80 aa) é capaz de se ligar ao RNA de

maneira não específica e também pode estar envolvida em interações proteicas que inibem a tradução de proteínas da célula infectada. Em contraste, a região 2 (81-113 aa) se liga especificamente ao genoma de RNA viral de comprimento total e desempenha um importante papel na oligomerização de outras proteínas do capsídeo, a fim de formar partículas de nucleocapsídeo maduras (LINGER; KUNOVSKA; KUHN; GOLDEN, 2004; OWEN; KUHN, 1996; SOKOLOSKI; NEASE; MAY; GEBHART *et al.*, 2017). A região 3 é uma serina protease contendo uma tríade catalítica conservada (His 139, Asp 161 e Ser 213) que é capaz de se auto clivar em *cis* e se inativar ligando seu sítio ativo com seu resíduo triptofano C-terminal (Figura 5) (ALIPERTI; SCHLESINGER, 1978; CHOI; TONG; MINOR; DUMAS *et al.*, 1991; MELANCON; GAROFF, 1987; STRAUSS; STRAUSS, 1994). A dimerização da proteína do capsídeo depende da interação do resíduo de Tyr 186 de um monômero com dois resíduos de Asn nas posições 188 e 220 do outro monômero, todos localizados na região 3 (SHARMA; FATMA; SAHA; BAJPAI *et al.*, 2016).

Figura 5- Estrutura cristalográfica da proteína de capsídeo de CHIKV

Fonte: Sharma; Kesari; Kumar; Tomar, (2018)

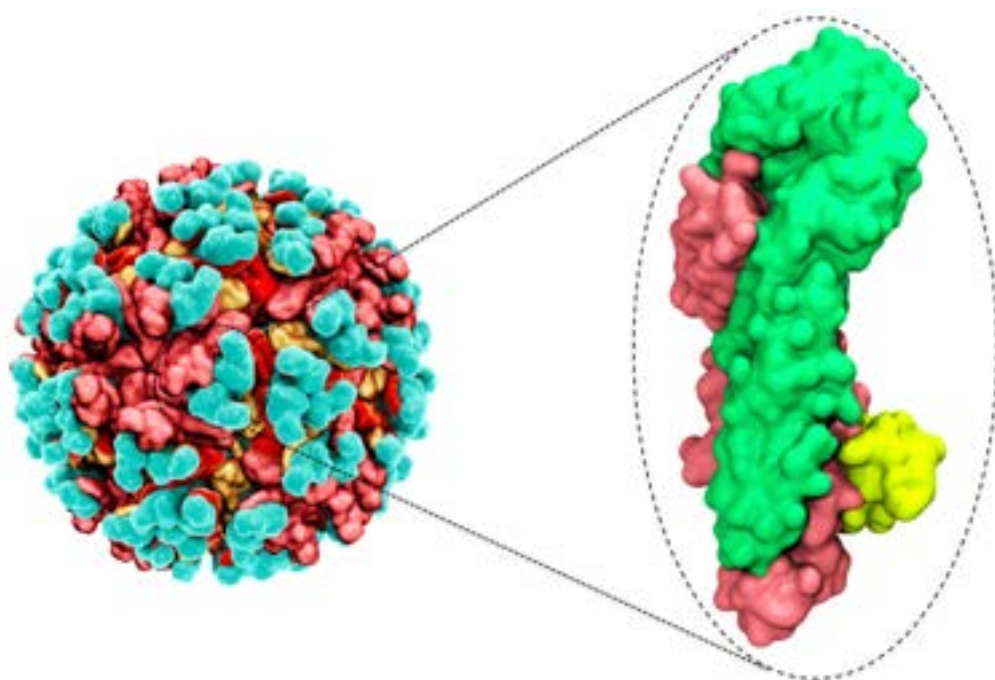
Legenda: (A) Representação *cartoon* da estrutura cristalográfica da proteína do capsídeo do CHIKV com detalhes dos elementos da estrutura secundária dos dois subdomínios. O subdomínio 1, o subdomínio 2 e a região de ligação são representados nas cores azul, magenta e verde, respectivamente. (B) Representação de superfície do subdomínio 1, subdomínio 2 e a região de ligação. O esquema de cores é o mesmo da representação *cartoon*. (C) Representação de superfície mostrando a tríade catalítica altamente conservada e a bolsa hidrofóbica nas cores vermelha e azul, respectivamente.

A proteína E1 (Figura 4) (435 aa, ~44 kDa) é uma proteína viral de membrana de classe II e contém três domínios de barril β . O domínio I está entre os domínios II e III, e a alça de fusão está na extremidade distal do domínio II, mediando a fusão do envelope viral com a membrana endossomal da célula após endocitose (CHO; JEON; KIM; NOH *et al.*, 2008; KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; KUO; CHEN; WANG; TSUI *et al.*, 2012). O domínio II, onde reside o peptídeo de fusão, é hidrofóbico e altamente conservado (GAROFF; FRISCHAUF; SIMONS; LEHRACH *et al.*, 1980).

A proteína E2 (Figura 4) (423 aa, ~40 kDa), uma glicoproteína transmembranar de tipo I, tem sido conhecida como a principal proteína antigênica e de ligação ao receptor celular para promover a entrada do CHIKV (CHO; JEON; KIM; NOH *et al.*, 2008). A proteína de envelope E2 consiste de 3 domínios (C, A e B), os quais são considerados potenciais sítios de interação com receptores celulares. Além disso, as proteínas E2 também servem como fatores estabilizadores (juntamente com as proteínas E3) para o heterodímero E1-E2 durante todo o transporte intracelular através da via secretória, onde ocorrem modificações pós-traducionais até que o complexo atinja a membrana plasmática. A proteína E2 é formada de folhas β e a conformação desta proteína é estabilizada pelas cadeias laterais de histidinas, algumas das quais formam ligações de hidrogênio com a cadeia principal da alça de fusão da E1.

O mapeamento de epítomos de anticorpos induzidos por uma infecção por CHIKV em humanos mostrou que a proteína E2 é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes de CHIKV (KAM; LEE; SIMARMATA; HARJANTO *et al.*, 2012; KAM; POK; ENG; TAN *et al.*, 2015; KAM; SIMARMATA; CHOW; HER *et al.*, 2012). A estrutura cristalográfica das partículas semelhante a vírus (*virus-like particles* – VLP) do CHIKV, revelou que a proteína E2 apresenta epítomos-alvo para neutralização por anticorpos, oito aminoácidos no domínio B, (Q184, S185, I190, V197, Y199, G209, L210, I217 – PDB:3N42) (FOX; LONG; EDELING; LIN *et al.*, 2015; LI; JOSE; XIANG; KUHN *et al.*, 2010; VOSS; VANEY; DUQUERROY; VONRHEIN *et al.*, 2010). Além do domínio B da proteína E2, regiões adjacentes sensíveis à ácido, que fazem parte do conector da fita β , também são reconhecidas por anticorpos monoclonais que protegem contra a infecção pelo CHIKV (BRÉHIN; RUBRECHT; NAVARRO-SANCHEZ; MARÉCHAL *et al.*, 2008; FOX; LONG; EDELING; LIN *et al.*, 2015; KIELIAN; SAPHIRE, 2015). Essa região é reorganizada em pH baixo para expor a alça de fusão na proteína E1 necessária para a entrada do CHIKV nas células (SELVARAJAH; SEXTON; KAHLE; FONG *et al.*, 2013).

A proteína E3 consiste em 64 aminoácidos necessários para a translocação da poliproteína E3-E2-6K-E1 ou E3-E2-TF no retículo endoplasmático para a formação dos espículas na partícula viral (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012). As proteínas E3 carregam um peptídeo sinal (uma série de resíduos polares) em seu N-terminal, os quais são cruciais para direcionar a poliproteína estrutural em direção ao retículo endoplasmático para o processamento inicial (STRAUSS; STRAUSS, 1994). Apesar de ser uma proteína pequena (~7,4 kDa), a mesma é necessária para a estabilização e maturação da glicoproteína E2 (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012). A proteína E3 não é incorporada no vírus e dissocia-se quando todo o complexo é exposto a pH neutro na superfície da membrana plasmática (UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013). Após a dissociação, a região sensível à ácido entre as glicoproteínas E2 e E1 fica exposta, e a proteína E1 sofre ativação em contato com o pH baixo durante a entrada na célula (UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013). A E3, portanto, desempenha um papel importante na proteção das glicoproteínas do envelope (Figura 6) ao pH baixo e impede a ativação prematura da E1 (CARLETON; LEE; MULVEY; BROWN, 1997; MULVEY; BROWN, 1995).

Figura 6- Representação das glicoproteínas de superfície do CHIKV

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Representações de seções transversais equatoriais da VLP do CHIKV (PDB: 6NK5), ressaltando os heterodímeros E2-E1 em um pico trimérico. As proteínas do envelope (PDB: 3N42), E2 (verde) e E1 (rosa) e E3 (amarelo), desempenham papéis importantes na ligação do vírus à membrana da célula hospedeira (E2) e sua subsequente invasão celular (E1).

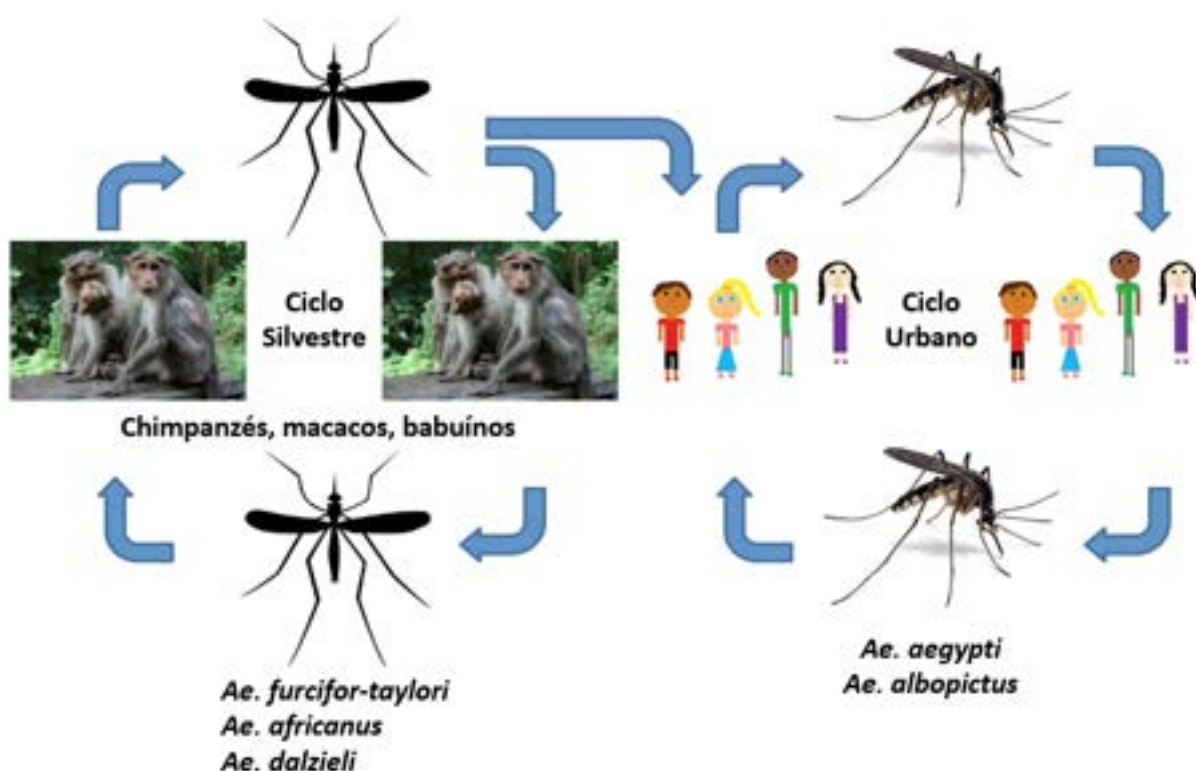
A proteína transframe (TF) (~8,3 kDa) possui o mesmo N terminal que 6K (Figura 4) (61 aminoácidos ~6,6 kDa), mas difere por ter um C-terminal mais longo (~ 15 resíduos) em vez de um C-terminal hidrofóbico mais curto encontrado em 6K (FIRTH; CHUNG; FLEETON; ATKINS, 2008; KHAN; MORITA; PARQUET MD MDEL; HASEBE *et al.*, 2002; SNYDER; KULCSAR; SCHULTZ; RILEY *et al.*, 2013). Ao contrário de outras proteínas estruturais, as funções exatas de 6K e TF não foram totalmente elucidadas (RAMSEY; MUKHOPADHYAY, 2017). No entanto, estudos em outros alfavírus sugeriram que essas proteínas acessórias virais mediam a permeabilidade da membrana e o brotamento viral, e também podem estar envolvidas na formação de canais iônicos (FIRTH; CHUNG; FLEETON; ATKINS, 2008; LOEWY; SMYTH; VON BONSDORFF; LILJESTROM *et al.*, 1995; SANZ; MADAN; CARRASCO; NIEVA, 2003). Além disso, tanto a proteína 6K quanto a proteína TF também são incorporados em baixos níveis em vírions maduros e são cruciais na preservação da estabilidade e infectividade do vírus (GAEDIGK-NITSCHKO; SCHLESINGER, 1990; LUSA; GAROFF; LILJESTROM, 1991; TAYLOR; MELTON; HERRERO; THAA *et al.*, 2016).

2.3 Transmissão viral e permanência em fluidos biológicos

A circulação de CHIKV, em geral, coincide com períodos de fortes chuvas e aumento da densidade da população de mosquitos (POWERS; LOGUE, 2007). Os mosquitos fêmeas são infectados após se alimentarem de um animal virêmico (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014). O período de incubação extrínseca é geralmente de 2 a 5 dias, sugerindo que mesmo populações de vetores com baixa sobrevivência diária de adultos podem transmitir efetivamente o vírus. As fêmeas com vírus disseminado em suas glândulas salivares podem transmitir o vírus injetando saliva infecciosa em um hospedeiro durante o repasto sanguíneo e subsequentemente levando à transmissão horizontal, caso o indivíduo não tenha imunidade (MOURYA; YADAV, 2006). Também se demonstrou experimentalmente que o CHIKV se dissemina pelos ovários dos mosquitos, resultando na infecção dos óvulos (AGARWAL; DASH; SINGH; SHARMA *et al.*, 2014; CHOMPOOSRI; THAVARA; TAWATSIN; BOONSERM *et al.*, 2016; WONG; VYTHILINGAM; SULAIMAN; LULLA *et al.*, 2016).

Dois diferentes ciclos de transmissão existem para o CHIKV (Figura 7), o ciclo silvestre, visto principalmente na África, e o ciclo urbano que foi inicialmente visto na Ásia e atualmente presente em vários centros urbanos.

Figura 7- Ciclo de transmissão do CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de THIBOUTOT; KANNAN; KAWALEKAR; SHEDLOCK *et al.*, (2010)

Legenda: Os primatas não humanos, e possivelmente outros animais selvagens, servem como reservatórios do vírus. Os mosquitos *Aedes* arbóreos infectados picam e infectam seres humanos (principalmente em zonas rurais ou áreas urbanas próximas de florestas). Os seres humanos infectados, por sua vez, infectam o *Aedes aegypti* ou *Ae. albopictus* peridoméstico, perpetuando o ciclo urbano de transmissão do CHIKV.

O CHIKV é mantido na natureza pelo ciclo silvestre, o qual inclui macacos, roedores, babuínos e aves servindo como hospedeiros/reservatórios, bem como mosquitos *Aedes* arbóreos (DIALLO; THONNON; TRAORE-LAMIZANA; FONTENILLE, 1999; JUPP; CORNEL, 1988). Os seres humanos substituem estes animais selvagens como reservatórios durante períodos de epidemias (CAGLIOTI; LALLE; CASTILLETI; CARLETTI *et al.*, 2013). O vetor mais efetivo para transmissão humana é *Ae. aegypti*, enquanto *Ae. furcifor-taylori* é a espécie predominante para transmissão em animais (MOURYA; YADAV, 2006).

Interessantemente, uma única mutação de Ala 226 para um resíduo de valina (A226V) na glicoproteína E1 aumentou a disseminação do CHIKV nos órgãos secundários dos mosquitos *Ae. albopictus*. Essa mutação coincidiu com a identificação desse mosquito como um segundo vetor de transmissão durante a epidemia do Oceano Índico em 2004 (VAZEILLE; MOUTAILLER; COUDRIER; ROUSSEAUX *et al.*, 2007). Embora essa mutação não altere a transmissão do vírus por *Ae. aegypti*, aumenta o número de potenciais vetores para espalhar a doença em regiões geográficas também infestadas por *Ae. albopictus*, como acontece no Brasil (BURT; ROLPH; RULLI; MAHALINGAM *et al.*, 2012; TENG; KAM; TAN; NG, 2011). A competência vetorial de *Ae. albopictus* também foi aprimorada por mutações adaptativas no CHIKV com substituições de aminoácidos nas proteínas E2 e E3 que proporcionam o aumento da infecção inicial no intestino médio do *Ae. albopictus* (LOUNIBOS; KRAMER, 2016).

As populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* continuam a se expandir devido a fatores como resistência a inseticidas e infraestrutura deficiente (Figura 8), baixo nível de informação e desenvolvimento urbano descontrolado (BAGNY; DELATTE; QUILICI; FONTENILLE, 2009; SIMARD; NCHOUTPOUEN; TOTO; FONTENILLE, 2005).

Figura 8- Potencial criadouro artificial de mosquitos do gênero Aedes transmissores de arboviroses

Fonte: Elaborado pelo o autor

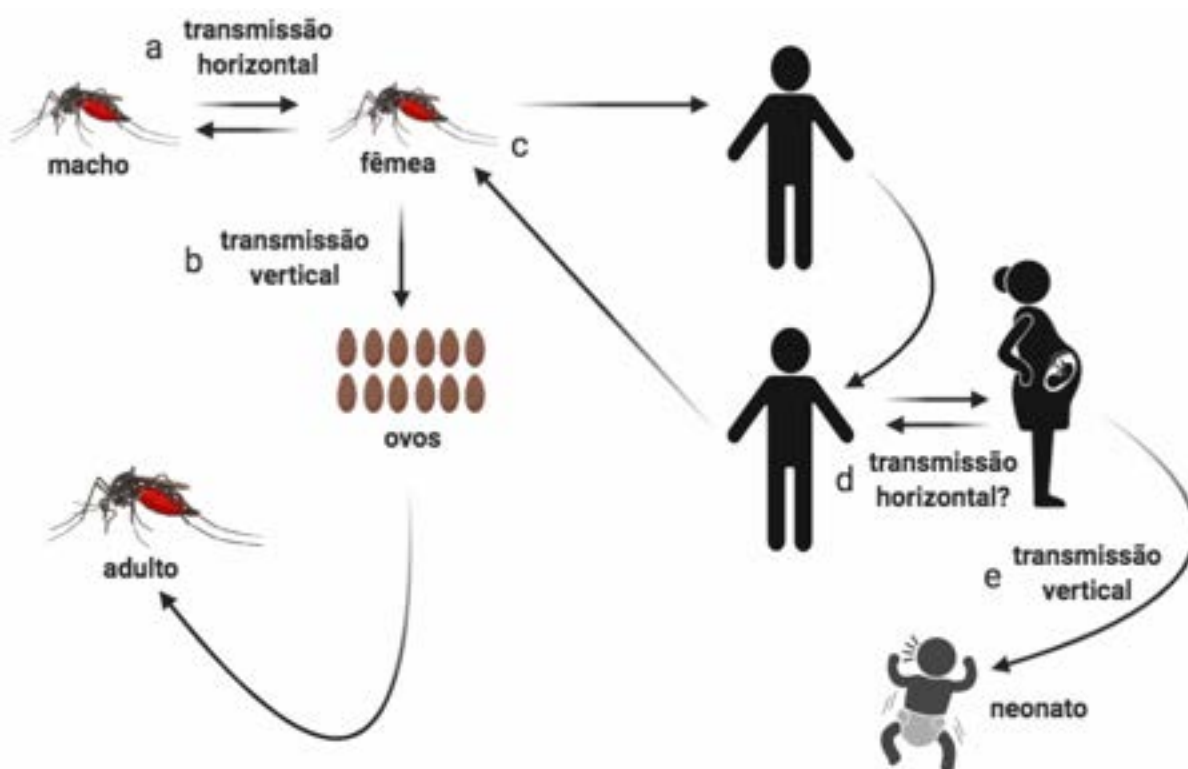
Legenda: Fotografia de um reservatório de água de uma residência em uma comunidade na cidade do Recife sem devida proteção para evitar que mosquitos fizessem oviposição nesse recipiente, com água limpa e parada um potencial criadouro artificial de mosquitos transmissores de arboviroses, como CHIKV. Essa fotografia foi retirada no ano de 2015, o Brasil que já enfrentava problemas anuais com o vírus da Dengue passou nesse ano a enfrentar alto números de casos de infecção por CHIKV e ZIKV.

Embora a maioria das transmissões de CHIKV seja feita por mosquitos, casos de transmissão materno-fetal foram relatados, e o maior risco para essa transmissão parece ser durante o parto (perinatal), o qual pode acarretar doenças graves do sistema nervoso central (SNC) que podem ser fatais (CONTOPOULOS-IOANNIDIS; NEWMAN-LINDSAY; CHOW; LABEAUD, 2018; ECONOMOPOULOU; DOMINGUEZ; HELYNCK; SISSOKO *et al.*, 2009; GERARDIN; BARAU; MICHAULT; BINTNER *et al.*, 2008; GÉRARDIN; SAMPÉRIZ; RAMFUL; BOUMAHNI *et al.*, 2014; RAMFUL; CARBONNIER; PASQUET; BOUHMANI *et al.*, 2007; TORRES; FALLEIROS-ARLANT; DUEÑAS; PLEITEZ-NAVARRETE *et al.*, 2016). Mães que têm uma carga viral alta na placenta são mais propensas a transmitir o vírus, sendo a transmissão relatada em 48,7% dos casos (GERARDIN; BARAU; MICHAULT; BINTNER *et al.*, 2008). A transmissão vertical da mãe para o feto foi relatada pela primeira vez em dez casos na Ilha Reunião em estudo com 84 mulheres grávidas (ROBILLARD; BOUMAHNI; GÉRARDIN; MICHAULT *et al.*, 2006). Touret *et al.* (2006) descreveram três casos de transmissão intraútero do CHIKV entre 12 e 15 semanas de gestação resultando em perdas fetais. O RT-PCR foi positivo no líquido

amniótico dos três fetos, bem como no cérebro e nas placentas e não houve malformações fetais (TOURET; RANDRIANAIVO; MICHAULT; SCHUFFENECKER *et al.*, 2006). Da mesma forma, o vírus foi detectado no leite materno humano, porém sem evidências de transmissão do CHIKV pela amamentação (CAMPOS; ALBUQUERQUE BANDEIRA; DINIZ ROCHA; DIAS *et al.*, 2017).

Assim, como ocorre com outras infecções por arbovírus, existe um risco considerável de transmissão do CHIKV por transfusões de sangue. Níveis de CHIKV capazes de induzir doença foram encontrados no sangue de casos assintomáticos durante a epidemia de 2009 em Songkhla, Tailândia (APPASSAKIJ; KHUNTIKIJ; KEMAPUNMANUS; WUTTHANARUNGSAN *et al.*, 2013). As estimativas do risco de transmissão do vírus foram realizadas durante a epidemia na Ilha da Reunião, indicando um risco médio de 132 casos por 100.000 doações de sangue (BROUARD; BERNILLON; QUATRESOUS; PILLONEL *et al.*, 2008). A detecção de RNA viral em doações de sangue também foi identificada durante surtos na Itália, Tailândia, Caribe e Porto Rico, mas a transmissão clínica da doença por CHIKV nunca foi relatada como resultado de transfusão. Alguns relatos de transmissão durante transplante de órgãos sólidos também foram descritos na literatura, mas sem complicações ou óbito dos transplantados (DALLA GASPERINA; BALSAMO; GARAVAGLIA; ROVIDA *et al.*, 2015; FORESTO; SANTOS; HAZIN; LEYTON *et al.*, 2019; GIRÃO; RODRIGUES DOS SANTOS; DO AMARAL; COSTA *et al.*, 2017; KEE; YANG; TAMBYAH, 2010).

Além disso, o CHIKV foi detectado no sêmen 30 dias após o início dos sintomas (BANDEIRA; CAMPOS; ROCHA; SOUZA *et al.*, 2016), indicando a possível transmissão sexual, muito embora nunca relatada. De modo semelhante, o RNA viral permanece detectável no tecido sinovial e muscular por até 1,5 meses após a infecção e no tecido linfóide por até 3 meses (LABADIE; LARCHER; JOUBERT; MANNIOUI *et al.*, 2010), indicando possível latência do vírus no organismo. A figura seguinte (Figura 9), resume as principais formas de transmissão do CHIKV no ciclo urbano, que embora aconteçam, principalmente, por mosquitos, podem ocorrer de formas secundárias como já relatadas na literatura.

Figura 9- Resumo das formas de transmissão e amplificação do CHIKV no ciclo urbano

Elaborado pelo autor.

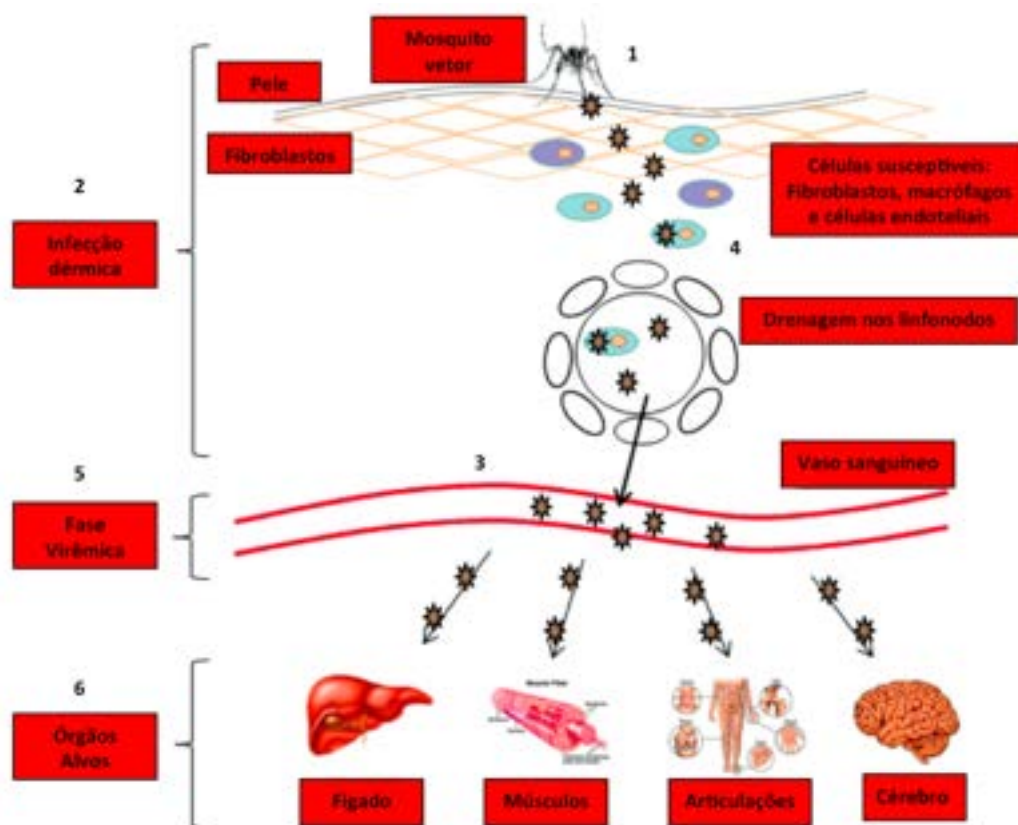
Legenda: (A) Esquema representativo da transmissão horizontal entre vetores artrópodes do CHIKV; (B) Transmissão vertical dentro dos vetores, com infecção dos ovos de mosquitos; (C) Transmissão a um ser humano suscetível por meio da picada do mosquito infectado, onde o humano infectado se torna apto a infectar outros mosquitos, também tem sido levantada a possibilidade de transmissão via doação de tecidos; (D) Transmissão horizontal em humanos ainda não foi descrita, no entanto o vírus já foi encontrado no sêmem; (E) Transmissão vertical em humanos, a transmissão materno fetal já foi observada, embora mais comum durante o parto, há relatos de infecção intrauterina e que pode provocar o abortamento ou consequências graves para o neonato (complicações neurológicas).

2.4 Ciclo de replicação na célula do hospedeiro

Após a inoculação subcutânea através da picada de um mosquito infectado, acredita-se que as partículas de CHIKV sejam liberadas na derme (Figura 10), os vírus então infectam células residentes, como queratinócitos, melanócitos e fibroblastos dérmicos, as quais desencadeiam uma resposta imune inicial do hospedeiro (COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE; DISSON *et al.*, 2008; PUIPROM; MORALES VARGAS; POTIWAT; CHAICHANA *et al.*, 2013; SCHILTE; COUDERC; CHRETIEN; SOURISSEAU *et al.*, 2010). No entanto, foi postulado que o CHIKV interage com células dendríticas residentes, incluindo células de Langerhans, e desta forma o vírus acessa os capilares subcutâneos e se dissemina através dos gânglios linfáticos e da microvasculatura (RAMASUBRAMANIAN;

BARHAM; SWAMINATHAN, 2008). Dentro de 2 a 4 dias após a infecção, o vírus atinge o sangue e se espalha para outras partes do corpo. Os locais primários da replicação viral são os músculos, o fígado, o baço, o coração e os gânglios linfáticos, permitindo assim uma viremia eficiente e demonstrando sua capacidade de replicação em vários tipos celulares durante a fase aguda (HIGGS; ZIEGLER, 2010; LABADIE; LARCHER; JOUBERT; MANNIOUI *et al.*, 2010). Durante o período virêmico agudo de 7 a 12 dias após a infecção, a carga viral pode atingir 10^9 a 10^{12} partículas virais por mililitro (mL) (CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE; DISSON *et al.*, 2008; KAM; ONG; RÉNIA; TONG *et al.*, 2009; NAZE; LE ROUX; SCHUFFENECKER; ZELLER *et al.*, 2009; NG; TAN; TAN; TAN *et al.*, 2009; PUIPROM; MORALES VARGAS; POTIWAT; CHAICHANA *et al.*, 2013; SCHILTE; COUDERC; CHRETIEN; SOURISSEAU *et al.*, 2010).

Figura 10- Processo de infecção e disseminação do CHIKV no hospedeiro



Fonte: Adaptado pelo autor de Caglioti; Lalle; Castilletti; Carletti *et al.*, (2013)

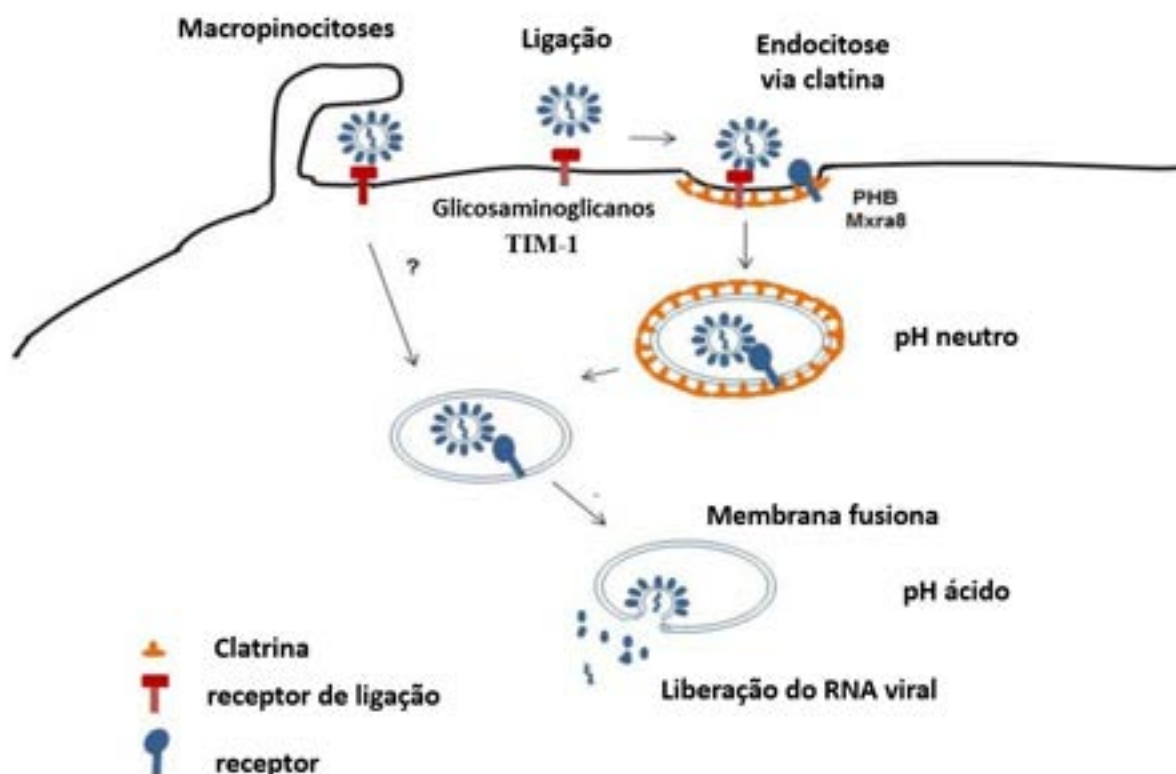
Legenda: A infecção por CHIKV tem início pela picada de um mosquito infectado que inocula o vírus na derme do hospedeiro (1). Então, ocorre uma replicação inicial do vírus no interior de fibroblastos dérmicos e células residentes (2). A picada do mosquito também pode levar à inoculação direta do vírus na circulação sanguínea (3). O vírus se dissemina para os gânglios linfáticos (4) e é liberado para a circulação sanguínea (5). Finalmente, ocorre a disseminação do vírus para os órgãos periféricos, como fígado, baço, músculo, bem como para o cérebro e articulações (6).

A observação de que o CHIKV atinge um título alto em um período de tempo relativamente curto é sugestiva de replicação nos leucócitos sanguíneos (HER; MALLERET; CHAN; ONG *et al.*, 2010). O tropismo do vírus foi extensivamente analisado por estudos *in vitro*, nos quais os resultados obtidos mostraram que a infecciosidade das cepas IOL, WA e ESCA em múltiplas linhagens celulares é semelhante e apresentam um tropismo comparável (SOLIGNAT; GAY; HIGGS; BRIANT *et al.*, 2009; SOURISSEAU; SCHILTE; CASARTELLI; TROUILLET; GUIVEL-BENHASSINE; RUDNICKA; SOL-FOULON; LE ROUX; PREVOST; FSIHI; FRENKIEL; BLANCHET; AFONSO; CECCALDI; OZDEN; GESSAIN; SCHUFFENECKER; VERHASSELT; ZAMBORLINI; SAIB *et al.*, 2007; WIKAN; SAKOONWATANYOO; UBOL; YOKSAN *et al.*, 2012).

O primeiro passo na infecção envolve a ligação do vírus a um receptor da célula hospedeira. As glicoproteínas de membrana que estão associadas como trímeros de

heterodímeros (E2-E1) na superfície viral medeiam a entrada na célula. Tanto o domínio A quanto o domínio B da proteína E2 contêm locais de ligação a receptores putativos (LI; JOSE; XIANG; KUHN *et al.*, 2010; VOSS; VANEY; DUQUERROY; VONRHEIN *et al.*, 2010). Além disso, a análise bioinformática revelou que o domínio B da proteína E2 contém um motivo de ligação à PDZ classe III (ASNET MARY; PARAMASIVAN; TYAGI; SURENDER *et al.*, 2013). Esses motivos foram descritos como mediadores de interações proteína-proteína (YAN; VASUDEVAN; NGUYEN; BORK *et al.*, 2007; YE; ZHANG, 2013). O domínio E2 B dissocia-se do domínio E1 II, o que expõe a alça de fusão (LI; JOSE; XIANG; KUHN *et al.*, 2010).

A via de entrada celular de *Semliki Forest Virus* (SFV), SINV e *Venezuelanequineencephalitisvirus* (VEEV) é bem estudada, no entanto, poucos dados foram publicados sobre esse processo para o CHIKV. Muito embora os estudos publicados até o momento sugerem que os mecanismos moleculares envolvidos na fusão sejam conservados entre os alfavírus (VAN DUIJL-RICHTER; BLIJLEVEN; VAN OIJEN; SMIT, 2015; VOSS; VANEY; DUQUERROY; VONRHEIN *et al.*, 2010; ZENG; MUKHOPADHYAY; BROOKS, 2015), os receptores envolvidos com a infecção do CHIKV ainda não são completamente compreendidos. Dados robustos sobre a importância da molécula de adesão, MXRA8, para a infecção foram recentemente publicados, com resolução da estrutura cristalográfica dessa molécula. Todavia alguns outros candidatos foram apenas sugeridos e precisam ser melhores investigados como as proibitinas (PHB), glicosaminoglicanos, imunoglobulina da célula T da glicoproteína de superfície celular e a mucina 1 (TIM-1), fosfatidilserinas, integrinas e proteína de choque térmico (Figura 11) (APTE-DESHPANDE; PAINGANKAR; GOKHALE; DEOBAGKAR, 2014; BASORE; KIM; NELSON; ZHANG *et al.*, 2019; FRAISIER; KORAKA; BELGHAZI; BAKLI *et al.*, 2014; MOLLER-TANK; KONDRATOWICZ; DAVEY; RENNERT *et al.*, 2013; VAN DUIJL-RICHTER; HOORNWEG; RODENHUIS-ZYBERT; SMIT, 2015; WINTACHAI; WIKAN; KUADKITKAN; JAIMIPUK *et al.*, 2012; ZHANG; KIM; FOX; NAIR *et al.*, 2018).

Figura 11- Ilustração esquemática de possíveis forma de entrada do vírus CHIKV na célula hospedeira

Fonte: Adaptado pelo autor de Schnierle, (2019).

Nota: A endocitose viral via clatrina é bem estabelecida na literatura. A molécula de adesão MXRA8 foi implicada como um importante receptor para o CHIKV e outros alfavírus. Outros candidatos foram sugeridos, proibirinas (PHB), imunoglobulina da célula T da glicoproteína de superfície celular e a mucina 1 (TIM-1) e glicosaminoglicanos. A possibilidade da captação inespecífica do vírus por meio da macropinocitose, que são protuberâncias da membrana celular que pode internalizar partículas do meio extracelular, também tem sido levantada.

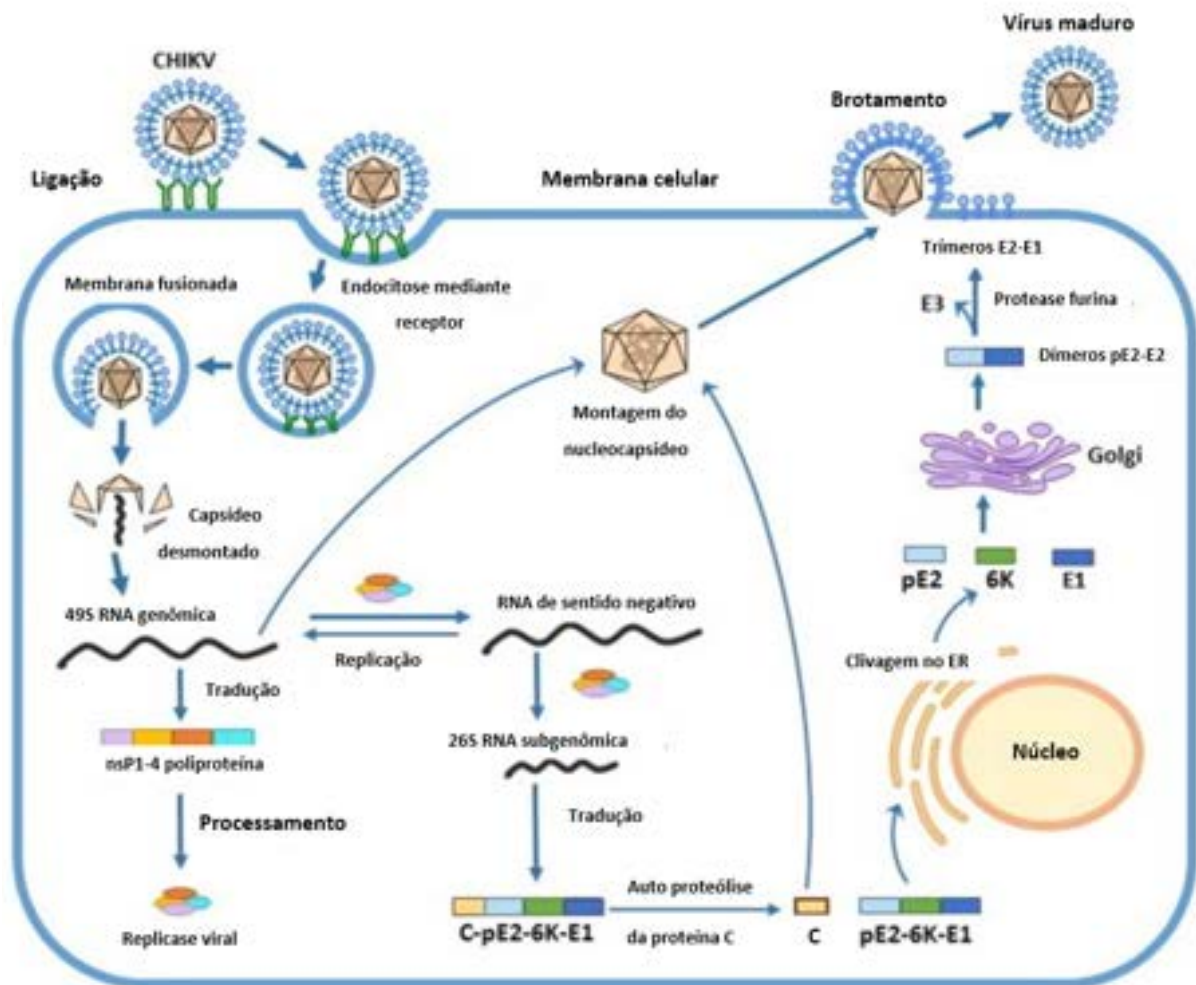
Após a interação vírus-receptor, os alfavírus geralmente entram nas células via endocitose mediada por clatrina (HOORNWEG; VAN DUIJL-RICHTER; AYALA NUÑEZ; ALBULESCU *et al.*, 2016), embora também tenha sido descrita a fusão direta com a membrana plasmática para o SINV (PAREDES; FERREIRA; HORTON; SAAD *et al.*, 2004; VANCINI; WANG; FERREIRA; HERNANDEZ *et al.*, 2013). A invaginação e cisão da membrana para formar uma vesícula revestida com clatrina que contém vírus ocorre através de uma interação complexa de várias proteínas, incluindo a proteína adaptadora 2, dinamina, clatrina, epsina e Eps15 (KIRCHHAUSEN; OWEN; HARRISON, 2014). A vesícula revestida por clatrina é transportada e no citoplasma as moléculas de clatrina se dissociam e os vírus ficam reclusos aos endossomos. O ambiente de pH baixo dos endossomos provoca rearranjos conformacionais nas glicoproteínas do envelope E1/E2 para mediar a fusão da membrana viral com a membrana endossômica. Em seguida, a estrutura viral é desfeita e o

RNA viral liberado no citosol (SINGH; HELENIUS, 1992; VAN DUIJL-RICHTER; BLIJLEVEN; VAN OIJEN; SMIT, 2015).

Os macropinosomas que são grandes vesículas não revestidas envolvidas na captação inespecífica de material extracelular foram recentemente implicados como uma via alternativa de entrada do CHIKV em células musculares humanas (Figura 11) (LEE; MOHAMED HUSSAIN; CHU, 2019). Sua formação é dependente da actina e é iniciada pela estimulação dos receptores de fator de crescimento pelo vírus. Isso resulta na transdução de sinal nas células hospedeiras e na polarização do filamento de actina, que forma projeções na membrana celular. Algumas dessas projeções se dobras, formando espécies de bolsões que se fundem com a outras partes da membrana celular, formando macropinosomas que podem levar para o interior da célula vírus (MERCER; HELENIUS, 2009).

A replicação do vírus então ocorre dentro do citoplasma, associada a vacúolos citopáticos formados a partir do rearranjo das membranas hospedeiras (RUPP; SOKOLOSKI; GEBHART; HARDY, 2015). Ao sequestrar o mecanismo de tradução do hospedeiro, o genoma de CHIKV é traduzido diretamente para produzir a poliproteína precursora não estrutural P1234, que é clivada pela protease viral nsP2 em P123 e nsP4. Juntos, nsP123 e nsP4, presumivelmente com proteínas hospedeiras, formam o complexo de replicação viral que servem de molde para a síntese das regiões subgenômicas 26S e 49S (Figura 12)(SOLIGNAT; GAY; HIGGS; BRIANT *et al.*, 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994). O RNA subgenômico dirige a expressão do precursor das proteínas estruturais C-pE2-6K-E1 (poliproteína longa), a qual é processada pós-tradução e clivada em C, E1, 6K e pE2 (SOLIGNAT; GAY; HIGGS; BRIANT *et al.*, 2009). Um total de 240 cópias da proteína C se associa a uma molécula de RNA genômico recém-sintetizada para formar um nucleocápsideo do CHIKV no citoplasma da célula hospedeira. A E1 e a pE2 interagem para formar heterodímeros que subsequentemente se trimerizam em um pico viral no retículo endoplasmático (RE). A glicoproteína pE2 é então clivada em E2 e E3 pela furina celular durante o transporte do ambiente ácido do Golgi e dos endossomos iniciais para o ambiente de pH neutro da superfície celular, liberando E3. Então ocorre o surgimento do vírus na membrana celular, onde o nucleocápsideo é envolvido por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, acompanhada de heterodímeros das proteínas do envelope E1 e E2, que por sua vez são montadas em trímeros para formar 80 espículas, dispostos em um icosaédrico T=4 (MELANCON; GAROFF, 1987). Nesta fase, a partícula viral completa, ou vírion, está pronta para ser liberada para o meio extracelular e infectar células vizinhas (Figura 12) (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012; SOLIGNAT; GAY; HIGGS; BRIANT *et al.*, 2009).

Figura 12- Ciclo de replicação do CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de Abdelnabi; Neyts; Delang, (2015).

Nota: O ciclo de replicação viral começa com a ligação da partícula do vírus a um dos fatores ou receptores de ligação expressos na superfície celular (1); Posteriormente, o vírus é internalizado via endocitose mediada por clatrina (2); Então, as moléculas de clatrina se dissociam da vesícula e o vírus é entregue aos endossomos e dentro do lúmen levemente ácido do endossomo, as glicoproteínas virais E2 e E1 sofrem grandes alterações conformacionais que levam à fusão da membrana (3); Posteriormente, o nucleocapsídeo é liberado e desmontado no citosol (4); O genoma viral é traduzido e replicado (5); A proteína C se junta a uma fita de RNA e há a montagem do nucleocapsídeo (6); As glicoproteínas sofrem processamento celular e se tornam maduras e prontas para compor o envelope viral (7); Na superfície da célula o nucleocapsídeo adquire o envelope (trímeros de E1-E2 e bicamada lipídica) quando acontece brotamento da célula e ocorre liberação da partícula viral madura. A replicação ocorre rapidamente (~4 h).

Além das proteínas virais, proteínas do hospedeiro se mostram importantes para o ciclo de replicação do CHIKV. Trabalho de Torii e colaboradores (2020) utilizando análises de co-immunoprecipitação revelaram que proteínas estruturais e não estruturais de CHIKV interagem com o substrato tirosina-quinase regulado pelo fator de crescimento de hepatócitos. Também foi observado que o substrato tirosina-quinase se co-localiza com a proteína E2 do CHIKV e com o dsRNA, um marcador do genoma do CHIKV replicado. Os resultados das

análises de *knockdown* de genes indicaram que, juntamente com proteínas de transporte, o substrato tirosina-quinase facilita a replicação do genoma e as etapas pós-traducionais durante a infecção pelo CHIKV, assim como de outros vírus da mesma família (TORII; ORBA; SASAKI; TABATA *et al.*, 2020).

2.5 Resposta imune do hospedeiro

A resposta imune à infecção pelo CHIKV, envolve imunidade inata e adaptativa. A resposta imune inata contra vírus consiste em macrófagos, células dendríticas (DCs) e células *natural killer* (NKs) e é seguida pela ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos B e T. A geração subsequente de células de memória leva a uma resposta específica à infecção viral e protege da reinfeção (TANABE; TANABE; SANTOS; MARTINS *et al.*, 2018).

2.5.1 Fase aguda da doença (≤ 3 meses após o início da infecção)

A primeira fase da infecção pelo CHIKV é típica da infecção viral aguda, com uma resposta precoce do interferon do tipo 1 (IFN-I), a partir do reconhecimento do vírus por receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-associated molecular pattern*) que reconhecem motivos moleculares conservados no vírus expostos a receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) do hospedeiro (CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; HOARAU; JAFFAR BANDJEE; KREJBICH TROTOT; DAS *et al.*, 2010; KELVIN; BANNER; SILVI; MORO *et al.*, 2011). A produção de IFN-I acontece principalmente, através da ativação de leucócitos e fibroblastos (SCHILTE; BUCKWALTER; LAIRD; DIAMOND *et al.*, 2012). Os PRRs do hospedeiro, incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptor*), encontrados na membrana plasmática e no endossomo, receptores citoplasmáticos do tipo Genes indutores de ácido retinóico – I (RIG-I *Retinoic Acid-inducible Gene I*) e Proteína Associada à Diferenciação de Melanoma (MDA5) podem ser acionados pelo genoma do RNA de CHIKV. Esses receptores celulares então ativam moléculas adaptadoras (por exemplo, TRIF, MyD88, e MAVS) que resulta na produção de interferons do tipo 1, interferon- α (IFN- α) e interferon- β (IFN- β), e outros mediadores imunes que então desencadeiam o estado antiviral com o intuito de eliminar o patógeno (COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE; DISSON *et al.*, 2008; GASQUE; COUDERC; LECUIT; ROQUES *et al.*, 2015; HER; MALLERET; CHAN; ONG *et al.*, 2010; SANCHEZ DAVID; COMBREDT; SISMEIRO; DILLIES *et al.*, 2016; TAMURA;

YANAI; SAVITSKY; TANIGUCHI, 2008; WHITE; SALI; ALVARADO; GATTI *et al.*, 2011).

A existência de um efeito protetor potencial do IFN- α e do IFN- β tem sido observado, com os níveis aumentados em pacientes que controlaram a infecção e eliminaram o vírus. Por outro lado, pacientes com produção deficiente de IFN são mais suscetíveis ao vírus e correm maior risco de desenvolver infecção grave. Esse papel protetor dos IFNs-I acontece pela consequente indução da transcrição de genes estimulados por interferons (ISGs), que são cruciais para a resposta antiviral e que contêm elementos promotores sensíveis ao IFN (SCHILTE; COUDERC; CHRETIEN; SOURISSEAU *et al.*, 2010; WAHID; ALI; RAFIQUE; IDREES, 2017). A análise de sequenciamento de RNA (RNASeq) da infecção aguda pelo CHIKV em um modelo de camundongo revelou que aproximadamente metade de todos os genes regulados após a infecção são ISGs (WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011; WILSON; PROW; SCHRODER; ELLIS *et al.*, 2017).

O IFN- α é detectado logo no primeiro dia de infecção e sua concentração está correlacionada com a carga viral plasmática, que é significativamente maior em pacientes idosos (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007). No entanto, as concentrações plasmáticas de citocinas Th1 e Th2 permanecem baixas (CHAAITANYA; MURUGANANDAM; SUNDARAM; KAWALEKAR *et al.*, 2011; CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; HOARAU; JAFFAR BANDJEE; KREJBICH TROTOT; DAS *et al.*, 2010; KELVIN; BANNER; SILVI; MORO *et al.*, 2011; WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011), apesar da observação de Hoarau *et al.* (2010) de que os níveis de interferon γ (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) eram altos em pacientes da Ilha de Reunião (HOARAU; JAFFAR BANDJEE; KREJBICH TROTOT; DAS *et al.*, 2010). Wauquier *et al.* (2011) também relataram superprodução de IFN- γ , juntamente com IFN- α , durante a fase aguda (WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011). Chow *et al.* (2011) mostraram, em Singapura, que o IFN- α foi produzido por 10 dias antes da depuração viral do plasma, no entanto não detectaram IFN- γ no soro (CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011).

Além de uma potente resposta do IFN-I, o estágio agudo da infecção pelo CHIKV (<21 dias após o início da infecção) está associado a níveis plasmáticos elevados de múltiplos fatores solúveis, incluindo citocinas pró-inflamatórias (IL- 4, IL- 7, IL- 6, IL- 8 e IL- 16), quimiocinas (CCL2, CCL4, CXCL10, CXCL9), citocinas anti inflamatórias (receptor A -IL- 1, IL- 10 e IL- 13), fatores de crescimento, como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF),

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de células-tronco β (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; MARTI-CARVAJAL; RAMON-PARDO; JAVELLE; SIMON *et al.*, 2017; MATHEW; GOYAL; GEORGE; THEKKEMURIYIL *et al.*, 2011; RAVINDRAN; ALIAS, 2017; WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011). Isso resulta em intenso tráfego de monócitos para os tecidos infectados (HER; MALLERET; CHAN; ONG *et al.*, 2010), juntamente com forte ativação de células T CD8⁺ e células *natural killer* (NK) para auxiliar na eliminação do vírus (THANAPATI; DAS; TRIPATHY, 2015; WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011).

As células NK também são importantes para o controle da infecção viral, que agem reconhecendo as células infectadas e induzindo-as à apoptose. Essas células têm um papel crucial no controle da carga viral da fase aguda, onde IFN- γ , pode induzir alta atividade citotóxica nas células NK (JOST; ALTFELD, 2013). Entretanto, as células NK se acumulam nos tecidos musculoesqueléticos logo após a infecção por CHIKV e sua função protetora ou patológica permanece incerta (FOX; DIAMOND, 2016).

A ativação da imunidade adaptativa pode ocorrer com a participação das células T CD8⁺ citotóxicas, que representam um dos principais recursos da imunidade antiviral e são responsáveis pela destruição das células infectadas. A análise dos linfócitos T circulantes mostrou que, em pacientes com infecção aguda, o estágio inicial da doença provocada pelo CHIKV é acompanhada pela ativação e proliferação de linfócitos T CD8⁺ com um pico no dia 1 (WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011). Porcentagens mais altas de células T CD8⁺ ativadas permaneceram no sangue 7 a 10 semanas após a infecção nos pacientes com sintomas de artrite associada a infecção do CHIKV (MINER; COOK; HONG; SMITH *et al.*, 2017).

Sabe-se que a febre durante a infecção aguda por CHIKV é causada principalmente pela presença de citocinas pró-inflamatórias de alto nível, como IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) alfa. Quando a carga viral é controlada, os níveis destas citocinas voltam ao nível basal (KELVIN; BANNER; SILVI; MORO *et al.*, 2011; NG, 2017). Entende-se também que os níveis da carga viral está relacionada às concentrações de IFN- α , IL-1-RA, IL-6, MCP-1/CCL-2, IL-12 e IP-10/CXCL-10 (CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011), IL-18 e IL-18BP (CHIRATHAWORN; RIANTHAVORN; WUTTIRATTANAKOWIT; POOVORAWAN, 2010).

O sistema nervoso central possui uma resposta imunológica particular. O cérebro tem vários métodos para combater a infecção pelo CHIKV. Modelos de camundongos

demonstraram que astrócitos e oligodendrócitos eram particularmente suscetíveis à infecção, enquanto as células microgliais eram mais resistentes (DAS; HOARAU; BANDJEE; MAQUART *et al.*, 2015). Nos astrócitos, o CHIKV induziu apoptose pela via externa da caspase-9. Em resposta ao CHIKV, as células microgliais produziram citocinas e moléculas pró-apoptóticas, incluindo IL-12, IFN- α e TNF- α (VAN DUIJL-RICHTER; HOORNWEG; RODENHUIS-ZYBERT; SMIT, 2015).

Como outros vírus, é possível que o CHIKV tenha desenvolvido mecanismos para modular a resposta imune. A nsP2, por exemplo atua para neutralizar as respostas antivirais das células hospedeiras por meio de múltiplos mecanismos, incluindo o desligamento transcricional geral da célula hospedeira, induzindo a degradação da RNA polimerase II da subunidade Rpb1 (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012), inibição da produção de IFN-I, alterando a via de sinalização JAK/STAT (FROS; LIU; PROW; GEERTSEMA *et al.*, 2010; FROS; VAN DER MATEN; VLAK; PIJLMAN, 2013) e indução de autofagia (JUDITH; MOSTOWY; BOURAI; GANGNEUX *et al.*, 2013). O trabalho conduzido por Bae e colaboradores, buscou elucidar ainda mais o papel das proteínas virais na modulação da resposta do IFN-I. Este estudo concluiu que nsP2, E2 e E1 do CHIKV suprimiram fortemente a ativação do promotor IFN- β induzido pela via de sinalização do receptor MDA5/RIG-I, sugerindo que essas proteínas são as principais antagonistas contra a indução de IFN- β (BAE; LEE; MYOUNG, 2019).

2.5.2 Fase crônica da doença (> 3 meses após o início da infecção)

O estágio crônico é caracterizado pela persistência de condições artríticas associadas a sequelas de longo prazo, como fadiga e depressão, decorrentes de condições reumáticas anteriores. Durante estágios posteriores da doença, elevações em algumas citocinas foram associadas a doenças em andamento e artralgia persistente, incluindo IL-1Ra, IL-17, IL-6, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, GM-CSF, IFN- α e IL-12 (CHAAITANYA; MURUGANANDAM; SUNDARAM; KAWALEKAR *et al.*, 2011; CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; DUPUIS-MAGUIRAGA; NORET; BRUN; LE GRAND *et al.*, 2012; NORET; HERRERO; RULLI; ROLPH *et al.*, 2012; PHUKLIA; KASISITH; MODHIRAN; RODPAI *et al.*, 2013). Níveis aumentados de CXCL10 e CXCL9 foram associados a doenças mais graves aos 6 meses após a infecção (KELVIN; BANNER; SILVI; MORO *et al.*, 2011). Curiosamente, também foi relatado que pacientes que se recuperaram da doença apresentaram níveis mais altos de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e eotaxina durante o período

de recuperação do que pacientes com manifestações contínuas da doença (DUPUIS-MAGUIRAGA; NORET; BRUN; LE GRAND *et al.*, 2012).

Embora a maioria desses estudos tenha se concentrado em análises sorológicas, o IFN- α , IL-6, MCP-1, IL-8 e MMP2 foram demonstrados na sinóvia de um paciente com artralgia crônica, embora não esteja presente em dois pacientes totalmente recuperados (DUPUIS-MAGUIRAGA; NORET; BRUN; LE GRAND *et al.*, 2012). Infelizmente, muitos dos relatórios sobre perfis de citocinas de pacientes produzem resultados contraditórios, portanto, as significâncias desses achados e seus papéis na patogênese da doença permanecem incertos. Essas disparidades podem refletir diferenças nos pontos de tempo pós-infecção e/ou diferentes técnicas para analisar os níveis de citocinas (DUPUIS-MAGUIRAGA; NORET; BRUN; LE GRAND *et al.*, 2012; NORET; HERRERO; RULLI; ROLPH *et al.*, 2012; WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011).

Os monócitos e macrófagos derivados de monócitos parecem desempenhar um papel central na patologia articular associada ao CHIKV. Durante os surtos de CHIKV, os pacientes geralmente desenvolvem poliartrite como uma síndrome do tipo artrite (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017) nas articulações sinoviais (PHUKLIA; KASISITH; MODHIRAN; RODPAI *et al.*, 2013). O revestimento interno das articulações sinoviais é formado por células sinoviais semelhantes a macrófagos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, e sendo estes últimos conhecidos como importantes para a patogênese da artrite reumatóide (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Semelhante aos osteoblastos humanos primários (NORET; HERRERO; RULLI; ROLPH *et al.*, 2012), culturas *in vitro* de sinoviócitos primários do tipo fibroblastos humanos são suscetíveis à infecção pelo CHIKV, o que resulta na secreção de IL-6, IL-8, CCL2/MCP-1 e RANKL pelas células infectadas. Os sobrenadantes desses sinoviócitos infectados com CHIKV induzem migração de monócitos, bem como diferenciação de monócitos/macrófagos em células do tipo osteoclastos que produzem altos níveis de mediadores de artrite, como interleucina-6 (IL-6) e TNF- α (PHUKLIA; KASISITH; MODHIRAN; RODPAI *et al.*, 2013). Na articulação, as células do tipo osteoclastos podem danificar a estrutura articular e contribuir para a síndrome do tipo artrítico, como foi demonstrado na artrite reumatóide (SCHETT, 2007). A persistência do vírus ou de seus produtos nas células-alvo e o acúmulo de mediadores inflamatórios, como IL-6 e GM-CSF, contribuem para sintomas persistentes e artrite crônica (LAHARIYA; PRADHAN, 2006).

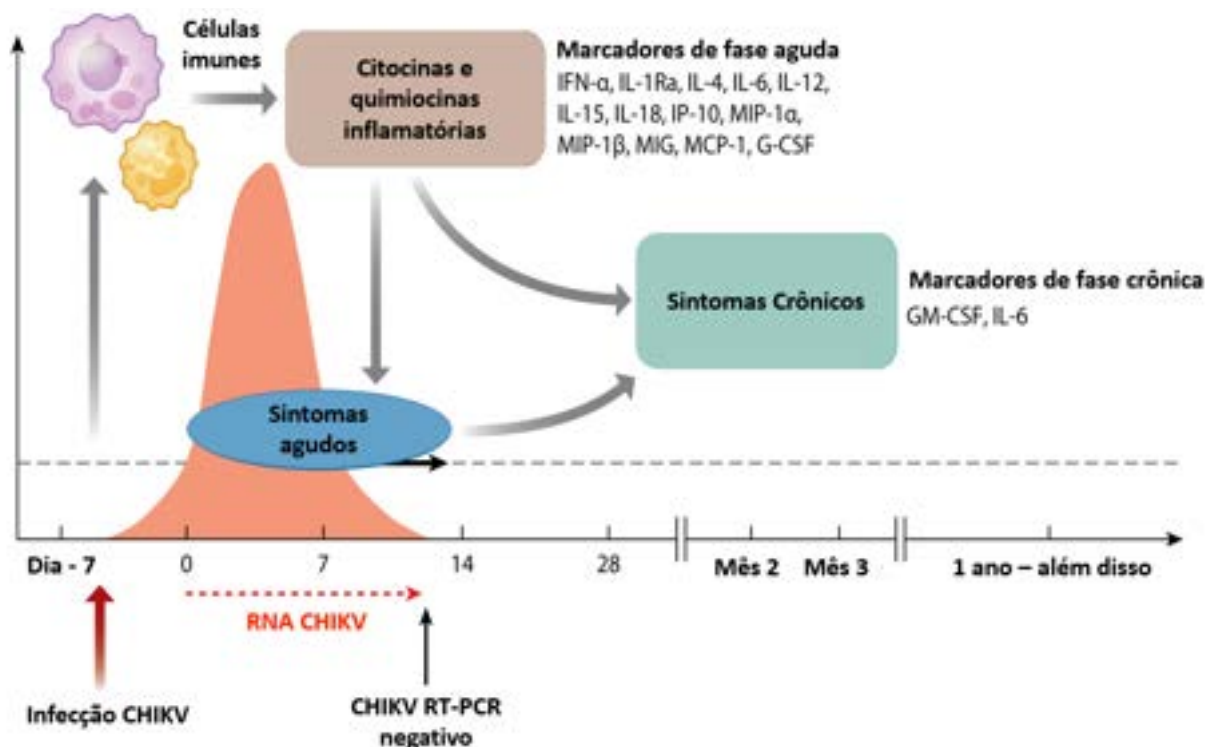
A fase de recuperação parece desempenhar um papel crítico no estabelecimento de doenças crônicas, pelo menos em pacientes de Cingapura. Chow *et al.* encontraram

concentrações mais altas de GM-CSF em pacientes subsequentemente apresentando sintomas crônicos do que naqueles que se recuperaram totalmente e no grupo controle (CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011). Nos seres humanos, a IgG anti-CHIKV é detectada pela primeira vez no estágio inicial de convalescença, quando a resposta IgG adquirida naturalmente é dominada pelos anticorpos do subtipo IgG3. O aparecimento precoce desses anticorpos se correlaciona com a proteção contra complicações do quadro crônico provocado pelo CHIKV (KAM; SIMARMATA; CHOW; HER *et al.*, 2012).

As células T CD8⁺ são encontradas em erupções cutâneas em pacientes agudos, enquanto as células T CD4⁺ constituem a maioria em derrames sinoviais em pacientes crônicos (PARDIGON, 2009). Essa evidência foi apoiada por experimentos realizados por Wauguier *et al.*, (2011) que relataram uma ativação das células T CD8⁺ no início da infecção, seguida pela apoptose induzida por CHIKV das células T CD4⁺, com partes posteriores do estágio agudo demonstrando maior contagem de células T CD4⁺ (WAUQUIER; BECQUART; NKOGHE; PADILLA *et al.*, 2011). Outro estudo, demonstrou que o CHIKV estabelece e mantém uma infecção persistente no tecido associado à articulação, em parte, evitando a imunidade antiviral das células T CD8⁺ (DAVENPORT; BULLOCK; MCCARTHY; HAWMAN *et al.*, 2020). Também foi observado em outro trabalho que a infecção de camundongos com CHIKV, induziu o recrutamento de monócitos e neutrófilos e esse influxo prejudicou as respostas das células B à infecção pelo CHIKV via Irf5, Nos2 e Nox2 dependente de MyD88 (MCCARTHY; REYNOSO; WINKLER; MACK *et al.*, 2020).

Há evidências de que a inflamação decorrente da infecção pelo CHIKV tem consequências para a proliferação e função dos osteoblastos e osteoclastos, o que pode contribuir para os efeitos crônicos do CHIKV. Várias das citocinas associadas à infecção, como TNF- α , IL-6 e IL-1, promovem a atividade osteoclástica e foram associadas à osteoclastogênese (CHEN; FOO; SIMS; HERRERO *et al.*, 2015). Com a finalidade de resumir as informações apresentadas sobre o quadro imune que pode se fazer presente durante a infecção por CHIKV, adaptamos a figura abaixo (Figura 13).

Figura 13- Assinaturas imunes de infecção e inflamação pelo CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de Ng, (2017).

Nota: Apesar de estudos discordantes, dados de diferentes coortes de infecção por CHIKV em várias localizações geográficas desde 2006, apontam assinaturas de mediadores imunológicos para as fases aguda e crônica da doença por CHIKV. Durante a fase aguda, uma assinatura do mediador imune é dominada por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Durante a fase crônica, a assinatura difere da artrite reumatóide pela ausência de TNF- α .

A proteção cruzada entre alfavírus foi documentada em modelos animais (GARDNER; ANRAKU; LE; LARCHER *et al.*, 2010; PARTIDOS; PAYKEL; WEGER; BORLAND *et al.*, 2012) e humanos após infecção natural (BLACKBURN; BESSELAAR; GIBSON, 1995) ou vacinação sequencial (MCCLAIN; PITTMAN; RAMSBURG; NELSON *et al.*, 1998). Além da proteção cruzada, existem dados limitados sobre o potencial de aprimoramento dependente de anticorpos (ADE, *AntibodyDependentEnhancement*) de infecções por alfavírus, com estudos *in vitro* de RRV (LIDBURY; MAHALINGAM, 2000; LINN; AASKOV; SUHRBIER, 1996) e SINV (FLYNN; OLMSTED; MACKENZIE; JOHNSTON, 1988) sugerindo ADE de alfavírus com baixos títulos de anticorpos. Em camundongos imunizados contra CHIKV, baixos títulos de IgG aumentaram a infecção por CHIKV (HALLENGÄRD; KAKOULIDOU; LULLA; KÜMMERER *et al.*, 2014; LUM; COUDERC; CHIA; ONG *et al.*, 2018), mas os anticorpos induzidos pela vacina após a vacinação com RRV não aumentaram a infecção por CHIKV ou RRV, mesmo em baixos

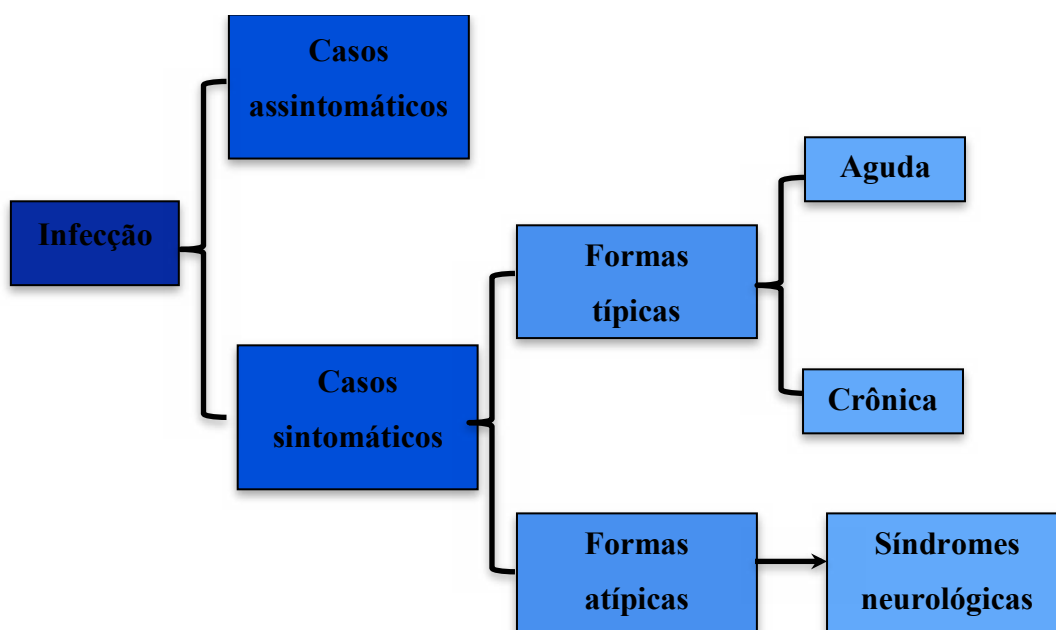
títulos (HOLZER; COULIBALY; AICHINGER; SAVIDIS-DACHO *et al.*, 2011). A ADE resultante de exposições anteriores a alfavírus não foi documentada em infecções humanas (LINN; AASKOV; SUHRBIER, 1996), e o significado clínico desses achados experimentais permanece incerto.

2.6 Sinais e Sintomas Clínicos

Na maioria dos casos, os sintomas permanecem por cerca de 4-7 dias como uma doença auto-limitada e são seguidos de uma recuperação completa do paciente. Uma revisão sistemática recente revelou que a infecção pelo CHIKV assintomática apresentava uma variabilidade muito alta em porcentagens que variaram de 3,2% em La Réunion (2005–2006) para 82,1% nas Filipinas (2012-2013) (BUSTOS CARRILLO; GORDON; HARRIS, 2019). Entretanto, a literatura, na maioria dos casos, aponta que ao contrário de muitas infecções arbovirais, como DENV e ZIKV, a maioria das infecções por CHIKV é sintomática (80 a 97%) (BURT; ROLPH; RULLI; MAHALINGAM *et al.*, 2012; GÉRARDIN; GUERNIER; PERRAU; FIANU *et al.*, 2008; POWERS, 2010; QUEYRIAUX; SIMON; GRANDADAM; MICHEL *et al.*, 2008; SERGON; YAHAYA; BROWN; BEDJA *et al.*, 2007). Embora a taxa de letalidade seja tipicamente <1%, envolvendo principalmente idosos, neonatos e pessoas com doenças pré-existentes, pode estar subestimada em países com poucos recursos e com vigilância limitada (PIALOUX; GAÜZÈRE; JAURÉGUIBERRY; STROBEL, 2007; REZZA; WEAVER, 2019). Além dos impactos diretos à saúde, o gerenciamento médico impõe uma grande carga econômica, juntamente com a perda de produtividade e o absentismo (SOUMAHORO; BOELLE; GAÜZERE; ATSOU *et al.*, 2011).

Geralmente, o período de incubação é de 2 a 10 dias, após picada de mosquito infectado e depois acontece o aparecimento dos sintomas clínicos da doença, que pode ser dividido em fases aguda e crônica (BROUARD; BERNILLON; QUATRESOUS; PILLONEL *et al.*, 2008; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Nas duas próximas seções detalharemos cada uma dessas fases e também os sintomas atípicos, no entanto para que o leitor tenha uma visão geral do espectro clínico provocado pelo CHIKV, elaboramos a figura abaixo.

Figura 14- Resumo do espectro clínico da infecção por CHIKV

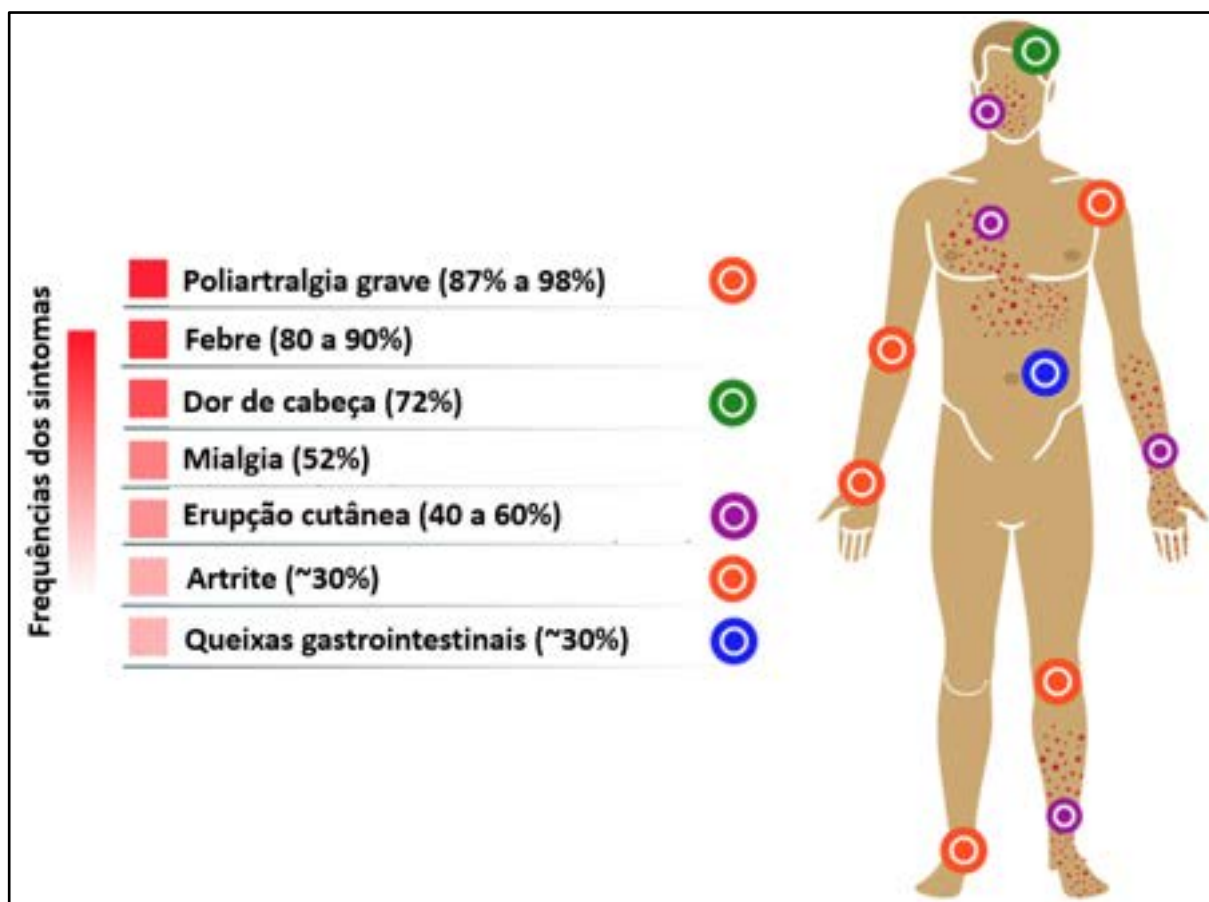


Fonte: Elaborado pelo o autor

2.6.1 Fase Aguda (primeiras três semanas)

A fase aguda da infecção pelo CHIKV, pode ser subdividida em estágios virais (antes do quinto dia após o início da doença) e de convalescença (dias 5-14)(SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A tríade clássica durante o estágio agudo da infecção por esse vírus inclui uma doença febril de início abrupto, artralgias graves, muitas vezes debilitantes, e erupção cutânea (Figura 15) (BURT; CHEN; MINER; LENSCHOW *et al.*, 2017).

Figura 15- Sintomas comuns na fase aguda da infecção por CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de Tanabe; Tanabe; Santos; Martins *et al.*, (2018)

Nota: Normalmente, os sintomas clínicos na fase aguda da doença incluem febre alta, dor e inchaço nas articulações, mialgia e erupção cutânea, geralmente acompanhada de dor de cabeça e fadiga. As porcentagens apresentadas (podem variar na literatura) foram baseadas em estudos descritos nesta sessão.

A febre alta (39° a 40°C) ocorre na maioria dos casos (80 a 90%) (ECONOMOPOULOU; DOMINGUEZ; HELYNCK; SISSOKO *et al.*, 2009). Uma poliartralgia grave e incapacitante que ocorre quase que concomitante ao quadro febril é o sintoma mais característico da fase aguda, é relatada em 87% a 98% dos casos (LINDSEY; STAPLES; FISCHER, 2018). O envolvimento articular é bilateral, embora nem sempre simétrico, e geralmente envolve os joelhos, tornozelos e articulações das extremidades superiores (articulações metacarpofalângicas, interfalângicas e metatarsais, cotovelos e ombros) (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007; KULARATNE; GIHAN; WEERASINGHE; GUNASENA, 2009; STAIKOWSKY; TALARMIN; GRIVARD; SOUAB *et al.*, 2009; THIBERVILLE; BOISSON; GAUDART; SIMON *et al.*, 2013). Artrite com inchaço e sensibilidade nas articulações ocorre em ~30% dos casos (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007; JAIN; NAYAK; TANWAR; GAIND *et al.*, 2017; STAIKOWSKY; TALARMIN; GRIVARD; SOUAB *et al.*,

2009). Já foi relatado que a presença de febre alta e artralgia concomitantes tem uma especificidade de 99,6% e valor preditivo positivo de 84,6% para o diagnóstico de infecção por CHIKV (HASSAN; RAHMAN; MONIRUZZAMAN; RAHIM *et al.*, 2014).

A erupção cutânea se desenvolve em 40 a 60% dos casos e são geralmente maculopapulares e podem ser pruriginosas, embora lesões bolhosas e purpúricas também tenham sido relatadas (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007; DANIS-LOZANO; DÍAZ-GONZÁLEZ; TRUJILLO-MURILLO; CABALLERO-SOSA *et al.*, 2017; LINDSEY; STAPLES; FISCHER, 2018; POWERS, 2010; STAIKOWSKY; TALARMIN; GRIVARD; SOUAB *et al.*, 2009; TAUBITZ; CRAMER; KAPAUN; PFEFFER *et al.*, 2007; WEAVER; FORRESTER, 2015; WEAVER; LECUIT, 2015). Dor de cabeça, mialgia e queixas gastrointestinais, como anorexia, náusea, vômito e dor abdominal, também são comumente relatadas em casos de chikungunya (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007; DANIS-LOZANO; DÍAZ-GONZÁLEZ; TRUJILLO-MURILLO; CABALLERO-SOSA *et al.*, 2017; RAY; RATAGIRI; KABRA; LODHA *et al.*, 2012; STAIKOWSKY; TALARMIN; GRIVARD; SOUAB *et al.*, 2009; THIBERVILLE; BOISSON; GAUDART; SIMON *et al.*, 2013). As manifestações oculares podem ocorrer durante a fase aguda com fotofobia, dor retro-orbital e conjuntivite (DE ANDRADE; VENTURA; MELLO FILHO; MAIA *et al.*, 2017). Manifestações hemorrágicas, no entanto, são raras (\pm 5% dos casos) (BORGHERINI; POUBEAU; STAIKOWSKY; LORY *et al.*, 2007; JAIN; NAYAK; TANWAR; GAIND *et al.*, 2017; LEE; CHOW; ZHENG; CARRASCO *et al.*, 2012).

Os resultados dos testes laboratoriais de rotina não são específicos para a chikungunya. Resultados anormais observados nos casos, incluem linfopenia, moderada trombocitopenia, proteínas C reativa elevadas e enzimas hepáticas elevadas são também observados na fase aguda da doença (THIBERVILLE; MOYEN; DUPUIS-MAGUIRAGA; NOUGAIREDE *et al.*, 2013).

A fase aguda é geralmente seguida por uma fase pós-aguda, geralmente a partir da quarta semana até o final do terceiro mês (SIMON; JAVELLE; CABIE; BOUQUILLARD *et al.*, 2015).

2.6.2 Fase Crônica (depois do terceiro mês)

Esta fase é caracterizada pela persistência de eventos inflamatórios iniciais, incluindo artralgia e artrite. Como observado acima, a artralgia aguda debilitante é o sintoma definidor

da doença induzida pelo CHIKV e, embora a dor nas articulações induzida pelo CHIKV seja geralmente mais intensa nos primeiros dias após o início, a resolução da artralgia aguda pode ocorrer muitas vezes durante um período de várias semanas. Historicamente, a fração de pessoas que sofrem de CHIKV persistente era baixa, como ilustrado por um estudo de Brighton e Simson que constatou que 12% dos pacientes com CHIKV apresentavam sintomas persistentes após 3 anos (BRIGHTON; SIMSON, 1984). Contudo, alguns estudos realizados após os surtos do CHIKV na Ilha da Reunião em 2006 e na Itália em 2007 mostraram a persistência de mialgia, astenia e artralgia em 60-67% dos casos de 36 e 12 meses pós-infecção, respectivamente (MORO; GRILLI; CORVETTA; SILVI *et al.*, 2012; SCHILTE; STAIKOWSKY; COUDERC; MADEC *et al.*, 2013). Revisões sistemáticas e metanálises concluíram que 30% e 50% dos pacientes podem sofrer artrite e fadiga debilitantes por anos (EDINGTON; VARJÃO; MELO, 2018; PAIXÃO; RODRIGUES; COSTA; ITAPARICA *et al.*, 2018).

A artralgia afeta múltiplas articulações na maioria dos casos acomete as extremidades como mãos e tornozelos (MORO; GRILLI; CORVETTA; SILVI *et al.*, 2012; SCHILTE; STAIKOWSKY; COUDERC; MADEC *et al.*, 2013). Alguns estudos sugeriram que a artrite crônica associada ao CHIKV é semelhante à artrite reumatóide (ALI OU ALLA; COMBE, 2011; BOUQUILLARD; COMBE, 2009), em parte devido a semelhanças na apresentação clínica e nos resultados laboratoriais. Muitos pacientes atendem aos requisitos estabelecidos pelo American College of Rheumatology para serem diagnosticados com artrite reumatóide (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; MANIMUNDA; VIJAYACHARI; UPPOOR; SUGUNAN *et al.*, 2010). Estudos demonstraram positividade para o fator reumatoide em 13,6-57,1% dos pacientes com artrite crônica associada ao CHIKV (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; CHAAITANYA; MURUGANANDAM; SUNDARAM; KAWALEKAR *et al.*, 2011; CHOPRA; ANURADHA; LAGOO-JOSHI; KUNJIR *et al.*, 2008).

Apesar do exposto, o mecanismo que contribui para a artrite persistente ainda não está bem elucidado. Embora estudos recentes demonstrem que o vírus usa o mecanismo de mimetismo molecular para escapar e evitar respostas imunológicas do hospedeiro (LIN; YEH; LIN; WAN *et al.*, 2011; REDDY; DESAI; KRISHNA; VASANTHAPURAM, 2017). Dois peptídeos da glicoproteína do envelope CHIKV mostraram homologia e semelhança com as proteínas hospedeiras. Essa imitação molecular entre a glicoproteína CHIKV E1 e os componentes humanos do hospedeiro pode ser responsável pela poliartralgia debilitante em pacientes infectados com CHIKV (REDDY; DESAI; KRISHNA; VASANTHAPURAM, 2017). A doença crônica também tem sido associada à replicação persistente do vírus nas

células alvo e/ou ao estabelecimento de um mecanismo inflamatório auto-sustentado que leva ao dano tecidual. Dezoito meses após o início da doença, 40% dos pacientes ainda apresentam IgManti-CHIKV (QUEYRIAUX; SIMON; GRANDADAM; MICHEL *et al.*, 2008). *In vivo*, mostrou-se que macrófagos sinoviais e células musculares satélites contêm RNA ou proteína viral meses após a infecção. No entanto, os mecanismos exatos subjacentes à persistência do CHIKV em santuários de tecidos ainda são pouco compreendidos e mais estudos em modelos animais e investigações clínicas são necessários para resolver esse problema (HOARAU; JAFFAR BANDJEE; KREJBICH TROTOT; DAS *et al.*, 2010).

Além disso, embora a rigidez e a dor articulares recorrentes pareçam ser as principais manifestações da artralgia crônica por CHIKV, houve relatos de doença articular mais grave em pessoas que sofrem de artrites persistentes induzidas por CHIKV, incluindo artrite erosiva (BRIGHTON; SIMSON, 1984; CASTRO-DOMÍNGUEZ; SALMAN-MONTE; OJEDA; CORZO *et al.*, 2019; CHAAITHANYA; MURUGANANDAM; RAGHURAJ; SUGUNAN *et al.*, 2014; JAVELLE; RIBERA; DEGASNE; GAÛZÈRE *et al.*, 2015). Embora os fatores que contribuem para a artralgia crônica induzida pelo CHIKV sejam pouco compreendidos, é evidenciado que o aumento da idade, maiores cargas virais e a gravidade da fase aguda da infecção são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de doença persistente. As cargas virais médias são mais altas entre os neonatos e os idosos, e as cargas virais são mais altas nos casos hospitalizados (HOZ; BAYONA; VILORIA; ACCINI *et al.*, 2015; LAURENT; LE ROUX; GRIVARD; BERTIL *et al.*, 2007; STAIKOWSKY; TALARMIN; GRIVARD; SOUAB *et al.*, 2009; THIBERVILLE; BOISSON; GAUDART; SIMON *et al.*, 2013; WAGGONER; GRESH; VARGAS; BALLESTEROS *et al.*, 2016).

Vários estudos demonstraram que pessoas com mais de 45 anos têm maior probabilidade de desenvolver dor e rigidez nas articulações a longo prazo (JAVELLE; RIBERA; DEGASNE; GAÛZÈRE *et al.*, 2015; MANIMUNDA; VIJAYACHARI; UPPOOR; SUGUNAN *et al.*, 2010; SISSOKO; MALVY; EZZEDINE; RENAULT *et al.*, 2009; THIBERVILLE; BOISSON; GAUDART; SIMON *et al.*, 2013), enquanto Thiberville *et al.*, (2013) verificaram que pessoas com dor articular contínua aos 300 dias pós-infecção apresentaram maior número de articulações afetadas durante o estágio agudo da doença (THIBERVILLE; BOISSON; GAUDART; SIMON *et al.*, 2013). Sintomas articulares persistentes podem ocorrer com mais frequência em mulheres (EDINGTON; VARJÃO; MELO, 2018; VAN AALST; NELEN; GOORHUIS; STIJNIS *et al.*, 2017), em uma metanálise observou uma tendência não significativa em direção a manifestações crônicas mais frequentes após infecções por cepas da linhagem da ECSA (50%) do que após infecções

por cepas da linhagem asiática (36%) (PAIXÃO; RODRIGUES; COSTA; ITAPARICA *et al.*, 2018).

Algumas alterações ósseas significativas podem ser observadas 10 a 18 meses após a infecção, envolvendo o osso subcondral das mãos e pulsos, incluindo as articulações interfalângicas (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; MALVY; EZZEDINE; MAMANI-MATSUDA; AUTRAN *et al.*, 2009; MANIMUNDA; VIJAYACHARI; UPPOOR; SUGUNAN *et al.*, 2010). Exames de ressonância magnética também demonstraram inflamação periosteal bilateral significativa, edema do carpo e sinovite (MALVY; EZZEDINE; MAMANI-MATSUDA; AUTRAN *et al.*, 2009). Outras lesões descritas na ressonância magnética de pacientes com CHIKV incluem derrame articular, tendinite/tenossinovite, edema da medula óssea e erosões ósseas que afetam várias regiões, incluindo mãos, pulsos, joelhos e ombros (ALI OU ALLA; COMBE, 2011; MALVY; EZZEDINE; MAMANI-MATSUDA; AUTRAN *et al.*, 2009; MANIMUNDA; VIJAYACHARI; UPPOOR; SUGUNAN *et al.*, 2010).

2.6.3 Outros sintomas

A epidemia de CHIKV na ilha Reunião, no Oceano Índico, forneceu a primeira evidência de manifestações graves de doenças e morte em adultos que ocorre em 1,5% da população total infectada (ECONOMOPOULOU; DOMINGUEZ; HELYNCK; SISSOKO *et al.*, 2009; RENAULT; BALLEYDIER; D'ORTENZIO; BÂVILLE *et al.*, 2012; SOUMAHORO; BOELLE; GAÜZERE; ATSOU *et al.*, 2011). A maioria dos adultos que sofrem de CHIKV grave são idosos e têm condições médicas subjacentes (QUEYRIAUX; SIMON; GRANDADAM; MICHEL *et al.*, 2008; ROBIN; RAMFUL; LE SEACH'; JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2008). Outras complicações associadas ao CHIKV, do mais comum ao menos comum, incluem insuficiência respiratória, descompensação cardiovascular, meningoencefalite, hepatite aguda grave, efeitos cutâneos graves, outros problemas do sistema nervoso central e insuficiência renal (QUEYRIAUX; SIMON; GRANDADAM; MICHEL *et al.*, 2008; ROBIN; RAMFUL; LE SEACH'; JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2008; SANTHOSH; DASH; PARIDA; KHAN *et al.*, 2008; SIMON; PAULE; OLIVER, 2008). Ainda, a doença pode incluir sequelas como astenia e alterações de humor, que deterioram ainda mais a qualidade de vida do indivíduo (QUEYRIAUX; SIMON; GRANDADAM; MICHEL *et al.*, 2008).

O CHIKV é classificado como um alfavírusartritogênico do Velho Mundo e, portanto, não se esperava que apresentasse característica neurotrópica ou encefalitogênico (POWERS; BRAULT; SHIRAKO; STRAUSS *et al.*, 2001). Todavia, manifestações neurológicas têm sido frequentemente relatadas em vários surtos, com um número crescente de casos com complicações neurológicas após o ressurgimento do CHIKV no Oceano Índico em 2005. O vírus tem sido frequentemente isolado do líquido cefalorraquidiano (MEHTA; GERARDIN; DE BRITO; SOARES *et al.*, 2018). Casos de síndrome de Guillain-Barré e encefalite foram relatados após a infecção pelo CHIKV (AGARWAL; VIBHA; SRIVASTAVA; SHUKLA *et al.*, 2017; CHUSRI; SIRIPAITHON; HIRUNPAT; SILPAPOJAKUL, 2011; LEBRUN; CHADDA; REBOUX; MARTINET *et al.*, 2009; WIELANEK; MONREDON; AMRANI; ROGER *et al.*, 2007), um aumento de 22% na síndrome de Guillain-Barré, que necessitou de apoio respiratório em adultos durante o surto de La Reunião foi relatado (LEBRUN; CHADDA; REBOUX; MARTINET *et al.*, 2009), fenômeno que também foi observado na epidemia 2014-2015 na Polinésia Francesa (OEHLER; FOURNIER; LEPARC-GOFFART; LARRE *et al.*, 2015). O CHIKV e a anti-CHIKVIgM foram detectados no líquido cefalorraquidiano de neonatos humanos e pacientes adultos com encefalopatia (GRIVARD; LE ROUX; LAURENT; FIANU *et al.*, 2007).

As células alvo do CHIKV no cérebro humano permanecem desconhecidas. Estudos em camundongos sugerem que partículas de CHIKV podem entrar no sistema nervoso central através dos espaços de Virchow-Robin e plexos coróides (COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE; DISSON *et al.*, 2008). Posteriormente, a replicação ocorre nas células epiteliais do plexo coróide, leptomeninges e células endoteliais, mas não no parênquima cerebral (DAS; JAFFAR-BANDJEE; HOARAU; KREJBICH TROTOT *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* no entanto, demonstraram que células parenquimatosas, incluindo neurônios, astrócitos, células microgliais e células de neuroblastoma, foram consideradas permissivas para todas as cepas testadas (ECSA, WA e IOL) (ABRAHAM; MUDALIAR; PADMANABHAN; SREEKUMAR, 2013; DAS; JAFFAR-BANDJEE; HOARAU; KREJBICH TROTOT *et al.*, 2010; LIM; CHU, 2014; SOLIGNAT; GAY; HIGGS; BRIANT *et al.*, 2009; WIKAN; SAKOONWATANYOO; UBOL; YOKSAN *et al.*, 2012; WINTACHAI; WIKAN; KUADKITKAN; JAIMIPUK *et al.*, 2012). Porém, ainda não está bem elucidado se a patogênese do sistema nervoso está diretamente ligada à infecção de neurônios e células da glia ou está indiretamente conectado, desencadeando os efeitos imunomediados (VAIRO; HAIDER; KOCK; NTOUMI *et al.*, 2019).

Em recém-nascidos infectados, os sintomas se desenvolvem nos dias 3 a 7 de vida. A infecção neonatal por CHIKV pode levar a febre, erupção cutânea e edema periférico, doenças do tipo sepse, encefalite, convulsões e até morte (FRITEL; ROLLOT; GERARDIN; GAUZERE *et al.*, 2010; GERARDIN; BARAU; MICHAULT; BINTNER *et al.*, 2008; GOPAKUMAR; RAMACHANDRAN, 2012; RAMFUL; CARBONNIER; PASQUET; BOUHMANI *et al.*, 2007; SENANAYAKE; SENANAYAKE; VIDANAGE; GUNASENA *et al.*, 2009; SHENOY; PRADEEP, 2012; TORRES; FALLEIROS-ARLANT; DUEÑAS; PLEITEZ-NAVARRETE *et al.*, 2016; TOURET; RANDRIANAIVO; MICHAULT; SCHUFFENECKER *et al.*, 2006; VILLAMIL-GÓMEZ; ALBA-SILVERA; MENCORAMOS; GONZALEZ-VERGARA *et al.*, 2015). As complicações neurológicas podem ter efeitos graves no desenvolvimento neurológico pós natal, como menor quociente de desenvolvimento aos 2 anos de idade e atraso no desenvolvimento neurológico global moderado a grave (GÉRARDIN; SAMPÉRIZ; RAMFUL; BOUMAHNI *et al.*, 2014).

2.7 Diagnóstico

A infecção por CHIKV pode ser facilmente confundida em vários estágios da doença com outras infecções. O diagnóstico clínico não diferencia de maneira confiável as infecções por CHIKV de outras etiologias, como outros alfavírus (MAYV, ONNV), flavivírus (mais comumente DENV e ZIKV) (Quadro 1) e patógenos não virais, que incluem, entre outros, espécies de *Plasmodium*, *Leptospira*, *Rickettsia* e *Salmonella*. Em situações de cotransmissão de CHIKV com DENV e ZIKV, o diagnóstico presuntivo de chikungunya estava correto em apenas 10 a 40% dos casos (ACEVEDO; WAGGONER; RODRIGUEZ; RIVERA *et al.*, 2017; SILVA; TAURO; KIKUTI; ANJOS *et al.*, 2019; SÁNCHEZ-CARBONEL; TANTALÉAN-YÉPEZ; AGUILAR-LUIS; SILVA-CASO *et al.*, 2018; WAGGONER; GRESH; VARGAS; BALLESTEROS *et al.*, 2016). Os desfechos clínicos desses três vírus são diferentes, portanto, um diagnóstico específico é importante.

Quadro 1- Sinais e sintomas que podem contribuir no diagnóstico diferencial entre dengue, chikungunya e zika.

Sinais e sintomas	Arbovírus		
	Chikungunya	Dengue	Zika
Febre	>38 °C (2–3d ^a)	>38 °C (4–7 ^d)	≤38 °C (1-2 ^d)

Erupção cutânea	++ (d2-d5 ^b)	++ (d4 ^c)	++ (d1-d2 ^d)
Prurido	+ / ++	+ / +++	++ / +++
Mialgia	+	+++	++
Artralgia	+++	+	++
Dor retroorbital	+ / -	+++	+ / -
Conjuntivites	+	+ / -	++ / +++
Sangramento da pele	+ / -	++	+ / -
Inchaço nas articulações	++ / +++	+ / -	+
Dor de cabeça	++	+++	++
Diarréia	+ / -	++	+ / -
Complicações neurológicas	++	+	+++
Linfadenofatia	++	+	+++
Discrasia hemorrágica	+	++	-

^a Duração da febre em dias.

^b Início de erupção cutânea em 50% dos casos.

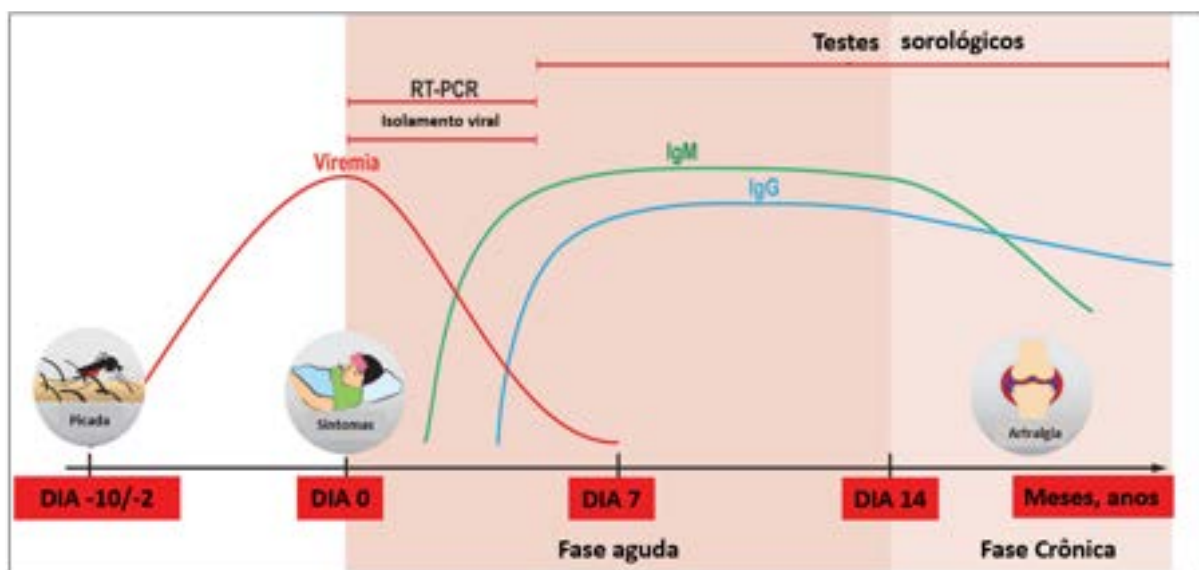
^c Início de erupção cutânea em 30–50% dos casos.

^d Início de erupção cutânea em 100% dos casos.

Fonte: Adaptado pelo autor de Brito; Cordeiro, (2016)

Até o momento, vários métodos diferentes são usados para diagnosticar a infecção pelo CHIKV. Esses métodos são baseados na detecção de (i) RNA viral (PASTORINO; BESSAUD; GRANDADAM; MURRI *et al.*, 2005; PFEFFER; LINSSEN; PARKER; KINNEY, 2002), (ii) anticorpos IgM e IgG contra o vírus ou antígenos virais (JOHNSON; GOODMAN; HOLLOWAY; DE SALAZAR *et al.*, 2016; JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016; KASHYAP; MOREY; RAMTEKE; CHANDAK *et al.*, 2010) ou (iii) partículas virais no meio condicionado de linhagens celulares que foram expostas a amostras de soro de pacientes *in vitro* (Pan-American Health Organization, 2011). É importante notar que a eficiência de detecção desses métodos varia dependendo da presença das partículas virais na corrente sanguínea de um paciente e do tempo de coleta das amostras (Figura 16).

Figura 16- Evolução da infecção e diagnóstico clínico do CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de Tanabe; Tanabe; Santos; Martins *et al.*, (2018).

Legenda: Depois da transmissão do CHIKV por meio da picada do mosquito, inicia-se o período de incubação. Então, há início dos sintomas clínicos (dia 0), os quais duram entre 7 e 10 dias. Durante esse período, a carga viral pode ser extremamente alta e detectável por métodos de PCR e vírus isolado em cultura celular. Anticorpos anti-CHIKV podem ser detectados em pacientes logo após o início dos sintomas, geralmente de 4 a 6 dias para IgM, e permanecem detectáveis por várias semanas a vários meses. Anticorpos IgG são detectáveis entre 7 a 15 dias e persistem por toda a vida. A fase aguda é geralmente seguida por uma fase pós-aguda, geralmente a partir da quarta semana até o final do terceiro mês, esta fase é caracterizada pela persistência de eventos inflamatórios iniciais, incluindo artralgia e artrite e que pode persistir por meses ou anos, com relatos na literatura de IgM e IgG positivos a nível articulação.

2.7.1 Diagnóstico Molecular

Os testes moleculares para infecção por CHIKV se baseia na detecção do RNA desse vírus. Esse tipo de teste é amplamente utilizado no diagnóstico precoce devido à sua sensibilidade e rapidez. A carga viral nas infecções agudas por CHIKV pode exceder $11 \log_{10}$ cópias/mL de soro, principalmente em neonatos (DUTTA; PAL; SAHA; MANDAL *et al.*, 2014; LAURENT; LE ROUX; GRIVARD; BERTIL *et al.*, 2007; WAGGONER; GRESH; VARGAS; BALLESTEROS *et al.*, 2016), de modo que a sensibilidade da detecção de RNA viral permanece alta nos primeiros 4 a 5 dias (Figura 16) da doença (CHUA; SAM; CHIAM; CHAN, 2017; GIBNEY; FISCHER; PRINCE; KRAMER *et al.*, 2011). Uma variedade de ensaios moleculares para CHIKV foi publicada ou está comercialmente disponível. Os ensaios relatados incluem RT-PCR (reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase), PCR em tempo real, LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*) (LOPEZ-JIMENA; WEHNER; HAROLD; BAKHEIT *et al.*, 2018) e ensaios multiplex que foram utilizados para detectar CHIKV e outras arboviroses simultaneamente (BROEDERS;

GARLANT; FRAITURE; VANDERMASSEN *et al.*, 2020; CECILIA; KAKADE; ALAGARASU; PATIL *et al.*, 2015; DASH; PARIDA; SANTHOSH; SAXENA *et al.*, 2008; SANTIAGO; VÁZQUEZ; COURTNEY; MATÍAS *et al.*, 2018; WAGGONER; GRESH; MOHAMED-HADLEY; BALLESTEROS *et al.*, 2016).

Os métodos em tempo real para CHIKV provaram ser mais sensíveis que o RT-PCR convencional (EDWARDS; WELCH; CHAMBERLAIN; HEWSON *et al.*, 2007; PARIDA; SANTHOSH; DASH; TRIPATHI *et al.*, 2007; REDDY; RAVI; DESAI; PARIDA *et al.*, 2012; SANTHOSH; DASH; PARIDA; KHAN *et al.*, 2008). A detecção de CHIKV em ensaios publicados multiplex não parece diminuir quando comparado à dos testes monoplex (DASH; PARIDA; SANTHOSH; SAXENA *et al.*, 2008; MISHRA; SHARMA; PUJHARI; RATHO *et al.*, 2011; PABBARAJU; WONG; GILL; FONSECA *et al.*, 2016; SANTIAGO; VÁZQUEZ; COURTNEY; MATÍAS *et al.*, 2018; WU; WANG; YU; YAN *et al.*, 2018).

Soro e plasma são os tipos de amostra mais comumente usados para a detecção de RNA do CHIKV. O RNA do CHIKV foi amplificado a partir de um grande número de tipos de amostras que não o soro/plasma (BANDEIRA; CAMPOS; ROCHA; SOUZA *et al.*, 2016; GRIVARD; LE ROUX; LAURENT; FIANU *et al.*, 2007).

2.7.2 Diagnóstico Sorológico

O teste sorológico fornece informações de diagnóstico e informações valiosas sobre as respostas imunes à infecção pelo CHIKV e podem auxiliar na investigação de surtos em andamento e na avaliação retrospectiva para determinar a taxa de ataque por meio da detecção de anticorpos. Uma consideração importante para o uso de testes sorológicos é a duração prolongada da detecção de anticorpos após infecção aguda. Uma semana após o início da doença, a viremia é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro, a produção de IgM aumenta nos dias 4 a 6 (Figura 16), e a viremia cai para níveis indetectáveis por testes moleculares. Neste ponto, o diagnóstico da infecção por CHIKV implica na detecção de IgM e IgG. Durante o intervalo de tempo, quando a carga viral está diminuindo e a produção de IgM não atingiu seu pico, é necessário solicitar um teste molecular e o teste de anticorpos IgM para manter uma boa sensibilidade diagnóstica. Depois disso, apenas o teste IgM é necessário. O anticorpo IgM é detectável após o início da doença, e permanece elevado por semanas a meses. A IgG pode ser detectada aproximadamente 7 a 15 dias após o início da doença (Figura 16), geralmente após o desaparecimento da viremia, e permanece detectável por meses a anos, sendo assim um bom marcador de infecção passada e proteção imunológica ao

longo da vida, bem como serve como uma ferramenta epidemiológica para determinar a soroprevalência na população (JOHNSON; GOODMAN; HOLLOWAY; DE SALAZAR *et al.*, 2016; SILVA; DERMODY, 2017).

A detecção de IgM é amplamente utilizada no diagnóstico da infecção aguda e em combinação com métodos moleculares; enquanto que a detecção de IgG é usada para teste de convalescença. Como IgM para CHIKV pode persistir por até 4 meses, resultado positivo IgM indica ambas as possibilidades de infecção aguda pelo CHIKV e infecção passada recente. Para discriminar entre os dois estados clínicos a detecção do RNA viral por RT-PCR e o título de IgG devem ser também considerados (PRINCE *et al.*, 2015).

Os testes baseados em ELISA estão disponíveis em formato de placa de microtitulação sólida ou em formato de tira de papel. Através de ELISA de captura IgM/IgG, ELISA indireto e ensaio imunofluorescente (IFA), anticorpos específicos para CHIKV em soro de pacientes podem ser detectados dentro de poucas horas usando vários kits comerciais disponíveis (Quadro 2). Mesmo assim, em uma avaliação de dez kits comerciais para CHIKV de detecção de IgM, apenas três kits do teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina de classe M (MAC-ELISA) e um kit IgM IFA tem uma precisão entre 96% e 100%, outros quatro kits MAC-ELISA e dois testes rápidos tiveram menos que 50% de acurácia (JOHNSON; GOODMAN; HOLLOWAY; DE SALAZAR *et al.*, 2016).

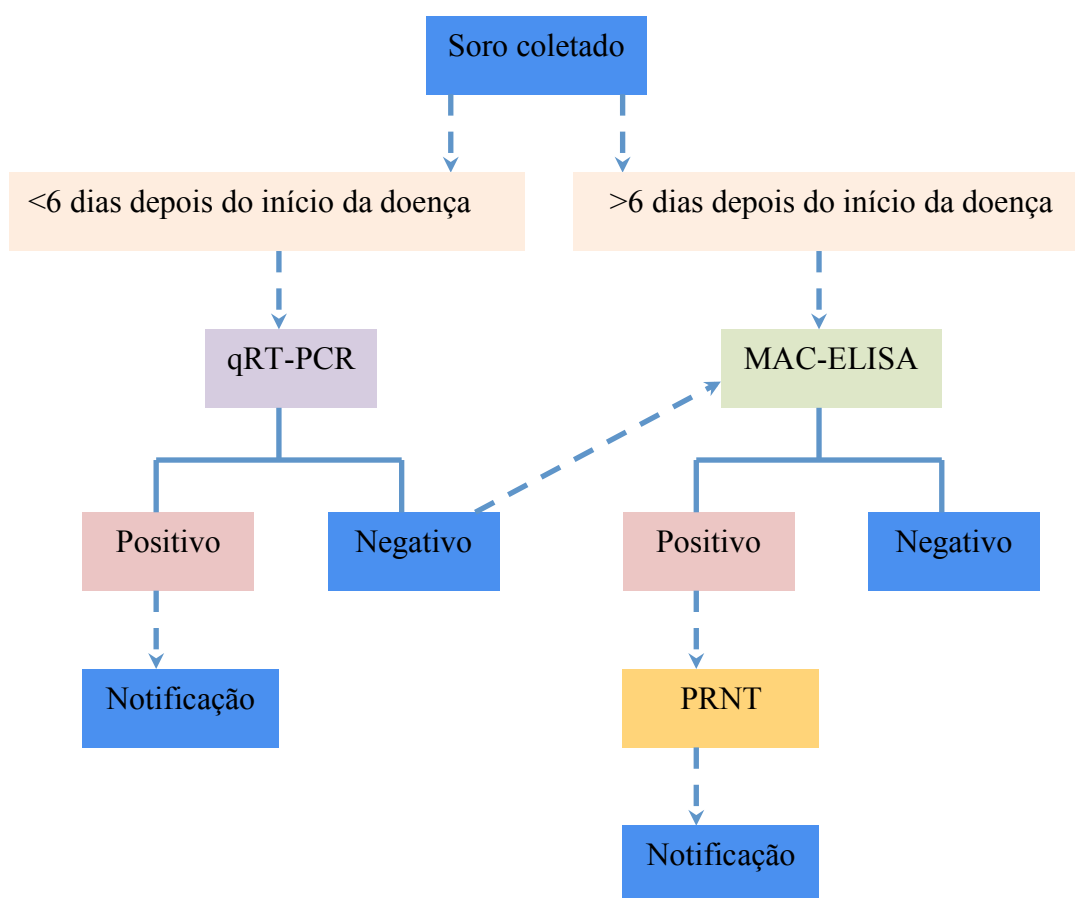
Quadro 2- Os testes baseados em ELISA estão disponíveis no mercado

Fabricante	Ensaio	Método	Performace
Euroimmun	anti-CHIKV (IgM)	IFA	Alta
Euroimmun	anti-CHIKV (IgM)	ELISA	Alta
Inbios	MAC-ELISA	ELISA	Alta
Abcam	anti-CHIKV (IgM)	ELISA	Inconsistente
Genway		ELISA	Baixa
CTK Biotech	Teste RecombiLISA CHIK (IgM)	ELISA	Baixa
SD Diagnóstico	SD BIOLINE Chikungunya (IgM)	ELISA	Baixa
CTK Biotech	Teste rápido CHIK (IgM)	Teste rápido	Baixa
SD Diagnóstico	SD BIOLINE Chikungunya IgM	Teste rápido	Baixa

Fonte: Adaptado pelo autor de Johnson; Russell; Goodman, (2016).

A reação cruzada com outros alfavírus e variação de epítomos entre os isolados de CHIKV são provavelmente as principais razões para a baixa precisão da detecção de IgM dos atuais métodos nas regiões que cocirculam vírus da mesma família. Alguns estudos modificaram os ensaios para utilizar proteínas E1 e E2 recombinantes (KHAN; DHANWANI; KUMAR; RAO *et al.*, 2014) e partículas semelhantes a vírus (ERASMUS; NEEDHAM; RAYCHAUDHURI; DIAMOND *et al.*, 2015), ao invés do tradicional vírus completo como antígeno. A especificidade, sensibilidade e acessibilidade destes testes recentemente desenvolvidos ainda estão por ser estabelecidos. Na ausência de um teste diagnóstico acurado o suficiente, o CDC tem desenvolvido um algoritmo de testes (Figura 16) em que os espécimes com resultados MAC-ELISA positivos ou equívocos podem ainda ser re-testados por teste de neutralização de redução de placas (do inglês *Plate Reduction Neutralization Test-PRNT*), usado para quantificar o título de anticorpos neutralizantes para um vírus (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016).

Figura 17- O algoritmo de teste de diagnóstico do Centro de Controle e Prevenção de Doenças para detecção da infecção pelo CHIKV



Fonte: Adaptado pelo autor de Johnson; Russell; Goodman, (2016).

O soro é coletado de pacientes que atendem à definição de caso clínico de febre e artralgia que retornaram de uma região onde o CHIKV é endêmico ou a infecção pelo CHIKV é epidêmica. Todas as amostras com resultados positivos e duvidosos por RT-qPCR são repetidos com um segundo conjunto de primer/sondas para confirmação. As amostras com resultados positivos de testes usando segundo conjuntos de primers e sondas são consideradas amostras confirmadas com CHIKV positivo. As amostras com resultados positivos ou duvidosos do MAC-ELISA são confirmadas como positivas se o PRNT der resultados positivos.

Ensaio de captura de antígeno também estão em desenvolvimento, embora sejam usados com menos frequência do que os métodos baseados em antígeno para DENV. Um ensaio imunocromatográfico usando anticorpos monoclonais contra a proteína E1 foi desenvolvido para detectar o antígeno CHIKV no soro (OKABAYASHI; SASAKI; MASRINOUL; CHANTAWAT *et al.*, 2015), mas esse teste mostrou baixa sensibilidade para a linhagem asiática (HUIITS; OKABAYASHI; CNOPS; BARBÉ *et al.*, 2018). Outro ELISA de captura de antígeno relatou 96% de concordância com resultados de RT-PCR em tempo real para amostras de fase aguda de 200 indivíduos na Índia (SHUKLA; KHAN; TIWARI; SANNARANGAIAH *et al.*, 2009). Já um teste utilizando a partícula viral inteira com amostras de fase aguda teve uma concordância geral de 94% com RT-PCR (JAIN;

OKABAYASHI; KAUR; NAKAYAMA *et al.*, 2018). À medida que esses ensaios continuam a ser desenvolvidos e melhorados, a detecção baseada em antígenos pode fornecer métodos rápidos para a confirmação diagnóstica do CHIKV e expandir os testes para laboratórios sem a capacidade de realizar os métodos moleculares. Testes rápidos para diagnóstico sorológico através da detecção de IgM e IgG anti-CHIKV foram desenvolvidos (por exemplo, SD Bioline e OnSiteChik), contudo, apresentam sensibilidade e especificidade muito baixas (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016; KOSASIH; WIDJAJA; SURYA; HADIWIJAYA *et al.*, 2012; PRAT; FLUSIN; PANELLA; TENEBRAY *et al.*, 2014; RIANTHAVORN; WUTTIRATTANAKOWIT; PRIANANTATHAVORN; LIMPAPHAYOM *et al.*, 2010).

Variações destes testes podem usar vários peptídeos antigênicos de E2 (BHATNAGAR; KUMAR; MOHAN; VERMA *et al.*, 2015; FUMAGALLI; DE SOUZA; ESPÓSITO; SILVA *et al.*, 2018), preparações de proteínas E1 ou E2 (CHUA; SAM; MERITS; CHAN, 2016; VERMA; CHANDELE; NAYAK; KAJA *et al.*, 2016; YATHI; JOSEPH; BHASKER; KUMAR *et al.*, 2011) ou o uso de anticorpos monoclonais E2 recombinantes (KUMAR; KHAN; GUPTA; BHOOPATI *et al.*, 2012) que mostraram alta especificidade em comparação à detecção de vírus completo.

As sororreatividades para E1 e E2 diferem ligeiramente, com altas especificidades para ambos por ELISA de captura de IgM, mas com maior sensibilidade para E2 do que para E1 (90% comparado a 78%) (CHO; JEON; KIM; NOH *et al.*, 2008). O uso de subunidades proteicas em ELISAs de captura eliminam o risco biológico associado ao uso de preparações de vírus inteiros (CHO; JEON; KIM; NOH *et al.*, 2008; PRIYA; KHAN; RAO; PARIDA, 2014). Além disso, esses ensaios são mais específicos e podem resolver problemas relacionados à reatividade cruzada entre alfavírus.

2.7.4 Isolamento Viral

Na fase aguda da infecção por CHIKV, a viremia aparece durante a primeira semana de sintomas (Figura 16) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A infecção pode ser confirmada de forma precoce pelo isolamento do vírus do soro, plasma, sangue ou tecido. O diagnóstico por isolamento viral é altamente específico (100%), entretanto não é sensível (PANNING; GRYWNA; VAN ESBROECK; EMMERICH *et al.*, 2008).

O CHIKV pode ser detectado e isolado, cultivando-se com células de mosquito (C6/36) ou células de mamífero (Vero), por exemplo (COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE;

DISSON *et al.*, 2008; GHOSH; ALLADI; NARAYANAPPA; VASANTHAPURAM *et al.*, 2018). Foi demonstrado que o CHIKV estabelece uma infecção persistente não citopática nas células do mosquito C6/36, enquanto causa fortes efeitos citopáticos e apoptose em células de mamíferos (GHOSH; ALLADI; NARAYANAPPA; VASANTHAPURAM *et al.*, 2018; LI; SIRIPANYAPHINYO; TUMKOSIT; NORANATE *et al.*, 2013; LONG; HEISE, 2015). A cultura de CHIKV nas células C6/36 permite títulos virais 100 vezes maiores que os das células Vero (LI; SIRIPANYAPHINYO; TUMKOSIT; NORANATE *et al.*, 2013). O CHIKV já foi isolado em outras linhagens de células de mamíferos, tais como *Rhesus MonkeyKidneyEpithelialCells*- LLC-MK2 (CHERABUDDI; IOVINE; SHAH; WHITE *et al.*, 2016), *Baby Hamster Kidney*- BHK-21 (CARLETTI; MARSELLA; COLAVITA; MESCHI *et al.*, 2017; ZHANG; HUANG; WANG; YANG *et al.*, 2018) e *HumanEmbryonicKidney*- HEK293T (CHALAEM; CHUSRI; FERNANDEZ; CHOTIGEAT *et al.*, 2016).

Esse método pode levar pelo menos uma semana e só atinge uma alta sensibilidade durante a fase virêmica. Cinco dias após a infecção, a abordagem de isolamento viral tem baixa sensibilidade, mas ainda é o método de escolha para isolar a cepa do CHIKV (COUDERC; CHRÉTIEN; SCHILTE; DISSON *et al.*, 2008; SOURISSEAU; SCHILTE; CASARTELLI; TROUILLET; GUIVEL-BENHASSINE; RUDNICKA; SOL-FOULON; LE ROUX; PREVOST; FSIHI; FRENKIEL; BLANCHET; AFONSO; CECCALDI; OZDEN; GESSAIN; SCHUFFENECKER; VERHASSELT; ZAMBORLINI; SAÏB *et al.*, 2007).

Apesar de seu uso por décadas como “padrão ouro” para detecção viral em virologia clínica, a cultura celular e o isolamento viral não são mais comumente usados para fins de diagnóstico de rotina (DE SERRES; SKOWRONSKI; WU; AMBROSE, 2013). O procedimento requer tempo para o crescimento viral e subsequente identificação, bem como equipamentos especializados e equipe de laboratório qualificada para o desempenho (PATRAMOOL; BERNARD; HAMEL; NATTHANEJ *et al.*, 2013). Todavia, o benefício da cultura de células é que ela permite a amplificação biológica do vírus e o isolamento de cepas de infecções humanas. Esses isolados permitem caracterização adicional de espécies virais e fornecem recursos inestimáveis para esclarecer as respostas imunes e realizar pesquisas de virologia básica com cepas contemporâneas (HUDU; ALSHRARI; SYAHIDA; SEKAWI, 2016; PATRAMOOL; BERNARD; HAMEL; NATTHANEJ *et al.*, 2013).

2.8 Tratamento

Avanços nas pesquisas de vacinas e antivirais para o CHIKV é dificultado pela falta de animais modelos. Não existe uma espécie que reproduza completamente a síndrome reumatóide crônica desse vírus que é uma condição vitalícia (Quadro 3) (GARDNER; ANRAKU; LE; LARCHER *et al.*, 2010). Também há escassez de modelos para testar os efeitos da doença nos ossos e cartilagens. Apesar de alguns protótipos de murinos e primatas não humanos apresentarem utilidade estabelecida para estudo da doença aguda, ainda é necessário identificar outros capazes de simular a fase crônica e durável. Em camundongos o CHIKV pode causar encefalite fatal, miocardite e miosite, a doença tem um curso muito curto (WEINBREN, 1958). Em macacos, nenhum dano nas articulações é evidenciado em baixas doses, 10^1 unidades formadoras de placas (PFU), de desafio viral sendo necessário doses altas ($>10^6$ PFU) de CHIKV para esse tipo de análises (LABADIE; LARCHER; JOUBERT; MANNIOUI *et al.*, 2010; SMALLEY; ERASMUS; CHESSON; BEASLEY, 2016).

Quadro 3- Principais modelos animais para estudar a infecção por CHIKV

Organismo modelo	Vantagens	Desvantagens
Camundongos recém-nascidos	Tamanho, tempo de geração, manuseio e custo; Uso bem descrito na literatura; Animais transgênicos; Replicam alta viremia e disseminação para múltiplos órgãos	Distância evolutiva; Imunocomprometidos; Tempo limitado para análise do modelo por causa da letalidade viral
Camundongos com deficiência de sinalização de IFN γ (por exemplo, IFNAR1 ^{-/-} , IFNAR1 ^{-/-} , IFNGR1 ^{-/-})	Tamanho, tempo de geração, manuseio e custo; Uso bem descrito na literatura; Animais transgênicos; Replicam alta viremia e disseminação para múltiplos órgãos	Distância evolutiva; Imunocomprometidos; Tempo limitado para análise do modelo por causa da letalidade viral
Camundongos do tipo selvagem como modelo de inchaço de pata	Tamanho, tempo de geração, manuseio e custo; Uso bem descrito na literatura; Animais transgênicos; Replicam alta viremia, disseminação para tecidos e articulações perto do local da injeção e órgãos e quadro de doença semelhante nas articulações e persistência viral; Não letal	Distância evolutiva; Não consegue replicar a disseminação para todos os órgãos afetados pela doença humana; Quadro articular um pouco diferente do apresentado em humanos, como por exemplo o envolvimento unilateral
NHP (macacos Rhesus, macacos Cynomolgus)	Proximidade evolutiva - fisiologia e resposta imune semelhantes; Duplica a viremia, se espalha para órgãos e articulações, febre, persistência viral, erupções cutâneas, alterações na bioquímica sanguínea, hemograma, citocinas e quimiocinas; Replica o envolvimento das articulações apenas em doses muito altas de desafio; Não letal	Tamanho, tempo de geração, manuseio e custo; Restrições éticas do uso de primatas na pesquisa; Replica patologias articulares apenas em doses de desafio não fisiológicas

Fonte: Adaptado pelo autor de Schrauf; Tschismarov; Tauber; Ramsauer, (2020)

Sendo assim, os macacos representam o melhor modelo para a patogênese do CHIKV e tanto o *Rhesus* quanto o *Cynomolgus* (reservatório natural do vírus) têm sido usados para testar vacinas ou anticorpos terapêuticos, mas os estudos são limitados pelo alto custo e por considerações éticas. Os hamsters dourados, *Mesocricetus auratus*, demonstraram ser promissores como futuros modelos de CHIKV, pois são altamente suscetíveis à infecção por CHIKV e desenvolvem inflamações semelhantes aos humanos. Formas alternativas que pode auxiliar no estudo mais preciso da infecção pelo CHIKV são os organóides e o desenvolvimento tecidual, especialmente de células ósseas e cartilaginosas (BOSCO-LAUTH; HAN; HARTWIG; BOWEN, 2015; GANESAN; DUAN; REID, 2017; LABADIE; LARCHER; JOUBERT; MANNIOUI *et al.*, 2010).

2.8.1 Terapia para alívio de sintomas

Atualmente, não existe terapia específica direcionada licenciada para infecção aguda por CHIKV. O alívio sintomático é o principal tratamento para a doença provocada por esse vírus, incluindo hidratação adequada, repouso e alívio do quadro clínico de dor e febre (LOCONSOLE; METALLO; DE ROBERTIS; MOREA *et al.*, 2018). A analgesia baseada em terapia com acetaminofeno é a mais indicada. A OMS desestimula o uso de aspirina e da maioria dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) durante as primeiras 48 horas, devido ao risco de agravamento da disfunção plaquetária, especialmente nos casos de possível coinfeção por DENV. O uso de analgésicos (opióides fracos) são necessários se o acetaminofeno não for eficaz, tramadol isolado ou em combinação com acetaminofeno. Corticosteróides sistêmicos têm sido usados apenas para apresentações poliarticulares inflamatórias, especialmente quando associadas a tenossinovite, sinovite ativa ou em caso de resistência ou contraindicação aos AINEs. Outros estudos defendem a eficácia de baixas doses de corticosteróides nos primeiros 2 meses da doença pós-aguda (SIMON; JAVELLE; CABIE; BOUQUILLARD *et al.*, 2015). Manifestações crônicas, incluindo poliartralgia persistente ou remitente-recorrente, poliartrite e mialgia, em alguns casos têm sido tratados com cloroquina, hidroxicloroquina em combinação com corticosteroides, metotrexato, sulfassalazina e agentes biológicos como etanercepte ou abatacepte (AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020; CHAAITHANYA; MURUGANANDAM; RAGHURAJ; SUGUNAN *et al.*, 2014; CHOW; HER; ONG; CHEN *et al.*, 2011; HOARAU; JAFFAR BANDJEE; KREJBICH TROTOT; DAS *et al.*, 2010; MAHENDRADAS; AVADHANI; SHETTY, 2013).

Pesquisas para identificar possíveis novas terapias antivirais ou redirecionar os compostos existentes para o tratamento da infecção pelo CHIKV estão em andamento (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; BHAT; MUDGAL; N; ARUNKUMAR, 2019; MARRA; KÜMMERLE; GUEDES; BARROS *et al.*, 2020; SHIN; JARHAD; JANG; KOVACIKOVA *et al.*, 2020). A maioria dos antivirais até agora foram testados *in vitro*, *in vivo* ou permanecem em ensaios pré-clínicos, desta forma, são necessários mais estudos em busca dos possíveis candidatos a serem utilizados como agente anti-CHIKV. Vários agentes demonstraram atividade contra o CHIKV *in vitro*, e os anticorpos monoclonais demonstraram eficácia em modelos animais (BROECKEL; FOX; HAESE; KREKLYWICH *et al.*, 2017; GOH; HOBSON-PETERS; PROW; GARDNER *et al.*, 2013; THARMARAJAH; MAHALINGAM; ZAID, 2017; THIBERVILLE; MOYEN; DUPUIS-MAGUIRAGA; NOUGAIREDE *et al.*, 2013).

2.8.2 Terapia específica com pequenos inibidores

A cloroquina é um medicamento antimalárico e tem propriedades antivirais *in vitro* contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e coronavírus (CoV) (DA SILVA-JÚNIOR; LEONCINI; RODRIGUES; AQUINO *et al.*, 2017). Apresentou atividade *in vitro* contra CHIKV, inibindo a replicação em células Vero (KHAN; SANTHOSH; TIWARI; LAKSHMANA RAO *et al.*, 2010). No entanto, não demonstrou ter efeitos anti-CHIKV *in vivo*, ineficaz no modelo de primatas não humanos e em ensaios clínicos em humanos (ROQUES; THIBERVILLE; DUPUIS-MAGUIRAGA; LUM *et al.*, 2018). Em estudo randomizado utilizando cloroquina na Ilha da Reunião não demonstrou diferença na duração da artralgia febril ou na gravidade da viremia (SEBASTIAN; LODHA; KABRA, 2009).

Compostos que podem interferir na entrada viral, incluindo fenotiazinas (POHJALA; UTT; VARJAK; LULLA *et al.*, 2011) e as flavaglines (WINTACHAI; THUAUD; BASMADJIAN; ROYTRAKUL *et al.*, 2015), estão sendo investigadas como terapias potenciais.

A ribavirina é um análogo estrutural da guanosina e já foi descrito na literatura com a atividade antiviral contra o vírus da influenza, poliomielite, vírus da Hepatite C e DENV. A atividade *in vitro* contra o CHIKV também foi relatada e o medicamento sinergizou com doxiciclina para reduzir a carga viral e a inflamação em camundongos infectados (ROTHAN; BAHRANI; MOHAMED; TEOH *et al.*, 2015). Este estudo está em fase inicial de ensaio clínico e precisa de mais investigação sobre seu mecanismo e eficácia como terapia potencial para o CHIKV (GHILDIYAL; GABRANI, 2020).

Arbidol, medicamento antiviral aprovado para o tratamento da gripe, complicações pós-gripe, profilaxia e distúrbios pulmonares virais na Rússia e na China. Também foi relatado que inibem o vírus da Hepatite C, o vírus Ebola, o vírus Tacaribe de Arenaviridae e o vírus do herpes humano. Delogu et al. (2011) relataram inibição significativa do CHIKV usando o arbidol em estudos *in vitro*. Durante o estágio inicial da replicação do CHIKV, os vacúolos citopáticos do Tipo 1 são formados através da fusão das membranas lisossômicas e endossômicas, levando à síntese do RNA CHIKV. Devido à natureza hidrofóbica do arbidol, ele é intercalado na membrana e perturba a formação de vacúolos, inibindo a replicação em células vero (DELOGU; PASTORINO; BARONTI; NOUGAIREDE *et al.*, 2011).

Suramina é um medicamento antigo usado para tratar a doença do sono humana causada por tripanossomas. Exibiu uma ampla atividade antiviral contra vírus como HIV, hepatite B (HBV), vírus da hepatite e DENV. Durante experimentos *in vivo*, foi relatado que a suramina apresentou atividade antiviral contra o mutante CHIKV226V e as cepas da Malásia 0810bTw (HO; WANG; LU; WU *et al.*, 2015).

Antivirais específicos visando a replicação viral usando RNA pequeno de interferência (RAVINDRAN; ALIAS, 2017) e a entrada/replicação do vírus (PARASHAR; PAINGANKAR; KUMAR; GOKHALE *et al.*, 2013) estão mostrando resultados promissores, mas não foram aprovados para uso humano (SUBUDHI; CHATTOPADHYAY; MISHRA; KUMAR, 2018).

2.8.3 Terapia específica com uso de anticorpos

Os anticorpos antivirais são tradicionalmente rastreados quanto à sua capacidade de inibir a entrada de vírus nas células-alvo. A neutralização de entrada do envelope do vírus por anticorpos monoclonais (mAbs) pode ser mediada por dois mecanismos principais: inibição da ligação do receptor e prevenção de alterações conformacionais nas proteínas de fusão virais após a ligação do receptor. Para os alfavírus, a fusão da membrana ocorre nos endossomos acidificados após o vírus entrar nas células. Em relação às terapias com utilização de anticorpos, sabe-se há muito tempo que o anti-CHIKV é um correlato da proteção mediada pela vacina contra o CHIKV, e vários estudos de imunização passiva mostraram que os anticorpos neutralizantes específicos do CHIKV podem proteger os animais da replicação e da doença do CHIKV (AKAHATA; YANG; ANDERSEN; SUN *et al.*, 2010; GANGNEUX; COUDERC; LECUIT; GRANDADAM *et al.*, 2009).

Anticorpos neutralizantes de infecções passadas em humanos também mostram evidências de proteção, pois esses indivíduos são imunes à reinfecção por CHIKV (KAM;

SIMARMATA; CHOW; HER *et al.*, 2012; YOON; ALERA; LAGO; TAC-AN *et al.*, 2015). Esta proteção também pode ser obtida com mAbs recombinantes humanos (FRIC; BERTINMAGHIT; WANG; NARDIN *et al.*, 2013; PAL; DOWD; BRIEN; EDELING *et al.*, 2013). Portanto, os anticorpos contra o CHIKV foram avaliados como terapias profiláticas e pós-exposição para o tratamento da doença aguda pelo CHIKV em populações de pacientes, e várias formulações de anticorpos estão em vários estágios do desenvolvimento pré-clínico. Couderc *et al.* foram capazes de demonstrar proteção contra a doença CHIKV em camundongos *knockout* para receptores neonatais e IFN (IFNAR^{-/-}) por transferência passiva de plasma em fase convalescente do doador humano (WARTER; LEE; THIAGARAJAN; GRANDADAM *et al.*, 2011). Neste estudo, a proteção contra a doença foi alcançada quando os anticorpos foram administrados nas primeiras 24 horas após a infecção. Akahata *et al.* também descobriram anticorpos policlonais de primatas não humanos direcionados contra VLPs de CHIKV camundongos (IFNAR^{-/-}) protegidos contra a doença (AKAHATA; YANG; ANDERSEN; SUN *et al.*, 2010).

Além dos estudos de anticorpos policlonais, também foram identificados mAbs humanos e murinos direcionados às glicoproteínas estruturais E1 e E2 que neutralizam o vírus *in vitro* e são protetores em camundongos. Muitos mAbs que neutralizam a infecção pelo CHIKV reconhecem epítomos na superfície acessível por solvente da proteína E2. Os únicos estudos estruturais anteriores dos complexos CHIKV-anticorpo foram de quatro mAbs murinos neutralizantes. Três desses anticorpos (m10, m242 e CHK-9) se ligaram aos locais putativos de ligação ao receptor, enquanto um deles, o CHK-152, inibiu a exposição do *loop* de fusão immobilizando o domínio E2-B (SUN; XIANG; AKAHATA; HOLDAWAY *et al.*, 2013). Geralmente, observam-se melhorias clínicas em camundongos quando o tratamento com mAb é iniciado nas primeiras 24 horas após a infecção (JIN; LISS; CHEN; LIAO *et al.*, 2015; SELVARAJAH; SEXTON; KAHLE; FONG *et al.*, 2013; SMITH; SILVA; FOX; FLYAK *et al.*, 2015). Além das terapias de mAb único, outros pesquisadores desenvolveram terapias combinatórias de mAb para ajudar a prevenir as variantes de escape da neutralização (LONG; HEISE, 2015). Se recebidos antes da infecção, os níveis de viremia e vírus nos tornozelos foram reduzidos para abaixo do nível de detecção; no entanto, quando administrados após a infecção, embora a viremia tenha diminuído, não houve efeitos nos níveis de RNA viral no pé inoculado (HAWMAN; STOERMER; MONTGOMERY; PAL *et al.*, 2013). Embora a utilidade da imunização passiva usando anticorpos neutralizantes monoclonais e policlonais *in vitro* e em modelos de camundongos tenha demonstrado proteção profilática contra a infecção pelo CHIKV, a utilidade em pacientes humanos como profilaxia

ou como tratamento durante doença aguda é desconhecida (COUDERC; LECUIT, 2015; THIBERVILLE; MOYEN; DUPUIS-MAGUIRAGA; NOUGAIREDE *et al.*, 2013).

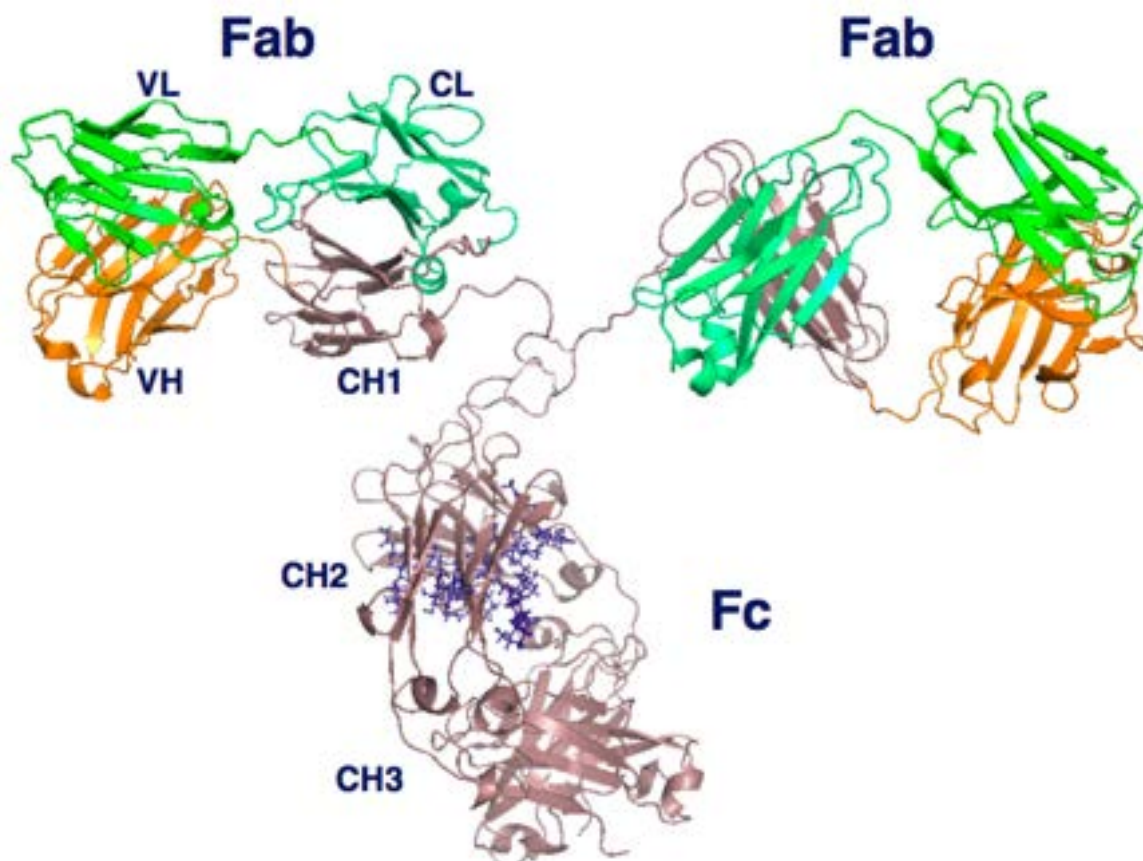
2.10 Engenharia de anticorpos terapêuticos

O primeiro anticorpo monoclonal terapêutico, muromonab-CD3 (OKT3), foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 1985 para prevenir a rejeição de transplantes de rim, coração e fígado (KUHNet *et al.*, 2016). Desde então, os anticorpos monoclonais (mAbs) e proteínas derivadas de parte dos mAbs estabeleceram-se como um dos maiores grupos de produtos biológicos com ampla variedade de aplicações terapêuticas. Pela alta afinidade e especificidade de suas interações com antígenos alvos, os anticorpos representam uma classe altamente bem sucedida de proteínas que reconhecem uma ampla gama de alvos com aplicações terapêuticas e diagnósticas. Indicações médicas para tratamento com anticorpos inclui desde câncer (SCOTT *et al.*, 2012), infecções (CLEMENTI *et al.*, 2017; MARGOLIS *et al.*, 2017), doenças auto-imunes (CHAN e CARTER, 2010), bem como doenças neurodegenerativas (YU e WATTS, 2013) e metabólicas (AHRENS, 2011). A descoberta e o desenvolvimento da tecnologia de hibridoma criaram a base para a descoberta e o desenvolvimento de mAb modernos. Isso foi aumentando ao longo dos anos pela aplicação de fagos, animais transgênicos, e outras abordagens utilizadas para produção de mAbs. O desenvolvimento bem-sucedido de um mAb terapêutico geralmente requer a geração de uma molécula seletiva e potente, humanização de sequências, maturação de afinidade, engenharia de fragmento cristalizável (Fc) para modular funções efetoras e o uso engenharia para lidar com passivos biofísicos que impactam negativamente a fabricação (CHIU *et al.*, 2016).

A função mais básica dos anticorpos (Figura 18) é neutralizar o antígeno alvo. Ao se ligarem a epítopos sobrepostos ou induzirem alterações conformacionais, os anticorpos podem inibir a ligação dos receptores aos seus co-receptores ou fatores de crescimento. Para anticorpos produzidos endogenamente, antígenos como proteínas de entrada viral e toxinas bacterianas podem ser neutralizados para prevenir infecção e patogênese. Enquanto isso, anticorpos terapêuticos podem ser gerados que se ligam a receptores humanos ou fatores de crescimento, permitindo a modulação de vias direcionadas. As regiões de ligação do mAb são constituídas pelos domínios variáveis de cadeia pesada e cadeia leve que determinam a especificidade e afinidade do anticorpo. A haste do anticorpo em forma de Y é chamada de região Fc e é composta por dois pares de domínios constantes glicosilados. O Fc é

responsável pelas funções efetoras e contribui para o prolongamento da meia-vida da molécula no plasma sanguíneo (CHIU *et al.*, 2016).

Figura 18- Modelo estrutural de uma IgG humana



Fonte: Adaptado pelo autor de Chiu *et al.*, (2016).

Legenda: A região Fab (Fragmento de ligação ao antígeno) é composta pela interação entre os domínios variável e CH1 das cadeias pesada e leve. A cadeia leve é colorida em verde com a região variável colorida em verde brilhante. A cadeia pesada é colorida em marrom com a região variável correspondente colorida em laranja. O domínio CH2 possui sítios de glicosilação que se orientam entre as duas cadeias pesadas na região Fc (Fragmento constante).

Ao projetar terapias baseadas em anticorpos, vários fatores devem ser considerados. Por exemplo, a escolha do antígeno direcionado e da estratégia de geração de anticorpos afeta a estrutura primária e terciária das regiões variáveis do anticorpo. As diferenças neste domínio da proteína afetam a natureza da interação anticorpo-antígeno, incluindo especificidade, afinidade e se o evento de ligação é ativador ou inibitório. Essas propriedades biológicas, por sua vez, determinam propriedades clínicas como potência e índice terapêutico. Na mesma linha, fatores como subclasse de anticorpo e alotipo afetam a estrutura das regiões constantes,

o que por sua vez influencia a ligação a receptores Fc importantes para a função efetora e meia-vida sérica. Assim, vários determinantes devem ser considerados ao criar novas terapêuticas baseadas em anticorpos. Embora características estruturais distintas tenham consequências funcionais sobrepostas, os anticorpos podem ser projetados de forma modular para combinar todos os recursos desejados em uma única molécula otimizada (GOULET e ATKINS, 2019).

A afinidade anticorpo-antígeno mais forte pode se traduzir diretamente em maior potência e eficácia clínica. Esta tendência tem sido observada comumente para anticorpos antagonistas que se ligam a epítomos patogênicos, onde a afinidade de ligação se correlaciona com a eficácia de neutralização e redução da infectividade (ZHOU *et al.*, 2012; KOSTOLANSKÝ *et al.*, 2000). No entanto, deve-se enfatizar que a maior potência de ligação ao antígeno nem sempre cria uma terapêutica mais eficaz. Para anticorpos direcionados a tumores sólidos, parece que existe uma faixa ideal na afinidade do antígeno (BECKMAN *et al.*, 2007). Se o valor de K_D for muito baixo, o anticorpo pode sofrer de baixa seletividade de células tumorais versus tecido saudável. Além disso, a lenta taxa de dissociação de anticorpos de ligação forte pode fazer com que eles se agrupem na periferia do tumor ou sejam internalizados antes de se difundirem mais profundamente no tecido maligno (RUDNICK *et al.*, 2009). Para anticorpos submetidos à disposição mediada por alvo, a afinidade mais alta do antígeno (e especialmente a taxa de dissociação mais lenta) pode levar à internalização e eliminação aceleradas (LIU *et al.*, 2018).

Várias estratégias podem ser usadas para gerar e selecionar as regiões variáveis de ligação ao antígeno de anticorpos terapêuticos. O método clássico é o mais comum em candidatos clínicos bem-sucedidos, utiliza a tecnologia do hibridoma (KÖHLER *et al.*, 1975). A técnica gera anticorpos direcionados a antígenos que são imunogênicos em camundongos ou em outros mamíferos. Os antígenos são primeiro injetados no camundongo para induzir a expansão das células B específicas. Depois que uma resposta humoral foi montada, os esplenócitos são colhidos e as células B produtoras de anticorpos são fundidas com células de mieloma altamente proliferativas. Estas células imortalizadas produtoras de anticorpos podem então ser testadas quanto à especificidade desejada através da realização de ensaios de ligação tais como ELISA. Além do método do hibridoma, as células B também podem ser imortalizadas através da transformação com vírus Epstein-Barr ou genes de linfoma de células B (TOSATO *et al.*, 2007; KWAKKENBOS *et al.*, 2010).

Embora a geração de anticorpos monoclonais usando tecnologia de hibridoma tenha sido um grande avanço no desenvolvimento de terapias biológicas, existe a limitação do uso

de proteínas de camundongo em humanos que leva a uma alta incidência de imunogenicidade (HWANG *et al.*, 2005). Desta forma os anticorpos produzidos com essa tecnologia passam por etapas de quimerização e humanização. Esses anticorpos são então humanizados, passando a conter uma porcentagem maior de sequências humanas, onde apenas os CDRs de camundongo são mantidos enquanto o restante da estrutura constante e variável é humana (KENNEDY *et al.*, 2018; BARDERAS *et al.*, 2008). Anticorpos totalmente humanos podem ser gerados via hibridoma de camundongo usando animais transgênicos que contêm os genes de Ig humanos (LONBERG *et al.*, 2005). Além disso, o isolamento de células B de indivíduos imunizados ou infectados, permite a formação de células de hibridoma humano das quais anticorpos humanos podem ser isolados. Importante pontuar que mesmo anticorpos totalmente humanos podem ser imunogênicos (HWANG *et al.*, 2005; HARDING *et al.*, 2010).

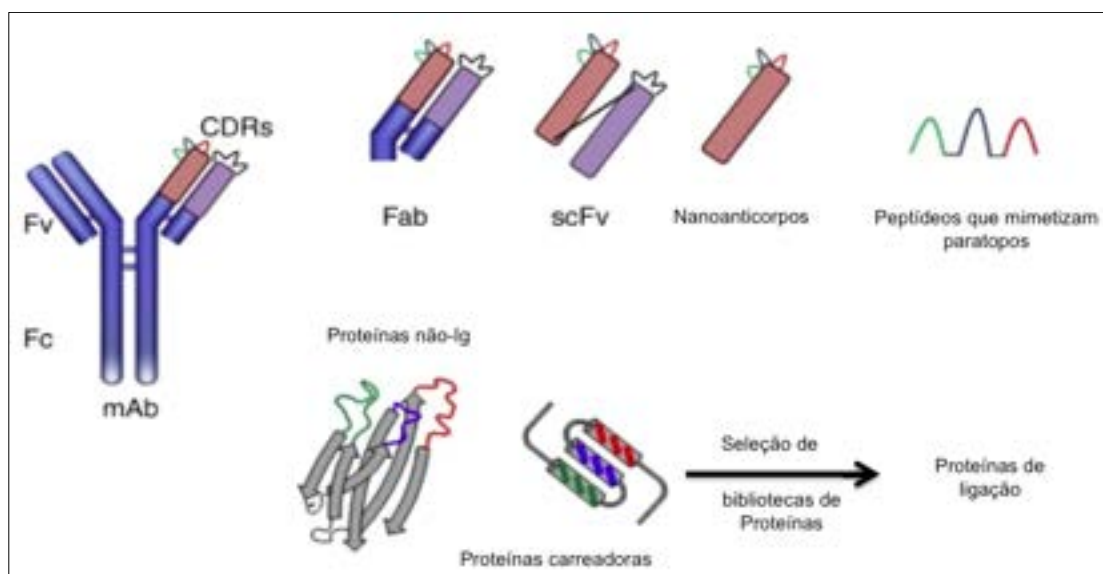
Uma vez que a tecnologia de hibridoma funciona no contexto de um sistema imunológico responsivo, apenas certos antígenos podem ser efetivamente direcionados usando este método. Sendo assim, uma consideração primária é se os antígenos são suficientemente imunogênicos para provocar uma resposta humoral no animal a ser imunizado. Outra questão, muitas vezes não é viável ou ético injetar em camundongos patógenos ou toxinas que podem ser fatais antes da geração de uma resposta robusta de células B. Em resumo, embora a técnica de hibridoma ainda seja o padrão para a produção monoclonal, sua dependência da imunidade adaptativa exige tempos de geração de anticorpos de muitos meses e limita a capacidade de controlar o epítipo preciso em quais anticorpos induzidos irão se ligar (GOULET *et al.*, 2020).

No entanto, devido ao tamanho considerável (150 kDa para IgG) dos anticorpos, as aplicações para a maioria dos alvos terapêuticos são restritos. A entrega deve ser realizada por injeção ou infusão e penetração tecidual e acumulação tecidual também pode ser um problema. Além disso, os anticorpos são sensíveis à temperatura, sofrem desnaturação irreversível e têm um prazo de validade limitado. Vale pontuar ainda que o complexo molecular dos anticorpos inclui uma infinidade de sítios de glicosilação e ligações dissulfeto que requer um sistema eucariótico para fabricar, caro e trabalhoso. Por último, se tem a possibilidade de ter efeito citotóxico, que está ligado ao seu fragmento Fc.

A engenharia de diferentes porções dos anticorpos pode otimizar as suas propriedades e desta maneira resolver algumas dificuldades apresentadas no parágrafo anterior. Uma das soluções seria reduzir o tamanho dos anticorpos e para isso várias estratégias já foram implementadas (Figura 19), uma estratégia tem sido a geração de aptâmeros que tem presente apenas partes do anticorpo (paratopo) necessário para a ligação com o antígeno (BRUCE *et*

al., 2016). A tecnologia de aptâmeros, que também é conhecida como anticorpos sintéticos, está rivalizando com anticorpos em aplicações diagnósticas e terapêuticas de doenças existentes e emergentes (JAYASENA, 1999).

Figura 19- Abordagens conceitualmente diferentes para moléculas miméticas de anticorpos



Fonte: Adaptado pelo autor de Bruce *et al.*, (2016)

O termo aptâmero, derivado do latim *aptus* (encaixe) e grego *meros* (parte), descreve moléculas pequenas (proteínas ou ácidos nucleicos) que são produzidas com a finalidade de ter ligação específica a uma proteína alvo ou outras moléculas. Seguindo a definição colocada por Colas e colaboradores (1996), os aptâmeros peptídicos consistem de um domínio peptídico geralmente curto apresentado no contexto de uma estrutura protéica de suporte (*scaffold*) (COLAS *et al.*, 1996). Em princípio, os aptâmeros peptídicos assemelham-se aos anticorpos, nos quais domínio variável de lig

ação ao antígeno é exposto a partir de um *backbone* de uma proteína, porém podem apresentar menor complexidade estrutural.

Desde a sua descoberta, os aptâmeros têm mantido a promessa de gerar rapidamente e facilmente ligantes sintéticos para fins diagnósticos e terapêuticos. Às vezes, usando outros nomes, incluindo “ligantes de ácido nucleico”, “oligocorpos” ou “anticorpos químicos”, essas moléculas oferecem funções semelhantes a anticorpos. Já foram construídos aptâmeros peptídicos para se ligar a proteínas alvo com afinidade significativa e alta especificidade, tanto *in vitro* como *in vivo* (XU e LUO, 2002). Outro aspecto importante é que alguns demonstraram possuir a capacidade de bloquear especificamente a função de alvos proteicos *in vitro*, bem como em células vivas, como em animais (MORRISON *et al.*, 2011). Com base

nessas propriedades, os peptídeos aptâmeros têm se mostrado interessantes para uso na medicina molecular como potenciais novos agentes terapêuticos.

Em suma, podem apresentar propriedades de reconhecimento molecular, de forma semelhante aos anticorpos, com características melhoradas como por exemplo, tamanho pequeno, alta estabilidade, alta solubilidade. Conforme já relatado na literatura, as moléculas semelhantes a anticorpos apresentam alta estabilidade na ausência de ligações dissulfeto que é uma vantagem importante, que facilita altos rendimentos na expressão bacteriana (LOFBOM *et al.*, 2010).

2.11 Desenho computacional de proteínas

2.11.1 Princípios fundamentais do programa Rosetta

O desenvolvimento do Rosetta começou em meados da década de 1990 e inicialmente visava a predição da estrutura proteica e o enovelamento de proteínas (SORENSEN *et al.*, 2000). O pacote de software de modelagem macromolecular Rosetta (SCHUELER-FURMAN *et al.*, 2005; LEAVER-FAY *et al.*, 2011), provou ser uma plataforma robusta para *design* de proteínas, tendo produzido novas dobras proteicas (KUHLMAN *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2012), interações proteína/DNA (ASHWORTH *et al.*, 2010), interações proteína/peptídeo (SAMMOND *et al.*, 2011), Interações proteínas/proteínas (FLEISHMAN, S. J., WHITEHEAD, T. A., *et al.*, 2011) e novas enzimas (SIEGEL *et al.*, 2010) Tecnologias para projetar interações proteína/ligante também foram desenvolvidas e aplicadas (TINBERG *et al.*, 2013; ALLISON *et al.*, 2014).

A obtenção de proteínas de ligação utilizando Rosetta aborda o problema de duas maneiras. Um método deriva do desenho de enzima, onde interações chave predefinidas ao ligante são colocadas em um arcabouço de proteína e o contexto circundante é subsequentemente otimizado em torno delas (TINBERG *et al.*, 2013). O outro deriva da ancoragem do ligante, na qual as interações com um ligante móvel são otimizadas de forma abrangente. Ambas as abordagens provaram ser bem sucedidas no redesenho de proteínas, e os recursos de ambos podem ser combinados usando o sistema RosettaScripts (FLEISHMAN, SAREL J. *et al.*, 2011), adaptando o protocolo de projeto às necessidades específicas do projeto.

O Rosetta utiliza um algoritmo de amostragem de Monte Carlo, essa amostragem do backbone se dá por uma etapa de baixa resolução (coarsegrained), enquanto que amostragem de cadeias laterais é de alta resolução (full atom). A otimização do backbone em larga escala é

feita baseada em fragmentos de 3 e 9 aminoácidos, derivados do PDB. Refinamentos locais do backbone se dão por pequenas perturbações dos ângulos ϕ e ψ . A amostragem das cadeias laterais também utiliza informações derivadas do PDB para criar uma biblioteca de rotâmeros. Os desenvolvedores da Rosetta seguem a hipótese de que uma função de energia unificada deve ser capaz de realizar todas essas tarefas complexas. Além disso, a otimização contínua dessa função de energia para melhorar um problema estrutural acabará por melhorar o desempenho de outras tarefas de modelagem. Componentes importantes da função de energia são estatisticamente derivados, ou seja, usando modelos de proteínas derivados de dados cristalográficos de alta resolução no Banco de Dados de Proteína (PDB) como uma base de conhecimento (KUHLMAN *et al.*, 2003; ROHL, CAROL A. *et al.*, 2004; MEILER e BAKER, 2006; ALFORD *et al.*, 2015).

A função de energia é baseada na hipótese de Anfinsen de que as conformações de proteínas nativas representam conformações únicas, de baixa energia e termodinamicamente estáveis. Esses estados dobrados residem em mínimos na paisagem de energia e têm uma mudança líquida favorável na energia livre de Gibbs, que é a soma das contribuições de entalpia (ΔH) e entropia ($T\Delta S$) em relação ao estado desdobrado. Para seguir essas heurísticas, os programas de modelagem macromolecular requerem uma função matemática que possa discriminar entre as conformações desdobradas, dobradas e nativas. Normalmente, essas funções são uma combinação linear de termos que calculam energias em função de vários graus de liberdade (ANFINSEN *et al.*, 1973).

A função de energia padrão a partir de 2015, denominada Rosetta Energy Function 2015 (REF2015) aproxima a energia de uma conformação de biomolécula. Esta quantidade, chamada ΔE_{Total} é calculada como uma combinação linear de termos de energia, E_i , que são computadas como funções de graus de liberdade geométricos (Θ) e identidades químicas (aa) e dimensionadas por um peso em cada termo (w_i), conforme a equação abaixo:

$$\Delta E_{total} = \sum_i w_i E_i (\Theta_i, aa_i)$$

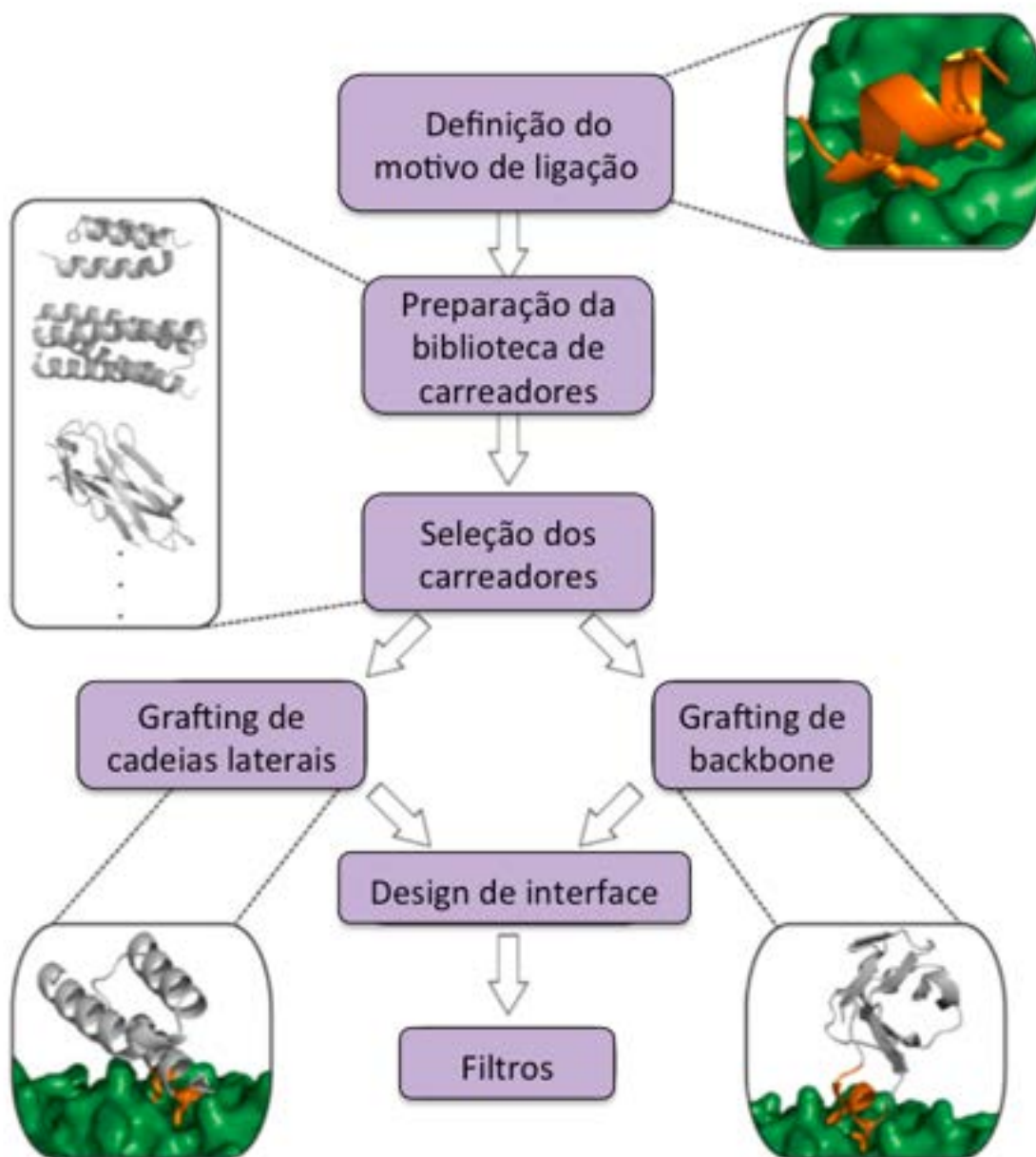
A função de energia consiste de uma soma em que cada termo de energia é ponderado, cujo peso é obtido empiricamente, alguns dos quais representam forças físicas como a interação eletrostática e as interações de van der Waals, enquanto outros representam termos

estatísticos de acordo com a população de estruturas disponíveis ecuradas no PDB. A atual função de energia utilizada pelo programa Rosetta é denominadaREF2015. Para detalhes dos termos energéticos e seus pesos, consultar (ALFORD et al., 2017).

2.11.2 Motifgraft e Design de Aptâmeros

O transplante de um motivo funcional em uma proteína estruturalmente estável (carreadora) tem se mostrado uma ferramenta eficaz para reproduzir a função de dada proteína em uma outra, e assim se mostra uma ferramenta eficiente na construção de aptâmeros. O transplante de motivo tem sido extensivamente usado para o desenvolvimento de novas moléculas, como inibidores de proteínas (KRITZER et al., 2006), antígenos (LU e HODGES, 2002; TRIPET et al., 2006; VIANA et al., 2013) ou enzimas (PARK et al., 2006). Recentemente, Tlatli e colaboradores realizaram o transplante de quatro resíduos N-terminais da metalopeptidase TIMP inibidor 2 (TIMP-2) em dez diferentes carreadores (do inglês, *scaffolds*) proteicos, as proteínas resultantes mantiveram a atividade de TIMP-2 para o alvo (TLATLI et al., 2013).

Esses trabalhos indicaram que a abordagem de transplante de motivo se mostrou útil no desenvolvimento de proteínas funcionais. Um protocolo (Figura 20) interessante para esse fim é o *motifGraft* do software Rosetta, a qual pode ser utilizada com o *RosettaScripts* para garantir maior flexibilidade (FLEISHMAN, SAREL J. et al., 2011). O *RosettaScripts* é uma linguagem em XML que permite ao usuário criar rotinas, especificando quais ferramentas de modelagem devem ser aplicadas aos arquivos de entradas (*input*), em um ordem definida (FLEISHMAN, SAREL J. et al., 2011; BENDER et al., 2016).

Figura 20- Fluxograma de trabalho do protocolo de *motifgraft*.

Fonte: Adaptado pelo autor de Silva *et al.*, (2016)

Os componentes do RosettaScripts se dividem em quatro categorias: 1) *Movers*, que são as ferramentas que modificam uma estrutura de algum modo (e.g. MotifGraft); 2) *Filtros*, que avaliam propriedades de uma estrutura e permitem ou não continuar o protocolo de acordo com os limites definidos (e.g. RMSD); 3) *TaskOperations*, que controlam os graus de liberdade dos *Movers*, como por exemplo a amostragem das cadeias laterais; e 4) *ScoreFunctions*, que determina a função de energia que irá avaliar a energia das estruturas de saída (*output*) (FLEISHMAN, SAREL J. *et al.*, 2011; BENDER *et al.*, 2016).

O protocolo usado pelo *motifGraft* do *software* Rosetta consiste em inicialmente encontrar fragmentos nos carreadores que sejam compatíveis com os motivos e, em seguida, substituir esses fragmentos pelos motivos. Na etapa de alinhamento entre motivos e a proteínas que irá carrear-lo, algumas condições devem ser levadas em questão, como por exemplo limitar o RMSD (Desvio quadrático médio das posições atômicas, do inglês *Root Mean Square deviation*) entre os *backbones* a um valor máximo. Desta forma se o alinhamento entre as estruturas não obedecerem a esse critério, é descartado e passa-se para a próxima proteína que poderá ser utilizada como suporte.

Após o alinhamento pode-se escolher entre manter o *backbone* do carreador e transplantar apenas as cadeias laterais dos motivos (*side-chain grafting*) ou ainda descartar os elementos estruturais do carreador, substituindo-o totalmente pelo motivo estrutural do enxerto (*backbone-grafting*). Os autores do protocolo colocam como sugestão que o transplante de cadeia lateral deva ser tentado primeiro, uma vez que realiza o mínimo de alterações na proteína carreadora, aumentando assim as chances de obter estruturas com enovelamento correto durante a validação experimental (SILVA *et al.*, 2016).

Ao final do procedimento de MotifGraft, as estruturas puderam ser filtradas utilizando critérios tais como: menor energia de ligação ao alvo, qualidade do núcleo hidrofóbico e probabilidade da proteína se enovelar corretamente. Neste último caso, pode-se realizar uma predição de *denovo design* para investigar se há a formação do funil de enovelamento para a nova proteína e a dinâmica molecular a fim de avaliar a estabilidade da proteína ao longo do tempo.

2.11.3 Ancoragem Molecular

A ancoragem molecular, também conhecida como *docking molecular*, consiste em simulação computacional através da qual é possível prever interações entre duas estruturas, que podem estar entre uma proteína e um ligante ou entre duas proteínas. Neste acoplamento, as interações eletrostáticas, Van der Waals, Coulombic e pontes de hidrogênio podem ser consideradas. A soma das interações entre as duas estruturas é aproximada por um *score* de *docking* que indica seu potencial de ligação (PAGADALA *et al.*, 2017).

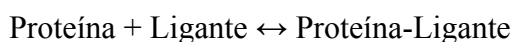
As técnicas de ancoragem molecular visam prever o melhor modo de ligação correspondente de um ligante a um parceiro macromolecular (aqui apenas as proteínas são consideradas). Consiste na geração de um número de possíveis conformações/orientações, isto é, poses, do ligante dentro do sítio de ligação da proteína. Por essa razão, a disponibilidade da

estrutura tridimensional do alvo molecular é uma condição necessária; pode ser uma estrutura experimentalmente resolvida (tal como por cristalografia de raios X ou RMN) ou uma estrutura obtida por técnicas computacionais (como modelagem de homologia) (SALMASO *et al.*, 2018).

A ancoragem molecular é composta principalmente por duas etapas: Amostragem de conformações/orientações e uma outra de função de pontuação, que associa uma pontuação a cada pose prevista (ABAGYAN e TOTROV, 2001; KITCHEN *et al.*, 2004; HUANG e ZOU, 2010). O processo de amostragem deve efetivamente procurar o espaço conformacional descrito pela superfície de energia livre, onde a energia, no encaixe, é aproximada pela função de pontuação. A função de pontuação deve ser capaz de associar a conformação ligada nativa ao mínimo global da hipersuperfície de energia.

A ancoragem molecular usa um algoritmo de busca estocástico ou aleatório e, portanto, pode ser limitado pelo tempo alocado à pesquisa. Há um *trade-off* óbvio entre precisão e tempo, pois quanto mais tempo o processo for permitido, mais provável será encontrar a conformação mínima global. Isso pressupõe que essa conformação de energia mais baixa é de fato a orientação biologicamente relevante, no entanto, isso nem sempre é o caso, como nos modelos de estado de transição. Além disso, orientações dentro de uma energia profunda e estreita dentro da superfície energética, podem não ser a orientação nativa mais preferida, uma vez que considerações entrópicas são amplamente ignoradas neste método (LOHNING *et al.*, 2017).

O principal objetivo destes métodos é o cálculo da energia livre de ligação não-covalente entre duas moléculas. Essa interação pode ser representada como:

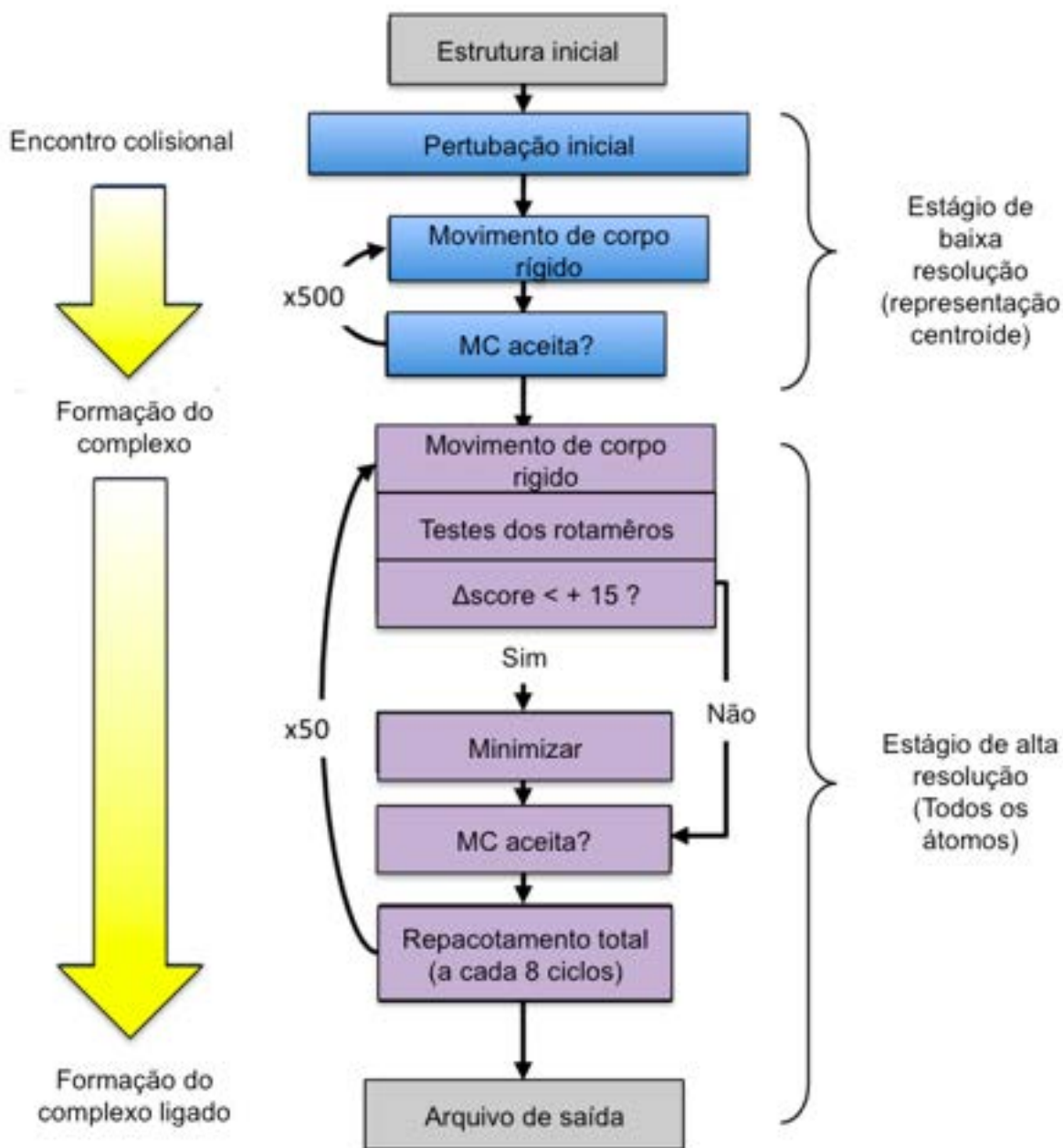


Onde Proteína-Ligante representa o complexo com as modificações estruturais que ocorrem em ambos durante a interação. A energia livre de ligação pode ser obtida por:

$$\Delta\Delta G_{\text{Ligação}} = \Delta G(\text{Proteína-Ligante}) - \Delta G(\text{Proteína}) - \Delta G(\text{Ligante})$$

RosettaDock tem sido um dos métodos de melhor desempenho para ancoragem computacional proteína-proteína (GRAY, MOUGHON, KORTEEMME, *et al.*, 2003; DAILY, M. D. *et al.*, 2005; CHAUDHURY *et al.*, 2007; SIRCAR *et al.*, 2010; KILAMBI *et al.*, 2013). Esse algoritmo de ancoragem proteína-proteína começa com uma busca de baixa

resolução seguida por um estágio de refinamento de alta resolução no qual os graus de liberdade de cadeias laterais e corpos rígidos são otimizados simultaneamente usando um protocolo de minimização de Monte Carlo (GRAY, MOUGHON, WANG, *et al.*, 2003). Normalmente, o algoritmo começa a partir de uma orientação inicial aleatória dos dois parceiros (*dockingglobal*) ou de uma orientação inicial (Figura 21) que é perturbada aleatoriamente a partir de uma posição inicial definida pelo usuário (perturbação local). A partir daí, as proteínas são representadas de forma simplória, onde as cadeias laterais são substituídas por um único pseudo-átomo unificado, ou centróide. Durante esta fase, uma pesquisa de Monte Carlo (MC) em 500 etapas (ancoragem de baixa resolução) é feita com rotação adaptativa e etapas de translação ajustadas dinamicamente para atingir uma taxa de aceitação de 25%. Cada conformação é pontuada usando a função de energia de baixa resolução, consiste principalmente de um termo de 'colisão', um termo de contato e um ambiente de resíduo estatístico específico de ancoragem e um potencial de pares de resíduo-resíduo (GRAY, MOUGHON, WANG, *et al.*, 2003; KAUFMANN *et al.*, 2010).

Figura 21- fluxograma de trabalho do *RosettaDock*.

Fonte: Adaptado pelo autor de Chaudhury *et al.*, (2011).

Quando o estágio do modo centróide estiver concluído, a estrutura de energia mais baixa acessada durante esse estágio é selecionada para refinamento de alta resolução. Durante o refinamento de alta resolução, os pseudo-átomos do centróide são substituídos pelos átomos da cadeia lateral em suas conformações iniciais não ligadas. Então 50 etapas MC são feitas em que a (1) posição do corpo rígido é perturbada por uma direção aleatória e magnitude especificada por uma distribuição Gaussiana em torno de 0.1 Å e 3.0 °, (2) a orientação do corpo rígido é minimizada por energia, e (3) as conformações da cadeia lateral são otimizadas com *RotamerTrials* (WANG *et al.*, 2005), seguido de um teste dos critérios da Metropolis. A

cada oito etapas, uma otimização de cadeia lateral combinatória adicional é realizada usando o algoritmo completo de empacotamento da cadeia lateral, seguido por uma verificação adicional de critérios Metropolis. Para reduzir o tempo dedicado à minimização de energia computacionalmente para movimentos improdutivos do corpo rígido, a minimização é ignorada se um movimento de corpo rígido resultar em uma mudança na pontuação maior que +15. A função de *score* de todos os átomos usada neste estágio consiste basicamente de termos atrativos e repulsivos de Van der Waals, um termo de solvatação, um termo de ligação de hidrogênio explícito, um termo de interação par de resíduo resíduo de estatística, um termo de energia conformacional de cadeia lateral interna. e um termo eletrostático

Para alvos específicos, uma variedade de estratégias de amostragem do *RosettaDock* é frequentemente usada para melhorar a chance de alcançar uma previsão precisa da estrutura (DAILY, MICHAEL D. *et al.*, 2005). Se nenhuma informação bioquímica ou estrutural prévia é conhecida sobre a interação de interesse da proteína, o encaixe global é usado para randomizar as posições iniciais de encaixe. A partir daí, os filtros de pontuação e agrupamento são usados para identificar grupos de estruturas aceitáveis de baixa energia para posterior ancoragem e refinamento. Na maioria dos casos, há alguma informação conhecida sobre o complexo, seja na forma de complexos proteicos relacionados, seja em dados bioquímicos ou de bioinformática que identificam prováveis regiões de interação nos parceiros protéicos. Nesses casos, os usuários organizam manualmente a posição inicial de encaixe para uma configuração compatível com as informações e executam uma perturbação de encaixe local. Além disso, os usuários podem definir filtros baseados na distância que distorcem a amostragem em relação às posições de encaixe que são compatíveis com as restrições especificadas (DAILY, MICHAEL D. *et al.*, 2005). Se as mudanças conformacionais do *backbone* forem antecipadas, estratégias apropriadas de amostragem de *backbone* são prescritas (WANG *et al.*, 2007; CHAUDHURY e GRAY, 2008; SIRCAR *et al.*, 2010; SIRCAR e GRAY, 2010).

Dois critérios interessantes para filtrar os *designs* são a energia de ligação (*bindingenergy*) e o *interfacescore*. A energia de ligação para um modelo de encaixe é calculada como a diferença entre a energia do complexo e a energia dos parceiros isolados após o relaxamento estrutural das cadeias laterais. Dez cálculos de reempacotamento independentes são realizados e aquele com menor energia será escolhido como o estado de referência para calcular a energia de ligação. Já o *interface* para um modelo de encaixe é calculado como a diferença entre a energia para o complexo e a energia dos parceiros separados, sem permitir qualquer relaxamento estrutural. Esse parâmetro relata interações

intermoleculares na interface do modelo. Modelos com energia de interface positiva geralmente mostram conflitos atômicos não resolvidos e são excluídos de análises posteriores (WANG *et al.*, 2007).

Outra forma de filtrar as estruturas e avaliar a qualidade é através dos critérios de ranqueamento utilizado pela CAPRI (Avaliação Crítica de Interações Previstas, *do inglês Critical Assessment of Predicted Interactions*) (MÉNDEZ *et al.*, 2003), uma iniciativa para testar algoritmos computacionais em previsões às cegas de estruturas 3D de complexos de proteínas determinados experimentalmente. Os objetivos dos experimentos feitos na CAPRI é avaliar o desempenho dos procedimentos de docagem disponíveis, identificando aplicações úteis dos métodos disponíveis na genômica estrutural e proteômica. Os grupos participantes recebem estruturas recém-determinadas de complexos proteína-proteína e tentam prever as interações do mesmo e depois esses resultados são confrontados com os dados experimentais.

As estruturas são agrupadas em quatro categorias com base nos três parâmetros de ranqueamento fornecidos pelo *docking* proteína-proteína: f_{nat} , L_RMS e I_RMS. Essas categorias são classificadas em altamente precisas, de média precisão, aceitáveis e incorretas, sendo as previsões da última categoria consideradas equivalentes a soluções aleatórias. Os intervalos de parâmetros usados para definir essas categorias estão resumidos na Tabela 1. Pode-se observar uma correlação entre os diferentes parâmetros, particularmente entre a fração de contato nativa e o I_RMS, embora principalmente para previsões razoavelmente próximas da solução correta.

Tabela 1- Critérios de classificação CAPRI para predição de interação

Classificação	f_{nat}	L_rms	ou I_rms
Alto	≥ 0.5	≤ 1.0	ou ≤ 1.0
Médio	≥ 0.3	$1.0 < x \leq 5.0$	ou $1.0 < x \leq 2.0$
Aceitável	≥ 0.1	$5.0 < x \leq 10.0$	ou $2.0 < x \leq 4.0$
Incorreto	< 0.1		

Fonte: Adaptado pelo autor de Méndez *et al.*, (2003).

O *RosettaDock* recuperou com sucesso estruturas nativas de 42 dos 54 alvos de referência dos quais as cadeias laterais foram removidas. Começando com proteínas colocadas aleatoriamente, o *RosettaDock* prevê mais de 50% dos contatos da interface, 23 de

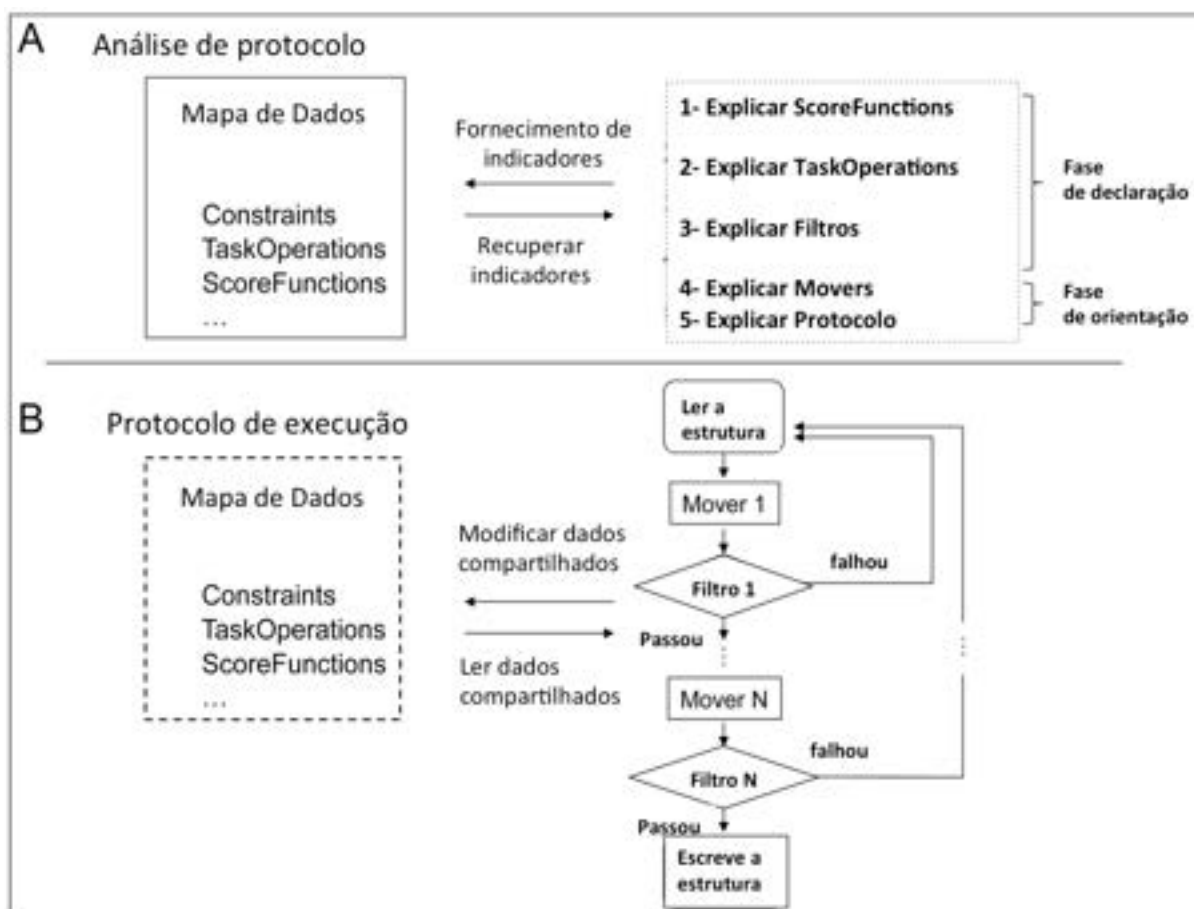
32 *benchmark* alvos (GRAY, MOUGHON, WANG, *et al.*, 2003). Estes resultados melhoraram com a adição de flexibilidade do *backbone* (WANG *et al.*, 2007) e amostragem conformacional (CHAUDHURY e GRAY, 2008).

O *RosettaDock* tem sido usado para prever as estruturas de antígeno protetor do antraz (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2008) e fator de crescimento epidérmico (SIVASUBRAMANIAN *et al.*, 2006), ligado a anticorpos monoclonais. Ambos os estudos de *docking* levaram a estruturas de interface previstas consistentes com mutantes conhecidos e o conhecimento das interações foram utilizados para selecionar resíduos para mutagênese dirigida.

A função de energia do *docking* consiste de interações de atração e repulsão de Van der Waals, um implícito termo de solvatação, energia de ligação de hidrogênio, um termo de interação de paridade resíduo-resíduo estatístico, um termo de probabilidade de rotâmetro e um termo de energia eletrostática emparelhada (GRAY, MOUGHON, KORTEMME, *et al.*, 2003; GRAY, 2006).

2.11.4 Desenho da Interface

O algoritmo RosettaDesign é um processo interativo que otimiza energeticamente ambas estruturas e sequência das proteínas (KUHLMAN *et al.*, 2003). O protocolo faz uso de ancoragem de corpo rígido, *backbone* e minimização e empacotamento de cadeia lateral, projeto de sequência e uma combinação de funções de pontuação que incentiva uma maior diversidade de sequência. Muitas vezes, certas propriedades estruturais e energéticas devem ser retidas ao longo de uma trajetória, como a energia de ligação calculada ($\Delta\Delta G$), a presença de pontes de hidrogênio particulares ou a raiz do desvio quadrático médio da estrutura inicial (RMSD, do inglês *Root Mean Square Deviation*). A versatilidade do RosettaScripts (Figura 22) permite ao usuário combinar um conjunto de movimentadores (*movers*) e filtros para garantir que essas propriedades sejam mantidas. O exemplo de protocolo abaixo começa com o *docking* de alta resolução com penalidades *soft*-repulsivas. Ele usa interações em uma série de movimentadores (*movers*) de projeto combinados com amostragem conformacional sutil definida através do *moverBackrub* (DAVIS *et al.*, 2006; SMITH e KORTEMME, 2008).

Figura 22- Esquemática operacional do *RosettaScript*

Fonte: Adaptado pelo autor de Fleishman, Sarel J. *et al.*, (2011).

Em cada trajetória, desse protocolo executaria uma etapa de encaixe e, em seguida, torna a repetir 10 vezes (por meio do uso do movimentador GenericMonteCarlo) em um conjunto de etapas de *design* e amostragem de *backbone* (*Backrub*). A saída incluirá a estrutura da proteína modificada, a energia de ligação calculada ($\Delta\Delta G$), a área superficial enterrada após a formação complexa (*sasa*) e o RMSD da estrutura inicial (RMSD). Normalmente, vários milhares de modelos devem ser executados com este script e as mutações nas interfaces combinadas para restringir o espaço de sequência para bibliotecas experimentais (FLEISHMAN, SAREL J. *et al.*, 2011).

2.11.5 Mecânica molecular

A mecânica molecular usa campos de força para calcular a energia potencial de um sistema. Está baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, dentro desta aproximação os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente, devido às

diferentes escalas de tempo e energia dos movimentos nucleares e eletrônicos. Neste contexto a mecânica molecular é caracterizada por considerar os movimentos nucleares e por tratar os elétrons implicitamente através dos cálculos de cargas parciais, diferindo dos métodos quânticos de orbitais moleculares, caracterizados por estudar a estrutura eletrônica, para uma posição nuclear fixa.

Na mecânica molecular é suposto que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer alteração na configuração geométrica dos núcleos, assumindo que os núcleos possuem movimento livre e que todas as interações nucleares são aditivas. A superfície de Born-Oppenheimer, conhecida na mecânica molecular como superfície de energia potencial, é multidimensional e descreve a energia de uma molécula em termos das posições nucleares. Esta superfície possui mínimos locais em relação a uma ou algumas conformações moleculares estáveis e, em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial.

Cálculos de mecânica molecular utilizam uma série de equações derivadas empiricamente, cujo formalismo matemático está baseado num modelo de mecânica clássica de estrutura molecular. O modelo da mecânica molecular considera as moléculas como uma coleção de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas. Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, e.g. comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos diedros (φ) e interações não ligadas (d). O conjunto destas funções é conhecido como campo de força empírico. O campo de força representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência, em um determinado sistema de coordenadas:

$$U = \sum U(r) + \sum U(\theta) + \sum U(\varphi) + \sum U(d) + \dots$$

U_θ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor ideal, U_φ é a energia devido a torção em torno de uma ligação e U_d é a energia da interação entre átomos não ligados. Outras interações intramoleculares que afetam a energia, como as interações eletrostáticas ou ligações hidrogênio, também podem ser adicionadas ao campo de força, assim como as interações cruzadas, representadas pelos chamados termos cruzados, as quais consideram um certo número de interações entre comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros, interações carga-carga e interações dipolo-dipolo (FREDDOLINO *et al.*, 2010).

2.11.6 Campo de força

A maioria dos campos de força utilizados em simulações MD de proteínas compartilham um número significativo de semelhanças. Termos harmônicos descrevem comprimentos e ângulos de ligação, séries de Fourier descrevem torções e interações atômicas em pares são descritas usando uma função de Lennard-Jones e uma função de Coulomb. Normalmente, embora nem sempre, os parâmetros são obtidos primeiro para sistemas de proteínas e os parâmetros subsequentes são derivados para ácidos nucleicos, lipídios e outras moléculas biológicas de forma que sejam consistentes com o conjunto de proteínas. As principais diferenças entre os vários campos de força resultam das diversas abordagens adotadas para derivar os parâmetros individuais. Os mais usados na dinâmica molecular são CHARMM (MACKERELL *et al.*, 1998), AMBER (CORNELL *et al.*, 1996), OPLS (JORGENSEN e TIRADO-RIVES, 1988) and GROMOS (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

No presente trabalho, o campo de força utilizado foi o GROMOS53A6, parametrizado por Oostenbrink *et al.* (2004). Desde o início dos anos 1980, o pacote de software *Groningen Molecular Simulations* (GROMOS) tem sido desenvolvido em conjunto com funções de interações interatômicas para simulações por dinâmica molecular de sistemas biológicos. A ideia básica por trás deste campo de força é obter um balanço preciso entre a descrição da energia de interação como função da conformação por um lado, e uma forma funcional relativamente simples por outro (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). A parametrização do campo de força GROMOS é baseada principalmente para reproduzir as energias livres de hidratação e solvatação apolares para uma gama de compostos (SCHULER *et al.*, 2001; OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

Em uma simulação clássica de dinâmica molecular, todos os graus de liberdade que são tratados explicitamente são propagados no tempo de acordo com as leis físicas apropriadas. Para isso, é necessária uma descrição do Hamiltoniano do sistema, compreendendo todas as contribuições de energia nas quais esses graus de liberdade participam. No campo de força GROMOS, um sistema molecular é tratado a nível atômico; cada átomo tem três graus de liberdade e o momento conjugado associado. No campo de força GROMOS os átomos de carbono alifáticos são tratados como átomos unidos, isto é, o carbono e os hidrogênios que são ligados a ele são tratados como um único átomo, reduzindo assim os graus de liberdade que são explicitamente simulados e isto produz uma redução do esforço computacional (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

2.11.7 Dinâmica Molecular (DM)

As simulações de dinâmica molecular (DM) fornecem informações detalhadas sobre o comportamento de um sistema e sua evolução temporal em escala molecular (KARPLUS e MCCAMMON, 2002; SALSBURY, 2010). Estas simulações podem capturar uma variedade de processos biomoleculares, incluindo mudanças conformacionais, enovelamento de proteína e ligação de ligantes, revelando a posição de todos os átomos ao longo do tempo. As simulações podem também prever como biomoléculas vão responder, a nível atômico, a perturbações como mutações, fosforilação, protonação ou adição ou remoção de ligantes.

Uma simulação realística pode prever teoricamente as propriedades desejáveis de materiais e somente aqueles potencialmente “promissores” viriam a ser investigados do ponto de vista experimental. Inicialmente desenvolvida para simular sistemas simples, com a primeira aplicação no estudo de colisões entre esferas rígidas, em 1957 (ALDER e WAINWRIGHT, 1957). A primeira simulação por DM de uma biomolécula foi realizada em 1977 por McCammon et al. (MCCAMMON *et al.*, 1977).

A energia potencial de interação entre átomos ligados (principalmente incluindo o alongamento de ligação, flexão de ângulo e energias diédricas) ou não-ligado (incluindo van der Waals e energias eletrostáticas) é usada para determinar a dinâmica dos sistemas de átomos. A partir das coordenadas, a posição inicial e as velocidades iniciais dos átomos, a força e a aceleração são calculadas segundo as equações de Newton, a fim de obter uma trajetória temporal.

A dinâmica molecular computa os movimentos dos átomos ao longo do tempo pela integração das equações de Newton dos movimentos (mecânica clássica), relatadas na seguinte equação (ADCOCK e MCCAMMON, 2006).

$$d^2r_i(t)/dt^2 = F_i(t)/m_i$$

com $F_i(t)$ força exercida no átomo i no tempo t , $r_i(t)$ posição do vetor do átomo i no tempo t , m_i massa do átomo. Devido às interações entre partículas, o sistema é capaz de manter tanto o equilíbrio mecânico, quanto térmico, e no caso de perturbações externas o sistema pode atingir uma nova configuração de equilíbrio.

A equação descreve o movimento de uma partícula de massa m_i ao longo da coordenada r_i , sendo $F_i(t)$ a força da partícula nesta direção. Em um sistema contendo várias partículas, a interação entre elas é descrita pelo potencial obtido através do campo de força (V_{total}). Assim, a força $F_i(t)$ depende da posição de todos os átomos do sistema, obtida através do gradiente de potencial.

Comumente, é importante simular com precisão as condições experimentais a serem replicadas. O campo de força e os vários valores para condições físicas, tais como pressão e temperatura devem ser considerados na simulação (ADCOCK e MCCAMMON, 2006). Um *ensemble* é uma coleção de todos os possíveis sistemas que tenham estados microscópicos diferentes, porém pertencem a um único estado termodinâmico macroscópico (GREENWALD et al., 2002). Dentre os diferentes *ensembles* existentes, os mais amplamente simulados estão: o *ensemble* canônico (NVT), onde são fixados o número de átomos, N, volume, V, e temperatura, T, e o *ensemble* isobárico-isotérmico (NPT), onde são fixados os números de átomos, N, pressão, P, e temperatura T.

2.11.8 Condições Periódicas de Contorno

Uma gama de condições experimentais pode ser simulada por DM. As primeiras simulações de proteínas consideravam as moléculas como entidades isoladas, efetivamente no vácuo. Os sistemas simulados posteriores foram inseridos a uma caixa de simulação que além das moléculas de interesse contém o solvente. No caso da DM pode-se utilizar solvente explícito, uma das vantagens da técnica, pois confere ao sistema simulado uma maior similaridade ao nível macroscópico. Dessa forma, ocasiona dois problemas a serem contornados visto que afetam significativamente os resultados finais:

- Efeito de superfície: as moléculas da margem da caixa de simulação estão sujeitos a forças diferentes daquelas do centro (HINCHLIFFE, 2003);
- Número de átomos limitado: a quantidade de partículas dentro da caixa é da ordem de 10^5 - 10^6 , valor pequeno quando comparado aos sistemas macroscópicos que apresentam número de átomos da ordem de Avogadro (VAN GUNSTEREN et al., 2006).

Para eliminar esses efeitos aplicam-se as condições periódicas de contorno que consistem na realização de cópias da caixa de simulação em todas as direções. Trata-se de uma abstração em que uma molécula ao sair de um lado da caixa original tem sua imagem entrando na face oposta com mesma velocidade ao longo de toda a simulação. As condições de contorno periódicas não são restritas a sistemas cúbicos. Outras geometrias são usadas,

incluindo o dodecaedro rômico (WANG *et al.*, 1972) e o octaedro truncado (ADAMS *et al.*, 1979). Estas condições podem reduzir significativamente o número de átomos de solvente necessários no sistema, levando a uma redução correspondente nos requisitos computacionais.

3 JUSTIFICATIVA

Embora a infecção pelo CHIKV seja responsável por muitos prejuízos para a saúde pública até o momento não existem vacinas licenciadas ou medicamentos antivirais, sendo o tratamento da infecção totalmente sintomático, o que torna importante a busca por estratégias profiláticas e terapêuticas que ajudem a diminuir os casos de infecção pelo CHIKV e, conseqüentemente, os casos graves e crônicos desta doença. Estudos apontam para a presença de epítomos neutralizantes na proteína E2 (altamente imunogênica) do CHIKV e que o uso de anticorpos monoclonais contra essa proteína, inibiram a infecção em várias etapas no ciclo de vida viral e conseguiu proteger *in vivo* contra a patogênese da doença em camundongos. Desta maneira a produção de moléculas neutralizantes contra epítomos do domínio B da proteína E2 (E2B), podem ser alvo estratégico para o desenvolvimento de vacinas e imunoterapias contra o CHIKV. Os aptâmeros (miméticos de anticorpos) podem ser uma alternativa ao uso de anticorpos, devido às suas vantagens de produção e nas propriedades químicas. Os aptâmeros podem ser engenheirados com auxílio de metodologias computacionais para aumento de estabilidade térmica (reduzir a necessidade do sistema de cadeia de frio), ganho de afinidade e especificidade. Nesta perspectiva, o presente trabalho apresenta aptâmeros desenhados computacionalmente para reconhecer a E2B, com potencial de uso terapêutico contra o CHIKV.

Hipótese:

Diante do justificado acima, a hipótese do presente estudo é que moléculas inspiradas em anticorpos neutralizantes (aptâmeros) dirigidas contra epítomos específicos do domínio B da proteína E2 podem ser desenhadas computacionalmente e apresentar capacidade de ligar-se ao CHIKV com alta afinidade e neutralizar a infecção em ensaios *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenhar computacionalmente moléculas inspiradas em anticorpos neutralizantes dirigidas contra epítomos específicos do domínio B da proteína E2 que apresentem capacidade de ligar-se ao CHIKV com alta afinidade e neutralizar a infecção *in vitro*.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Construir um modelo para estudar as interações moleculares do domínio Fab do anticorpo (CHIKV 265) neutralizante e epítomos do domínio B da proteína E2 do CHIKV ;
- b) Projetar aptâmeros baseados no desenho de interface proteína-proteína;
- c) Avaliar a interação *in silico* dos aptâmerosconstruídos com a proteína E2B-CHIKV e otimizar as interações na interface para aperfeiçoar a afinidade de ligação;
- d) Avaliar a estabilidade e a dinâmica conformacional dos aptâmeros por cálculos teóricos;
- e) Produzir e avaliar a imunorreatividade das proteínas desenvolvidas;
- f) Verificar a capacidade de neutralização viral dos anticorpos sintéticos;
- g) Avaliar a estabilidade das proteínas desenvolvidas.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os tópicos a seguir trazem os processos metodológicos usados na construção deste trabalho.

5.1 Local do Experimento

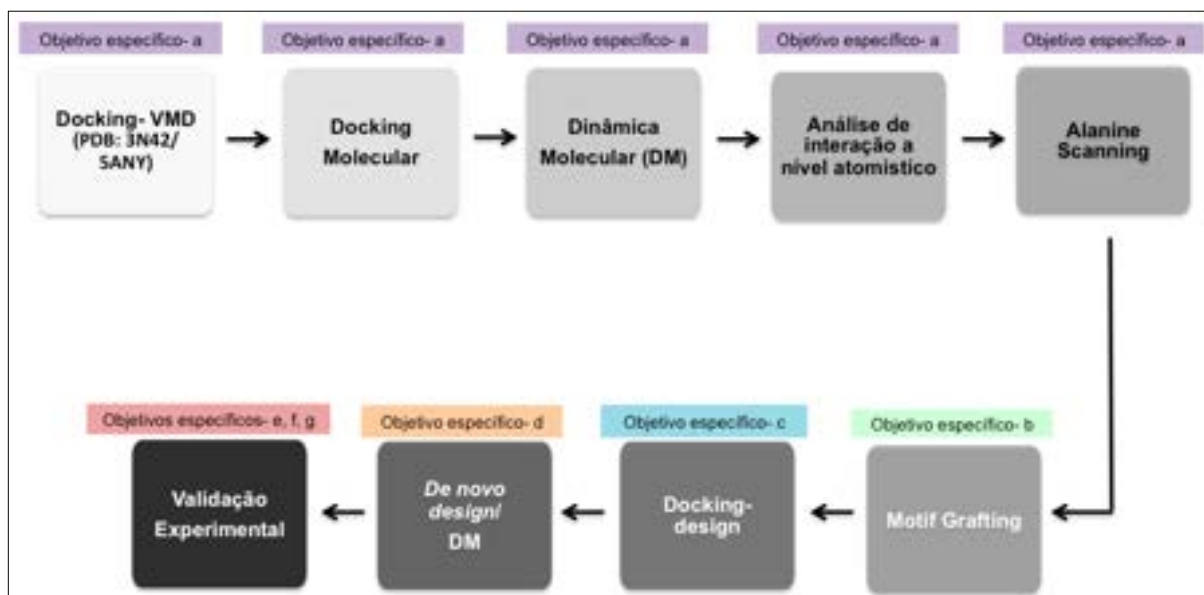
O projeto foi desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Pernambuco) que contém laboratórios de pesquisa e inovação e forneceu toda infraestrutura necessária. O IAM apresenta computadores e equipamentos laboratoriais modernos que viabilizaram a execução deste projeto. Além de contarmos com o apoio do Laboratório Nacional de Computação Científica-LNCC, com horas alocadas no supercomputador Santos Dumont.

Todos os procedimentos operacionais padrão usados na FIOCRUZ-Pernambuco seguiram os regulamentos de biossegurança descritos no Plano Quadrienal da FIOCRUZ 2005/2008, e ISO 17025, além de conter todos os equipamentos requeridos para nível de segurança 2, de acordo com a Lei 11.105/2005 da CTNBio.

5.2 Metodologia Computacional

Uma visão geral, sequencial e resumida das metodologias computacionais utilizadas nesse trabalho, finalizando com a seleção dos aptâmeros para produção e validação em laboratório, descrita na Figura 23.

Figura 23- Esquema metodológico das etapas realizadas para o desenvolvimento e caracterização dos aptâmeros neutralizantes para CHIKV



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Cada etapa implicada no esquema metodológico apresenta uma metodologia de forma sequencial para desenho dos aptâmeros respondendo os objetivos específicos proposto por essa tese para o desenvolvimento *in silico* e posterior caracterização *in vitro* dos aptâmeros neutralizantes dirigidos a E2B do CHIKV, mas que também neutralizam de forma cruzada o MAYV, outro alfavírus.

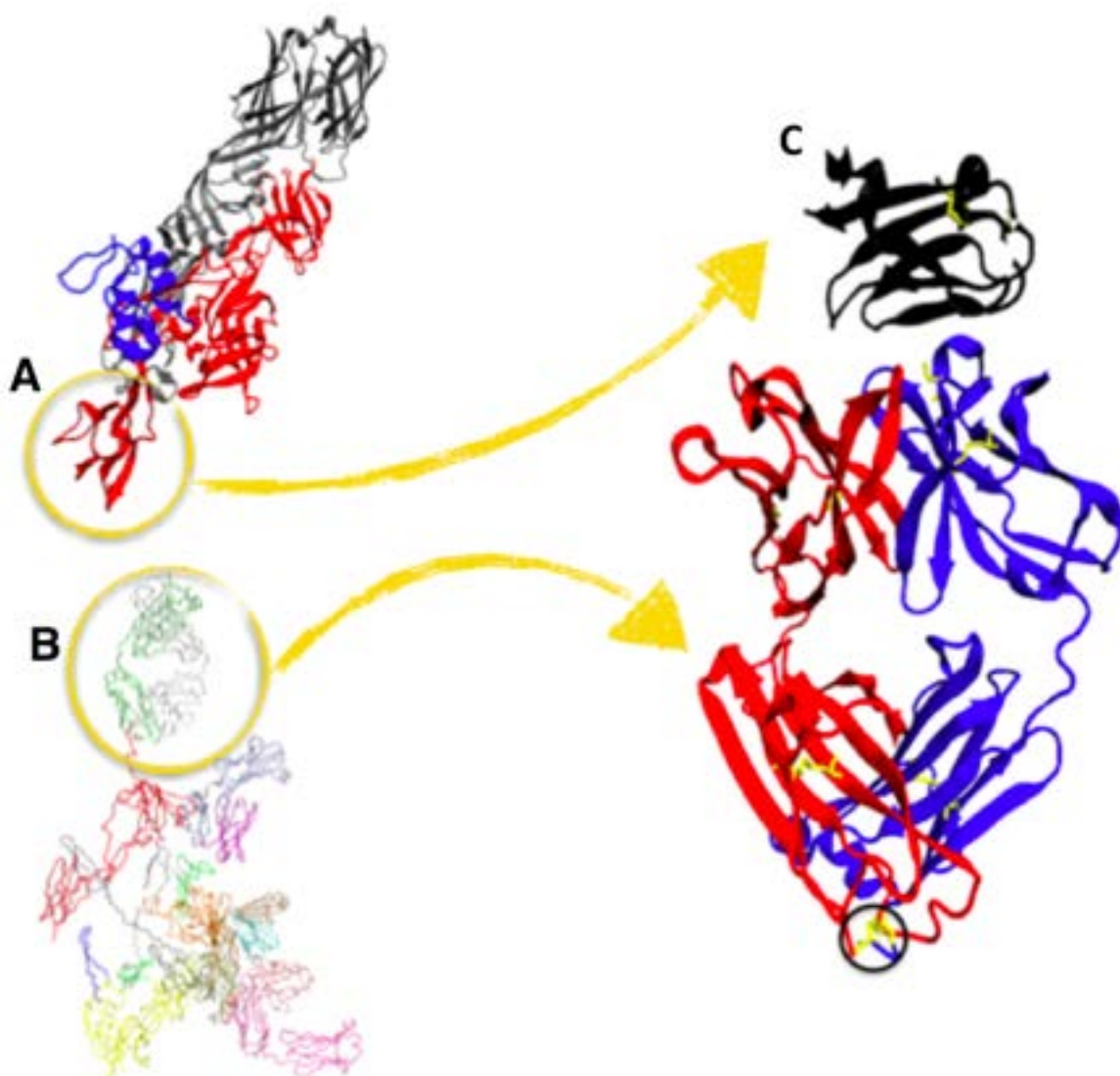
5.2.1 Montagem de um complexo antígeno-anticorpo modelo para estudo das interações de interface proteína-proteína

Diante da falta de uma estrutura de boa resolução, a primeira etapa deste trabalho foi montar um complexo para estudo das interações da interface antígeno (E2B) e o anticorpo (Fab-CHIKV 265) e assim rastrear resíduos determinantes para reconhecimento e que estariam por trás do processo de neutralização do CHIKV e de outros alfavírus como colocado em trabalho de FOX e colaboradores (2015). Para montar este complexo a estrutura tridimensional do complexo mAb-Antígeno (PDB: 5ANY, cadeias leves e pesadas, Fab-CHIKV 265 e PDB: 3N42, domínio E2B) (Figura 24) foi predita por ancoragem molecular.

Apesar da existência do complexo fragmento Fab com a E2B, o mesmo apresentava baixa resolução (16.9Å) (resoluções ideais estão entre os valores de 1,8Å – 3,2Å) (Figura 24-B). Na estrutura de referência utilizada (PDB: 5ANY), as cadeias leves e pesadas do anticorpo, se encontrava com 3 resíduos (Ala, Asp, Cys) faltosos e que foram adicionados utilizando o programa Swiss-PDBViewer (<https://spdbv.vital-it.ch/>). Posteriormente, foi feita a aproximação dos resíduos de Cys com a finalidade de que fossem formadas as pontes dissulfeto entre as duas cadeias (Figura 24). Inicialmente, as estruturas isoladas do mAb e

antígeno foram posicionadas através do programa VMD (*Visual Molecular Dynamics* (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)) de modo que a interface de interação fosse direcionada para os resíduos mapeados na E2B (Asp214; Lys189; Gln184; Ser185; Lys215; Val216; Asn187; Asn219; Asn218; Ser206; Gly205), os quais foram descritos por FOX e colaboradores, (2015) como críticos para a interação. Em seguida, para ter aprimoramento do encaixe desse complexo, o modelo gerado foi refinado por ancoragem molecular.

Figura 24- Representação da seleção das estruturas para construção do complexo para estudo da interação de interface antígeno-anticorpo



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: (A) Representação em *new cartoon* da estrutura cristalina do complexo glicoproteico de envelope maduro do CHIKV, resolvido por difração de raios X, PDB:3N42 com resolução: 3Å. Circulado o domínio B da E2 de CHIKV (59 resíduos) (B) Representação em *new cartoon* do complexo glicoproteico e anticorpo neutralizante Fab-CHIKV 265, PDB:5ANY, obtido por microscopia eletrônica, resolução: 16.9Å. Circulado no mAb CHIK-265 a cadeia leve denominada como I no PDB de origem, contendo 218 resíduos e a pesada M,

com 211 resíduos, PDB: 5ANY. (C) Representação *new cartoonda* E2B, em preto, contendo 59 resíduos, PDB:3N42. Representação *new cartoon* da cadeia pesada (I), colorida em vermelho, contendo 218 resíduos e a cadeia leve (M), em azul, contendo 214 resíduos (com os 3 resíduos faltosos, Ala, Asp e Cys). Em amarelo são destacadas as pontes dissulfeto e circuladas as pontes dissulfeto situadas entre as duas cadeias (IM) que foram adicionadas no modelo construído para estudo das interações moleculares proteína-proteína.

5.2.2 Refinamento do modelo por ancoragem molecular

A estrutura inicialmente construída, foi submetida a simulações de acoplamento de corpo rígido que foram realizadas usando a ferramenta *RosettaDock* do software Rosetta versão 3.7 (*University of Washington, Seattle, WA*; <http://www.rosettacommons.org>) (GRAY, MOUGHON, WANG, *et al.*, 2003). Essa categoria de análise permite estudar e prever interfaces de interação receptor/ligante, descobrir sítios de interação dos compostos, entender melhor sua funcionalidade, entre outros benefícios em nível molecular. De maneira resumida, o protocolo do *RosettaDock* foi executado em dois estágios, alta resolução e baixa resolução, no estágio de baixa resolução, a orientação inicial de duas proteínas são perturbadas. No estágio de alta resolução, refinamentos precisos das orientações do corpo rígido são realizados com base na representação de átomos completos do complexo protéico utilizado. O sucesso dessa etapa pode ser demonstrado pela a capacidade dos cálculos teóricos de visitar diversos acoplamentos de ambientes energéticos distintos, permitindo que as estruturas de menor energia de ligação e *interfacedscore* fossem selecionadas.

5.2.3 Avaliação das interações moleculares da interface do complexo por dinâmica molecular

Após criado o modelo antigo-anticorpo para estudar as interações de interface utilizando cálculos de ancoragem molecular, o complexo foi avaliado por meio de dinâmica molecular através do programa GROMACS 4.6.7 (HESS *et al.*, 2008). As simulações de dinâmica molecular têm sido empregadas para analisar sistemas biológicos a nível atômico. Essas análises aplicam as leis de Newton para analisar a evolução temporal do sistema, avaliando propriedades estáticas, dinâmicas, estruturais e de termodinâmicas. As proteínas foram centradas numa caixa cúbica e explicitamente solvatadas usando o modelo de água SPC (BERENDSEN *et al.*, 1981). Condiçõesperiódicas de contorno foram utilizadas nas direções x, y e z. Simulações de dinâmica molecular de 150ns de tempo de simulação foram realizadas usando o *ensemble* NPT e campo de forçaatômico GROMOS 53A6parametrizado por Oostenbrink *et al.* (2004) (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). As ligações de hidrogênio foram

restringidas usando o método LINCS (HESS *et al.*, 1997). As temperaturas dos solutos e do solvente foram acopladas separadamente a um termostato usando o esquema de reescalonamento de velocidade (BUSSI *et al.*, 2007), com temperatura de referência de 310K e tempo de relaxação de 0.5ps. A pressão foi mantida constante isotropicamente a 1.013bar utilizando um barostato de Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984), com tempo de relaxação de 0.5ps e compressibilidade (κT) de $4.5 \times 10^{-5} \text{bar}^{-1}$. Um raio de corte de 1.4 nm foi utilizado para interações não-ligadas de curto alcance. Interações de longo alcance foram levadas em conta usando o método de reação de campo (TIRONI *et al.*, 1995), com $\epsilon=66$ além do raio de corte de 1.4nm. Contra-íons foram adicionados aos sistemas para assegurar a eletroneutralidade e uma concentração salina de 0.150mM. Os sistemas foram inicialmente otimizados energeticamente usando 5.000 passos do algoritmo *steepestdescent*. A integração da dinâmica foi realizada usando um tempo de integração de 2fs baseado no algoritmo leapfrog (HOCKNEY, 1970).

Com base na simulação do complexo, os pares de resíduos interagentes na interface foram identificados. Para este fim, ligações de hidrogênio e ocupância de contato (TRIPATHI, *et al.*, 2017) foram calculadas. A ocupância corresponde à razão do número de estados durante o tempo simulado em que um resíduo específico interage com seu parceiro pelo número total de estados. Assim, as ocupâncias podem fornecer informações sobre o tempo de residência de uma interação de pares de resíduos. Os pares de resíduos foram considerados como resíduos interagindo a uma distância de 0,4nm. Para ligações de hidrogênio, uma distância entre acceptor e doador de 0,36nm e ângulo D-H-R de corte de 30° foram empregados como critério de formação de ligação de hidrogênio. Essas análises permitiram a triagem de contatos relevantes na interface.

5.2.4 Verificação da contribuição dos resíduos da interface por mutagênese computacional de varredura de alanina

Para avaliar se os contatos identificados eram funcionalmente relevantes, uma mutagênese computacional, do inglês *Alaninescanning*(AS) de varredura de alanina foi empregada para verificar a contribuição de cada resíduo na interface para a energia de ligação do complexo. Para esta análise, um resíduo foi considerado interagindo se estivesse dentro de 0,4nm da interface entre o Fab e a E2B. Cada resíduo interagente teve sua cadeia lateral substituída individualmente por um único grupo metil (resíduo de alanina) e os resíduos em um raio de 0,5nm de raio da mutação foram reempacotados. Os resíduos *hotspot* são definidos

como resíduos que apresentam uma variação na diferença de energia livre de ligação ($\Delta\Delta G$) $\geq 2,5$ kcal.mol⁻¹ quando substituídos por alanina e, portanto, são de grande relevância para a termodinâmica da ligação (KORTEMME *et al.*, 2004; KORTEMME *et al.*, 2009). Neste trabalho, 2,5 REU foi utilizado como limite para que um resíduo fosse considerado *hotspot*. Importante pontuar que a função de energia de Rosetta (ALFORD *et al.*, 2017) apresenta uma correlação de $R = 0,73$ para o cálculo da predição de $\Delta\Delta G$ a partir de um banco de dados de 1.210 mutações (KELLOGG *et al.*, 2011), portanto, neste caso, a equivalência entre REU e kcal.mol⁻¹ é justificável.

5.2.5 Desenho dos Aptâmeros

Finalizada a etapa de estudo de interação e entendendo quais os resíduos eram cruciais para reconhecimento de epitopos na E2B, passamos então a aplicar o conhecimento na construção dos aptâmeros. Para desenhar foi utilizada a abordagem *MotifGraft* para desenho de interface seguindo o protocolo de Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2016) do programa Rosetta v3.7 (LEAVER-FAY *et al.*, 2011), com auxílio de *scripts* em formato XML do RosettaScripts, adicionado no apêndice A dessa tese (FLEISHMAN, SAREL J. *et al.*, 2011).

Foram executadas as seguintes etapas, as quais estão esquematizadas em forma de fluxograma na Figura 20:

1. Definição do motivo de ligação para o desenho de interface. Motivo, que no presente trabalho foram os setes resíduos do Fab-CHIKV 265 (PDB:5ANY) (SER308; SER309; ASP329; THR330; ASN331; ASN332; TRP370), que foram selecionados com base nos cálculos de DM e mutagênese computacional do modelo criado para estudo de interação de interface;

2. Contexto (a proteína que interage com o motivo, a E2B (PDB:3N42) de CHIKV;

3. Construção de uma biblioteca de estruturas cristalográficas proteicas que servirão como possíveis proteínas carreadoras. A Lista de posições (biblioteca de proteínas, na qual o *mover* vai tentar inserir o motivo. Para preparar essa biblioteca, foram selecionadas 2500 estruturas do PDB (www.rcsb.org). Através, do PDB realizou-se uma busca de estruturas, para tal biblioteca, foram selecionadas todas as estruturas tendo por base os seguintes critérios: Alta resolução (<2.5Å), expressão bacteriana em *E. coli*, proteína de cadeia simples, não ter ligantes e tamanho variando de 100 a 300 aminoácidos.

3. Alinhar estruturalmente o motivo à proteína carreador de modo a determinar qual a melhor região para o transplante. A biblioteca de carreadores foi então escaneada

computacionalmente para verificar possíveis locais que se pudesse inserir os resíduos do Fab-CHIKV-265 (PDB:5ANY) (SER308; SER309; ASP329; THR330; ASN331; ASN332; TRP370).

4. Transplantar o motivo através da transferência de cadeias laterais “enxerto de cadeia lateral”. Neste protocolo se os *backbones* do motivo e dos carreadores se sobrepuseram com um desvio quadrático médio muito baixo (RMSD 0.5-1.5Å), então as cadeias laterais dos resíduos selecionados são transplantados do motivo para as posições correspondentes na proteína carreadora. Esse processo é denominado de “enxerto de cadeia lateral”, onde subsequentemente, os demais resíduos da superfície do carreador e que estão em contato com o alvo são otimizados para ter interações favoráveis.

5. Realizar ancoragem molecular seguido de redesenho da interface do carreador de modo a melhorar as interações na interface motivo (região de ligação) e o contexto (alvo, região de reconhecimento), que nosso caso foi a E2B;

6. Inspeccionar as estruturas obtidas (energia, sequência, folding, estrutura) de modo a escolher com as características de interface que indique para alta afinidade, complementaridade entre os aptâmeros e E2B e além disso que essas estruturas também se apresentem estáveis durante a DM..

5.2.6 Redesenho da superfície de interação para otimização dos aptâmeros desenhados

Para a otimização da superfície das proteínas desenvolvidas foi utilizado o *RosettaScripts* do pacote *Rosetta* v.3.7, tendo como função de energia a ref2015. O *RosettaScripts* consiste em uma fase de declarações e uma fase de instruções – ele lê as instruções com os parâmetros inicialmente definidos e termina com uma sequência de passos. Na fase de declaração, é declarado um conjunto de *movers* (que modificam a estrutura), filtros (avaliam a estrutura), *Score Functions* (avaliam a energia da estrutura) e *TaskOperations* (objetos que controlam as rotinas de colocação das cadeias laterais do Rosetta). Na fase de instruções, é apresentado as etapas do protocolo, indicando a ordem em que os *Movers* e Filtros devem ser aplicados. Na etapa 1, sempre é lida uma estrutura no disco ou outro ambiente; na etapa 2, é descrito como o *Rosetta* deve modificar essa estrutura. Se um filtro for aplicado no passo 1 e a estrutura falhar no filtro, a execução retornará ao passo 1 para outra tentativa. Finalmente, se uma estrutura passa todos os filtros, ela se torna um arquivo de saída a ser considerado (FLEISHMAN, S. J., LEAVER-FAY, A., *et al.*, 2011).

De forma geral o protocolo computacional de desenho de interface consiste em (i) pré-computar um conjunto de interações de resíduos de aminoácidos de alta afinidade com a superfície alvo; (ii) redesenhar o esqueleto de proteínas naturais para incorporar uma série desses aminoácidos; e (iii) otimizar o restante da interface para melhorar a afinidade de ligação.

5.2.7 Seleção dos desenhos por meio do protocolo *AbInitioRelax*

Uma das maneiras de avaliar a qualidade das proteínas desenhadas com relação ao enovelamento proteico, métodos de predição de estrutura podem ser empregados para verificar se a sequência predita irá se enovelar na conformação predita. Assim, foram realizadas 100.000 simulações de predição de estrutura por métodos *ab initio* para cada proteína nativa e seus aptâmeros desenhados. Para a análise de *de novo design* foi utilizado o protocolo *AbInitioRelax* (ROHL, CAROL A. et al., 2004; RAMAN et al., 2009) do programa *Rosetta* v3.7. As bibliotecas de 3 e 9 fragmentos foram obtidas do servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). Para aumentar a amostragem conformacional, os ciclos foram incrementados por um fator de 10. A amostragem dos rotâmeros χ_1 e χ_2 foram incrementados de ± 1 desvio padrão. A contribuição do raio de giro no cálculo de energia foi redistribuída por um fator de 0.5. Os parâmetros utilizados na linha de comando foram: `-in:file:fastafasta_file -in:file:native native_scaffold.pdb -in:file:frag3 frag3_lib -in:file:frag9 frag9_lib -nstruct 1 -out:pdb -abinitio::increase_cycles 10 -relax::fast -abinitio:relax -ex1 -ex2 -no_filters -abinitio::rg_reweight 0.5 -output_all -overwrite`. As proteínas projetadas foram comparadas com seus carreadores para isso foi computado o RMSD das estruturas cristalográficas dos carreadores e considerado o RMSD de $\leq 1\text{\AA}$ como referência, para verificar a estabilidade da conformação dos aptâmeros.

5.2.8 Otimização das sequências das proteínas desenhadas por critérios evolutivos

A matriz de pesos de posições específicas (PSSM, do inglês *Position Specific Score Matrix*), é construída levando em consideração a frequência de cada resíduo (nucleotídeos) em uma posição específica de um alinhamento múltiplo. A PSSM pode ser computada da seguinte forma, a frequência de todo resíduo em cada posição é comparada com a probabilidade da ocorrência daquele resíduo em uma sequência aleatória. Essa metodologia foi usada neste trabalho para achar motivos conservados nos aptâmeros e assim manter os

mesmo no desenho, que podem maximizar o sucesso do enovelamento de proteínas desenhadas. As sequências homólogas das proteínas utilizadas como carreadores denominados aqui como proteínas nativas, códigos do PDB: 1JB3; 1TZV; 2ZPD; 4YME; 5UMR; 5H9K, 6ANR, foram alinhadas e coletadas usando o servidor BLASTp (ALTSCHUL, S. F. *et al.*, 1990), banco de dados não-redundante (*nonredundant*, nr), com número máximo de 1000 hits e e-value igual a 10^{-4} . Os demais parâmetros foram definidos como o padrão do algoritmo. As sequências contidas no alinhamento múltiplo foram agrupadas utilizando o programa cd-hit (LI *et al.* 2006) com os parâmetros padrões para eliminar sequências idênticas.

A partir do alinhamento de sequências não-redundantes, criou-se um banco de dados com sequências locais através do algoritmo BLAST, por meio do seguinte comando:

```
makeblastdb -in <arquivo de alinhamento múltiplo não redundante> -parse seqids -dbtypeprot
```

A PSSM foi extraída do banco de dados com sequências locais por meio do BLAST através do comando:

```
psiblast -query <arquivo fasta> -db<nome do banco de dados criado> -num iterations 2 -out asciipssm<arquivo.pssm>
```

Após a obtenção da PSSM, o procedimento foi baseado no protocolo proposto por Goldenzweig e colaboradores (GOLDENZWEIG, A. *et al.* 2016). O protocolo consiste em três etapas: relaxamento da estrutura, seleção das mutações favoráveis através da PSSM e desenho computacional da interface.

5.3 Metodologia Experimental

5.3.1 Cultivo de células VERO

As células Vero (ATCC® CCL81™) são células de linhagem epitelial, originadas de rim de macaco verde africano adulto (*Cercopithecusaethiops*). Para seu cultivo foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico, estufa a 37°C e 5% de CO₂. Essas células foram utilizadas para a produção do estoque viral e ensaios de placas realizados no presente estudo.

5.3.2 Produção de Estoque Viral de CHIKV e MAYV

Para a produção do estoque viral foram utilizadas células Vero (ATCC® CCL81™) e a cepa isolado local CHIKV/H.sapiens/Brazil/PB242/2017, MAYV/H.sapiens/Brazil/2018. Cada cultura de células Vero foi inoculada com CHIKV ou MAYV, em garrafas ventiladas de 75cm², contendo uma confluência de 80%, em meio DMEM com 2% de SFB, suplementado com bicarbonato de sódio 5%, 1% de antibiótico/antimicótico. O cultivo foi mantido por 2 dias (CHIKV) e 3 dias (MAYV), em estufa de CO₂, a 37°C. Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado em microtubos e armazenado a -80°C. Posteriormente, foram titulados por ensaio de placas.

5.3.3 Titulação Viral de CHIKV e MAYV

Os estoques de vírus foram titulados através de ensaio de placas. Para tal, 1,0 x 10⁵ células Vero foram distribuídas em cada poço de uma placa de 24 poços, no dia seguinte, foram infectadas com até 7 diluições seriadas (na proporção vírus: meio - 1:10) dos estoques de CHIKV e MAYV. Após 1 hora de incubação em estufa de CO₂, a 37°C para a adsorção viral foi adicionado o meio semi-sólido contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) e DMEM com 2% de SFB em volume final de 1mL por poço. Após 2 dias (CHIKV) e 3 dias (MAYV) de incubação em estufa de CO₂, a 37°C, o meio semi-sólido foi retirado, as células foram fixadas com formalina e coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em PFU/mL, estoque CHIKV 240.000PFU/mL e MAYV 3.000.000PFU/mL.

5.3.4 Expressão e purificação dos aptâmeros selecionados

As sequências de DNA que codificam as proteínas que se apresentaram estáveis, mantendo a conformação favorável para contatos proteína-proteína foram otimizadas, sintetizadas comercialmente e clonadas no vetor de expressão procariótica pET14b (Genscript). Os aptâmeros CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram produzidos em *E. coli* marcados com histidina N-terminal. As células bacterianas (BL21 Star (DE3) cepa pLysS, Invitrogen) contendo os plasmídeos alvos foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100µg/mL). A expressão da proteína foi induzida pela adição de 1mM de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) durante 16h a 22°C. As células bacterianas foram colhidas por centrifugação (5.000g/30 min/4°C) e ressuspensas em tampão de lise (NaCl 300mM, Tris-HCl 50mM, Imidazol 20mM, glicerol 10%, pH 8,0). As

células foram lisadas por ultra-som e a proteína alvo foi purificada por cromatografia de afinidade automática usando uma coluna HisTrap HP (Cytiva). A eluição da proteína foi realizada isocriticamente em NaCl 300mM, Tris-HCl 50mM, Imidazol 300mM, glicerol a 10%, pH 8,0. As concentrações das proteínas foram determinadas por espectrofotometria e correção de acordo com o respectivo coeficiente de extinção molar.

5.3.5 Estudo das constantes de afinidade por termoforese em microescala

Vinte micromolares das proteínas projetadas foram marcados usando o corante fluorescente RED NT-647-NHS *Labeling Kit* (NanoTemper Technologies, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O corante que não reagiu foi removido por cromatografia, e a proteína marcada foi eluída em tampão 1X PBS (Solução salina tamponada com fosfato). A concentração da proteína marcada foi medida por espectrofotometria e corrigido pelo seu coeficiente de extinção. Os ensaios de ligação foram realizados usando capilares revestidos com o padrão MST (NanoTemper). As medições de MST foram realizadas usando 100nM de proteína marcada e uma série de 16 diluições de 1:2 de CHIKV (variando de 317 μ M a 0,0096 μ M) em PBS 1X com 0,05% de Tween-20. As medições foram realizadas a 25°C usando o Monolith NT.115 (NanoTemper). O LED de excitação vermelho foi definido para 40% e a potência do laser para média. O tempo de ativação do laser foi definido para 30s, e o tempo de desativação do laser foi definido para 5s. A constante de dissociação (KD) foi derivada de três experimentos de termoforese independentes. A qualidade de cada execução de MST foi avaliada realizando uma varredura capilar antes e depois de cada execução para verificar se a fluorescência entre os capilares permaneceu dentro da variação de 10%. O gráfico final foi traçado usando o software Prisma. 7.0.

5.3.8 Avaliação da estabilidade por dicroísmo circular

Para verificar se a proteína projetada estava enovelada, visto que os dados do MD exploram um comprimento de escala de tempo limitado, e para validar o conteúdo de estrutura secundária previsto, foram adquiridos espectros de dicroísmo circular para CETZDT-2. Experimentos convencionais de far-UV CD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815 CD (JASCO Corporation, Easton, EUA), e os espectros foram registrados de 280 a 195nm, usando uma cubeta de quartzo de 1mm de comprimento de caminho e medidos à 20°C com um sistema de controle de temperatura Peltier. Os dados

foram coletados em intervalos de 0,5nm com uma velocidade de varredura de 100nm.min⁻¹ e um tempo de resposta de 0,5s com uma média de 6 varreduras. A concentração final de proteína foi de 4,33µM, diluída em tampão PBS. O processamento de dados foi realizado usando o *software*CDTool (LEES *et al.*, 2004) e convertido para valores delta epsilon. A desnaturação térmica foi realizada utilizando a mesma concentração de proteína diluída no mesmo tampão, na faixa de temperatura de 10 a 95°C. Uma taxa de varredura de 1,0°C/min controlada pelo sistema Peltier foi usada, e as mudanças de elipticidade foram monitoradas no comprimento de onda fixo de 222nm. Todas as representações gráficas foram realizadas usando o software GraphpadPrism (GraphPad Software, v.7).

5.3.6 Teste de neutralização por redução de placas - PRNT

A avaliação da atividade de neutralização específica do vírus pela proteína projetada foi realizada por teste de neutralização por redução de placa (PRNT) e testes de microneutralização (MN), de acordo com protocolos modificados (MAGALHAES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Enquanto o PRNT depende da contagem de placa visual, o MN mede os títulos de anticorpos neutralizantes de vírus por meio de densidade óptica.(DO).

Para a realização do PRNT, foram usadas células da linhagem Vero (300.000 cel/mL), em meio de cultura MEM (MinimalEssentialMedium, GIBCO), acrescido de 10% de SFB, em microplacas de 24 poços (0,5 mL/poço), preparadas 48 horas antes do ensaio. Amostras da CETZDT-2 foram diluídas de maneira seriada na proporção de 1:2 (variando de 317µM à 0,154µM) e transferidas para placas de microtitulação de 96 poços, para serem incubadas com o vírus previamente determinado (CHIKV ou MAYV). Posteriormente, a placa com a mistura “proteína + vírus”, foi incubada por 1h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após essa incubação as células, previamente plaqueadas nas placas de 24 poços foram inoculadas 50µL da mistura proteína e vírus, em duplicata, seguindo a ordem da diluição seriada da CETZDT-2 e incubadas sob as mesmas condições anteriores (37°C, 5% CO₂ por 1 hora), agitando em intervalos de 15 minutos. Ao concluir o período de incubação, foi adicionado meio semi-sólido (solução contendo carboximetilcelulose, MEM, soro fetal bovino, antibióticos e antifúngico). As placas de 24 poços foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, após esse período o meio semi-sólido foi retirado, as células foram fixadas com formalina e coradas com cristal violeta 3% e o número total de placas foi determinado por

contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placas por mililitro.

5.3.7 Microneutralização

Para a realização da microneutralização com a CETZDT-2 foi realizada uma diluição seriada de ordem 2 (variando de 317 μ M a 0,154 μ M) em seguida, 625 PFU por poço de CHIKV (em 50 μ L) foram adicionados com a proteína diluída em série e incubados para neutralizar o vírus por 1 hora à 37°C.

Após a neutralização, uma alíquota de 100 μ L contendo 80.000 células de uma suspensão de células Vero foi adicionada a cada poço das diluições testadas. As placas foram incubadas por 12 horas à 37°C, em estufa com 5% de CO₂. As placas foram lavadas com PBS com 0,1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) e fixadas com 80% de acetona, seguido pelo bloqueio com 5% (p/v) de leite desnatado (BIO-RAD) em PBS-T por 30min em temperatura ambiente e incubadas com anticorpos monoclonais (mAbanti-CHIKV (A54Q, Invitrogen) por 2 horas em temperatura ambiente. Após uma etapa de lavagem, as placas foram incubadas com IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com sistema substrato de peroxidase de micropoços TMB-KPL (Pierce, IL, EUA) por 45min, temperatura ambiente. A reação foi interrompida com ácido clorídrico 1N e a absorbância a 450nm foi medida em um leitor de microplacas BioTek (Winooski, VT, EUA).

Para ambos os ensaios PRNT e MN, a metade da concentração efetiva máxima (EC₅₀) foi determinada pelo cálculo da diluição da proteína que neutralizou 50% do sinal máximo usando uma regressão não linear de quatro parâmetros (software GraphpadPrism v.7). Uma curva de titulação do vírus foi incluída em cada placa para garantir a reprodutibilidade do ensaio.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sendo o CHIKV causador de doença duradoura com replicação ativa nas articulações, estimulando um processo inflamatório local intenso. O uso de anticorpos que possam ser usados a nível articular pode beneficiar pacientes com o quadro crônico dessa doença, mais comum em idosos. Embora os mecanismos de imunidade protetora à infecção por CHIKV em humanos não sejam totalmente compreendidos, a resposta humoral tem sido implicada no controle da infecção e lesão tecidual (CHU *et al.*, 2013; HALLENGARD *et al.*, 2014; HAWMAN *et al.*, 2013; KAM *et al.*, 2012; LUM *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2013), apontando assim para a importância de novos bloqueadores para uso terapêutico. Além disso, têm sido mostrado o papel dos anticorpos na neutralização da infecção e prevenção da morbidade em camundongos quando administrados até 24h após a inoculação viral (COUDERC *et al.*, 2009).

Em CHIKV e outros alfavírus, existe um potencial estratégico antiviral a ser explorado relacionado a inibição da entrada viral que envolve as proteínas E1 e E2 (FOX *et al.*, 2015). Vários anticorpos monoclonais murinos (mAbs) que neutralizam a infecção por CHIKV já foram descritos (BREHIN *et al.*, 2008 ; GOH *et al.*, 2013; MASRINOUL *et al.*, 2014; PAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2014). A proteína E2 de CHIKV tem se mostrado com um antígeno facilmente acessado e reconhecido por anticorpos anti-CHIKV e, de fato, a maioria dos anticorpos neutralizantes de CHIKV relatados a reconhecem (JIN *et al.*, 2019). Por esse motivo, no presente trabalho foi planejado moléculas com potencial inibitório para E2 de CHIKV. Usando métodos computacionais, foram desenhadas moléculas bloqueadoras que reconhecem epítomos principalmente no domínio E2 B de CHIKV, apontados na literatura como alvo de anticorpos neutralizantes capazes de impedir a entrada e saída do CHIKV.

A região alvo está localizada no domínio B, entre os resíduos 190 e 215, projetadas para longe do envelope viral e localizadas perto do ápice do trímero E2. O mAbCHK-265, que forneceu os resíduos de reconhecimento da E2B para os bloqueadores desenhados, neutralizou o CHIKV pela ligação cruzada do domínio E2B ao domínio E2A como mostrado por FOX e colaboradores, 2015 (FOX *et al.*, 2015). Além do CHIKV, o MAYV teve sua infecção inibida em vírus frente a um aptâmero projetado neste trabalho, esse reconhecimento cruzado pode ser explicado pela conservação da E2B entre os alfavírus também pelos resíduos transplantados originalmente pertencerem ao mAbCHK-265 capazes de se ligar e inibir MAYV em *in vivo* (FOX *et al.*, 2015).

6.1 Ancoragem molecular para refinamento da estrutura modelo

A estratégia para projetar uma proteína artificial capaz de se ligar ao domínio CHIKV E2 foi baseada no desenho de interface. Nesta abordagem, um motivo estrutural conhecido que se liga a um alvo é transplantado para um *backbone* de outra proteína, que será subsequentemente refinado para o empacotamento da proteína e para aprimorar a afinidade de ligação ao alvo. Uma vez que o protocolo começa com um motivo que se liga ao alvo, o desenho se inicia com o mapeamento das principais interações favoráveis.

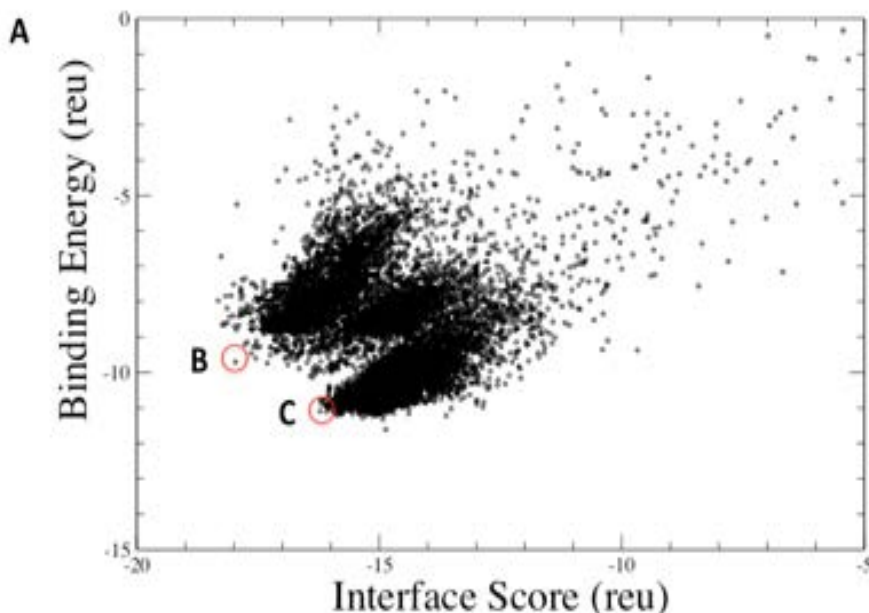
Para tanto, é necessário conhecer a estrutura de um motivo no contexto de uma interface natural complexado ao domínio E2B de CHIKV. Como Fox e colaboradores anteriormente haviam mapeados os resíduos de um anticorpo neutralizante que estavam sobrepostos a E2B de CHIKV, esse complexo determinado experimentalmente apontou quais os resíduos da E2B eram reconhecidos pelo mAb CHIKV-265. Entretanto, a estrutura depositada deste complexo no banco de dados de proteínas (PDB) (PDB ID: 5ANY) apresenta resolução de 16,9Å, o que dificultava a identificação precisa das posições atômicas do complexo e, por esse motivo, se construiu um modelo de estudo.

Para tanto, realizou-se cálculos de ancoragem molecular entre o anticropomAb CHIKV-265 e o domínio E2B. A partir dos cálculos de ancoragem molecular, foram obtidos os valores de energia de ligação entre as porções do anticorpo e o domínio E2B para os diversos modos de ligação. Desta foram calculadas as energias de diversos modos de encaixes produzidos, gerando mais de 100.000 diferentes estruturas do complexo. As estruturas de menor energia foram avaliadas e selecionadas. Para a seleção, (Figura 24) foi levado em consideração a energia de ligação (*bindingenergy*) (calculada com o pacote Rosetta, a qual consiste na diferença da energia total do complexo e da energia dos componentes em separados com inclusão de relaxamento das cadeias laterais e reempacotamento dos estados ligados/não-ligados) e o *interface score* (ISc) (definido como a diferença entre a energia para o complexo e dos parceiros separados, sem permitir o relaxamento estrutural), Sendo assim, o ISc leva em consideração unicamente as energias de interação da interface. Esses são critérios indicados por Wang e Baker, onde pontuam que se deve levar em consideração ambos, pois apenas o *interface score*, a energia não seria fisicamente correto e a análise pode apresentar ruídos quando se baseia unicamente na energia de ligação (WANG *et al.*, 2007). Além dessas duas métricas, foram levantadas outras, tais como, a *Shape complementarity*(Sc) (complementaridade de forma, mede a complementaridade geométrica da superfície das interfaces proteína-proteína), o *H-Unsat* (número de ligações de hidrogênio insatisfeitas,

número de ligações de hidrogênio que poderiam ter sido realizadas, mas estão enterradas no interior da proteína), a *Área* (área de interação total do complexo), o SASA polar é calculado como a soma da SASA para aquele átomo mais o SASA para qualquer hidrogênio ligado.

Estes parâmetros são calculados com base nas diferenças entre propriedades das estruturas ligadas e não ligadas em seus complexos. Como destacado na Figura em 25 B e C, duas estruturas se mostraram mais adequadas. A estrutura B da Figura 25 (complexo modelo, Fab-CHIKV-265 e E2B), teve uma maior concordância com o trabalho de FOX e colaboradores, (2015), que mapeou resíduos na E2B e estes foram usados para direcionar nossas análises e definir quais seriam os *hotspots* do Fab-CHIKV-265 e estaria interagindo a 4Å com a E2B no modelo montado. Essa estrutura modelo neste trabalho foi utilizada para estudo de parâmetros de interface e triagem de resíduos *hotspots* capazes de se ligar a E2B e neutralizar o CHIKV e outros alfavírus como MAYV e que foram usados nos desenhos dos aptâmeros.

Figura 25- Representação das estruturas geradas pelos cálculos de ancoragem molecular do complexo Fab-CHIKV-265 e E2B produzido para estudo



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- Mostra a distribuição das 100.000 estruturas produzidas durante os cálculos de ancoragem molecular quando plotados de acordo com a energia de ligação e *interface score*. Destaque em vermelho para as estruturas selecionadas. As duas principais métricas para a seleção foram a menor energia de ligação e o menor *interface score*. Em B e C, a representação das estruturas selecionadas com os respectivos resíduos interagindo na interface a uma distância de 4Å, com correspondência de maior quantidade de resíduos da E2B, mapeados por FOX e colaboradores, interagindo na interface para a estrutura B quando observado no VMD, nomeada neste trabalho de complexo modelo, Fab-CHIKV-265 e E2B.

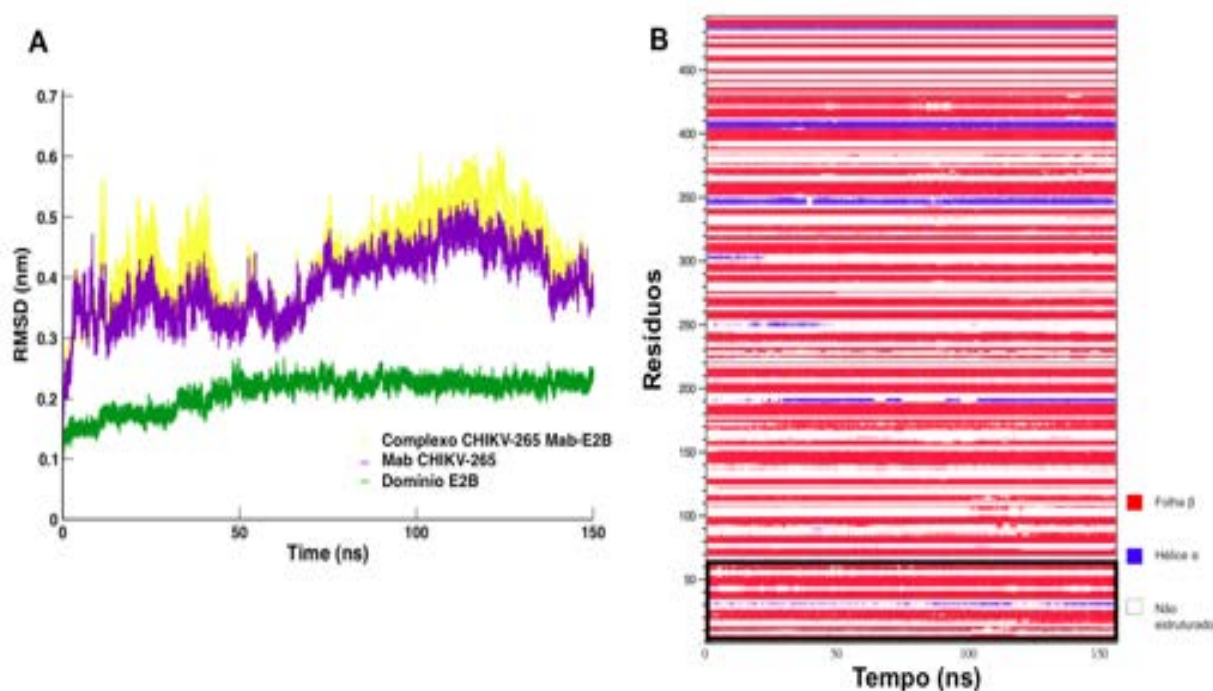
Como pode-se visualizar na Figura 25A, foram amostradas pelos cálculos de ancoragem molecular, estruturas com diferentes aspectos energéticos, sendo assim os cálculos foram capazes de visitar diversas regiões de encaixes durante as tentativas de formação do complexo. As estruturas de baixa energia podem corresponder aos complexos anticorpo-antígeno e devem ter seus arquivos de saída selecionados para se verificar métricas adicionais que possam endossar a escolha da estrutura em questão. Esse tipo de metodologia já vem sendo aplicada para esse fim, Zhao e colaboradores por exemplo, usaram o *RosettaDock* para pesquisar os possíveis complexos entre fibrilas/oligômeros A β e um anticorpo terapêutico (ZHAO *et al.*, 2017).

6.2 Dinâmica Molecular

A estrutura predita pelo ancoragem molecular é um modelo computacional, assim, para refinar e avaliar a estabilidade do modelo gerado, simulações por DM foram empregadas. Através de simulações por DM, é possível explorar o espaço conformacional das proteínas, assim como seus processos dinâmicos de mudanças estruturais atômicas por meio das simulações de DM (DAPIAGGI *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2015). Desta maneira, foi possível avaliar o comportamento estrutural do complexo, bem como dos componentes em separado (Figura 26). A estrutura obtida por ancoragem molecular apresentou um valor de RMSD relativamente alto, em comparação com valores tipicamente encontrados na literatura para simulação de complexos protéicos. Entretanto, tendo em vista que a estrutura inicial veio de um modelo gerado computacionalmente, o alto RMSD pode ser atribuído a conformação dos rearranjos conformacionais que pode não ter atingido o menor de energia no campo de força GROMOS. Assim, apesar de altos, os valores do RMSD para o complexo tornam-se estáveis a partir de aproximadamente 70ns, sugerindo que o sistema alcançou um estado mínimo de energia. Apesar da estrutura do complexo montado para estudo se apresentar com o RMSD alto, as informações geradas pela simulação foram consideradas, tendo em vista que os resíduos seriam posteriormente transplantados para uma nova proteína e passariam por etapas de refinamento na interface de reconhecimento. Também é importante pontuar que os fragmentos Fab são conectados ao fragmento Fc, por meio de uma região polipeptídica chamada de dobradiça (do inglês, hinge), responsável pela flexibilidade da estrutura do anticorpo e que influencia a capacidade de reconhecimento de epítomos espacialmente próximos (HAAKENSEN *et al.*, 2018). Essa flexibilidade presentes nos anticorpos são necessários tendo em vista que ocorre uma dinamicidade das proteínas virais, que apresentam

uma flexibilidade conformacional, importante para os processos do ciclo viral (SIROHI *et al.*, 2017). Outra coisa importante de se observar que apesar do RMSD aumentado, as análises das estruturas secundárias do *backbone*, mostram que os conteúdos se mantêm estáveis ao longo tempo, tanto do Fab-CHIKV-265 quanto na E2B, destacada na parte B da figura dentro do quadro com bordas em negrito (Figura 26).

Figura26- RMSD dos átomos do *backbone* das proteínas e representação do comportamento das estruturas secundárias ao longo do tempo de simulação



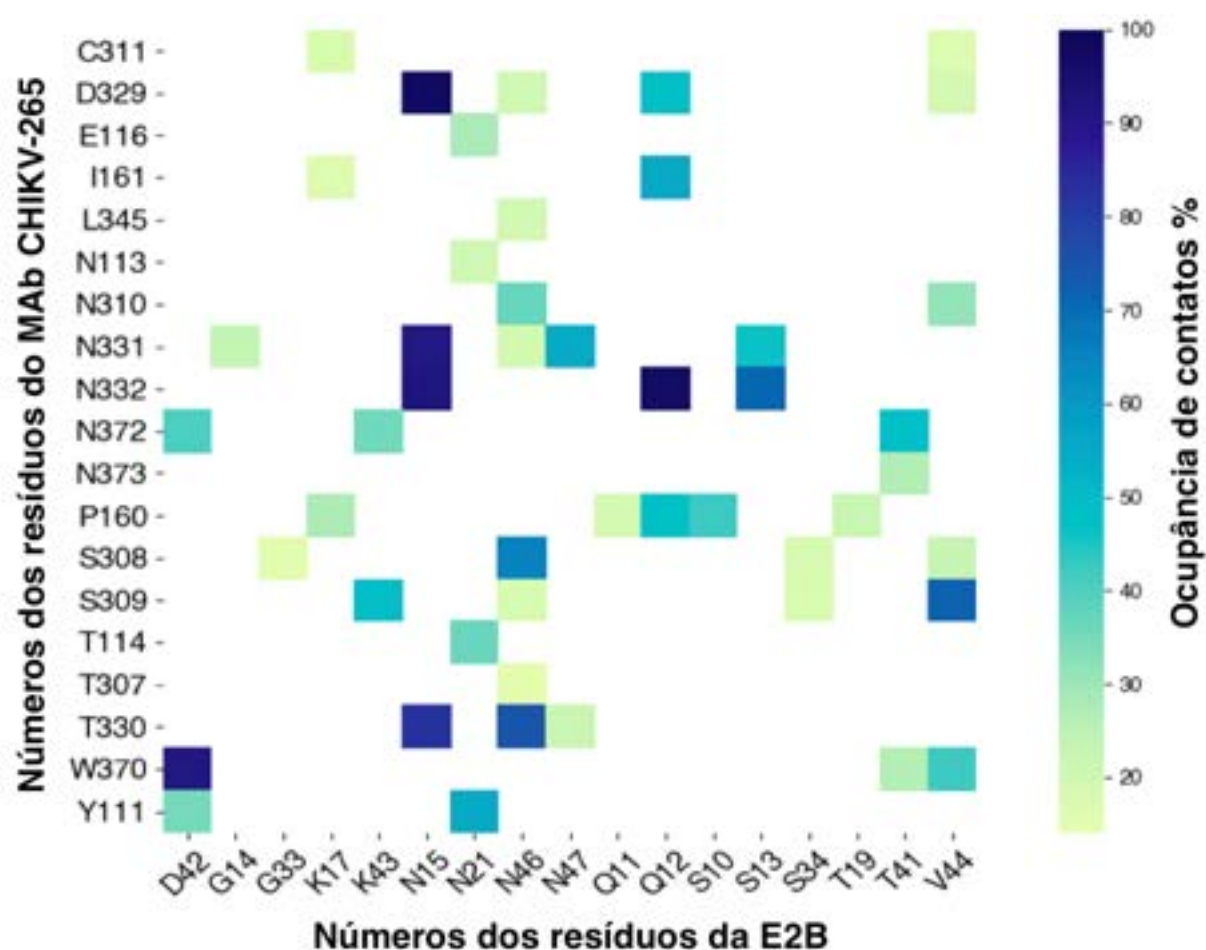
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- Em amarelo: Complexo montado, Fab-CHIKV-265 e E2B; Em roxo: FAB-CHIKV 265; Em verde: domínio E2B. B- A análise da estrutura secundária do *backbone*, mostra que os conteúdos estruturais se mantêm estáveis ao longo do tempo simulado, tanto do Fab-CHIKV-265 quanto do domínio E2B (região referente ao retângulo preto).

Além disso, os dados de simulações de dinâmica molecular podem fornecer explicações detalhadas sobre os mecanismos moleculares de interação proteína-proteína, como por exemplo sobre resíduos *hotspot* para o reconhecimento, e que podem ser transplantados (WANG *et al.*, 2007; LIU e YAO, 2010; MARZE *et al.*, 2017). As interfaces anticorpo-antígeno são enriquecidas em Tyr, Ser e Asp, como pode ser constatado na Figura 27, sendo os resíduos que mais interagem na interface do complexo simulado, juntamente com ASN. Esta representação utiliza o espectro de cores “quentes” (azul escuro) para as “frias” (azul claro) para identificar as áreas de maior ou menor interação entre os resíduos do

Fab e a E2B de CHIKV. Esses resíduos são típicos das interfaces anticorpos-antígenos, como já descrito na literatura. Em geral, esses resíduos apresentam baixa entropia de cadeia lateral e são selecionados para compensar a alta entropia do *backbone* ao interagir com antígenos (WANG *et al.*, 2018). Dessa forma, essas análises permitiram a triagem de contatos relevantes da interface e que foram considerados para as etapas de planejamento e desenho dos aptâmeros.

Figura 27- Análise de porcentagem de ocupância e de ligações de hidrogênio dos resíduos na interface do complexo montado, Fab-CHIKV-265 e E2B



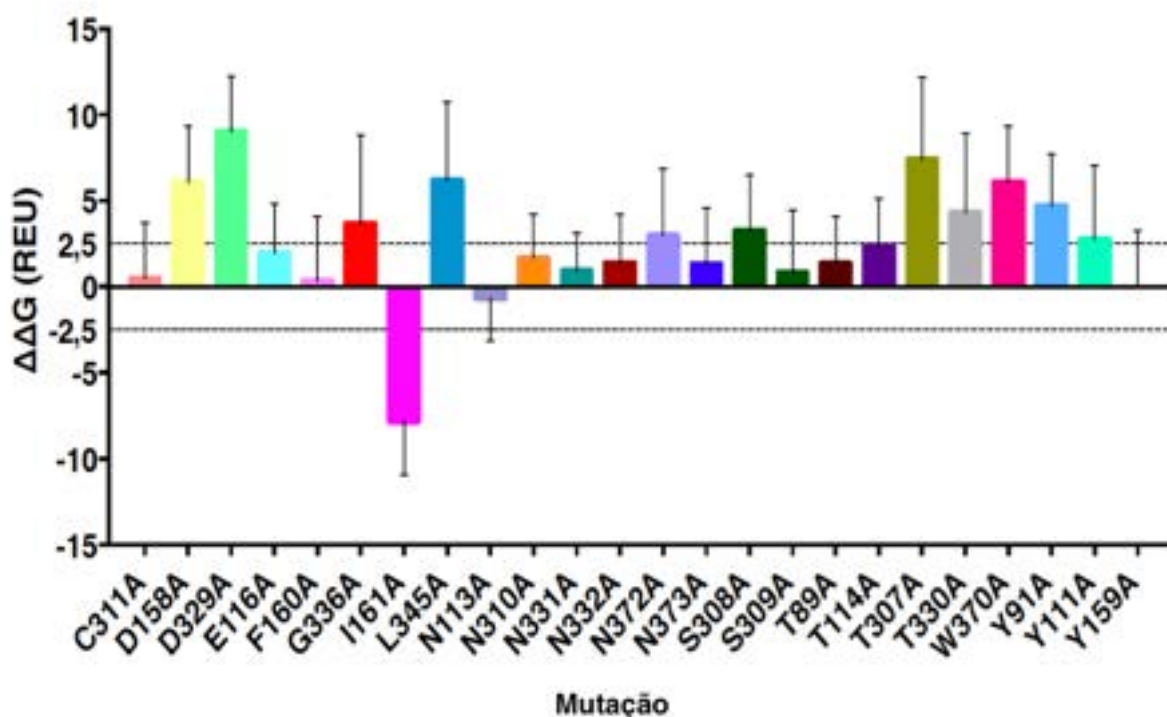
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: *Heatmap* de ocupação do contato indicando a porcentagem do total de frames em que um determinado resíduo do FAB-CHIKV-265 está distanciado 0,35 nm de um resíduo no domínio E2B. A ocupação foi calculada para os últimos 50ns de simulação de DM. A paleta de cores varia do verde claro (representando 0% da ocupação do contato) ao azul escuro (representando 100% da ocupação do contato). As regiões em branco indicam que os pares de resíduos considerados não estavam interagindo.

Para verificar a contribuição energética dos resíduos do anticorpo de maior interação identificados na Figura 27, se fez a substituição da cadeia lateral de cada um deles por um

grupo metil e os resultados dos valores de $\Delta\Delta G$ estão plotados na Figura 28. Mutações para alanina que resultam em mudanças desfavoráveis (ou seja, $\Delta\Delta G > +2,5$) para o sistema são esperadas e esses são considerados como resíduos-chave no processo de reconhecimento molecular, uma vez que indica a importância da cadeia lateral nativa na interface. Esses cálculos foram realizados para um conjunto de estruturas (análise de cluster) geradas por meio de simulações de DM. Foram usadas conformações geradas pela DM salvas a cada 1ns para calcular o $\Delta\Delta G$ após a mutação da alanina. Um total de 100 conformações foram consideradas. Como pode ser visto na Figura 28, esses dados corroboram com os achados das simulações de DM, sugerindo que os contatos feitos por esses *hotspots* não são apenas importantes para a estabilidade da ligação, mas formam contatos permanentes em função do tempo.

Figura 28- Contribuição energética dos resíduos de maior interação do Fab-CHIKV-265 com a E2B



Fonte: Elaborado pelo o autor

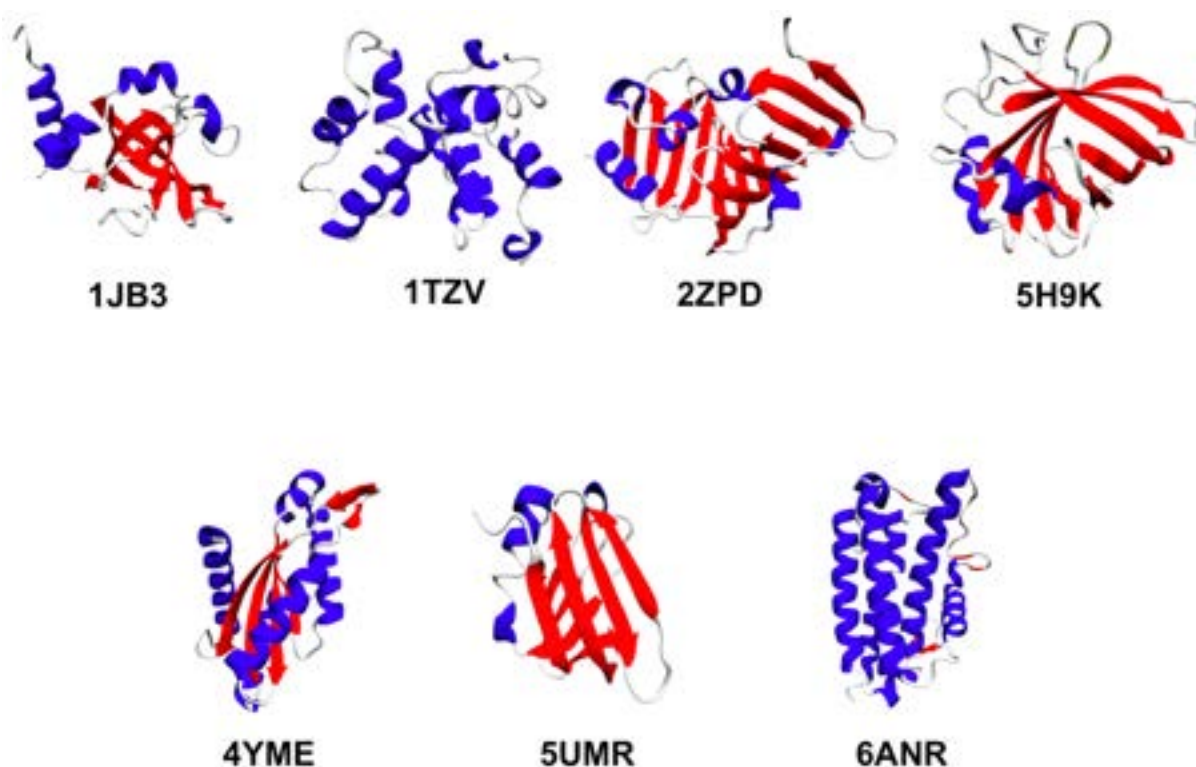
Legenda: No eixo X, os resíduos do anticorpo com maior tempo de interação durante a DM do complexo FAB-CHIKV-26 e E2B. O eixo Y da figura mostra a contribuição energética de cada resíduo na interação com a E2B representados com barras de diferentes cores, sendo as maiores contribuições energéticas dos resíduos S308, S309, D329, T330, N331, N332, W370 e desta forma com maior potencial de contribuir para o reconhecimento da E2B e neutralização do CHIKV. Esses resíduos foram considerados na construção dos aptâmeros, etapas apresentadas ao longo dessa tese.

Os resíduos, identificados no mAb-CHIKV-265 por simulação de DM e mutagênese foram: S308, S309, D329, T330, N331, N332 e W370 e definidos aqui como os resíduos a serem transplantados (motivo) para uma proteína carreadora. As proteínas carreadoras selecionadas tinham como propriedades físico-químicas, alta estabilidade, solubilidade e serem capazes de produção recombinante em sistemas bacterianos, além da capacidade de acomodar espacialmente tais resíduos em sua conformação nativa, mantendo os contatos relevantes iniciais com o antígeno na interface. Para este fim, uma biblioteca contendo 2500 possíveis proteínas carreadoras retiradas do PDB, foram selecionadas proteínas capazes de acomodar os resíduos transplantados com baixo desvio quadrático médio em suas estruturas. Posteriormente ao transplante, a superfície de interação circundante foi redesenhada para estabilizar a estrutura da proteína acomodando os resíduos transplantados e para aumentar a afinidade de ligação.

6.3 Desenho dos aptâmeros

Apesar dos dados de simulação e mutagêneses sugerirem o transplante de sete resíduos-chave S308, S309, D329, T330, N331, N332 e W370, nenhum dos carreadores da biblioteca comportou a acomodação de todos resíduos em sua conformação nativa com um RMSD sobreposto de 0,5Å. Portanto, o número de resíduos a serem enxertados com uma sobreposição de RMSD de 1,5Å foi reduzido inicialmente para cinco e depois quatro resíduos, com maior prioridade para os resíduos D329, T330 e W370, uma vez que estes foram apontados conjuntamente pelos dados de mutações de alanina e simulações de DM como funcionalmente relevantes. Foram selecionadas todas as estruturas que comportam quatro ou cinco, números máximos de resíduos transplantados tolerados, para isso foi permitido uma variação de RMSD de 0.9-1.5Å. Baseado na triagem de carreadores, aqueles que se apresentaram dentro dos critérios estabelecidos capazes de acomodar os resíduos transplantados foram para estruturas disponíveis no PDB sob os códigos 1JB3 (STETEFELD *et al.*, 2001), 1TZV (BONIN *et al.*, 2004), 2ZPD (OGUCHI *et al.*, 2008), 4YME (10.2210/pdb4yme/pdb), 5H9K (JABLONKA *et al.*, 2016), 5UMR (ARE *et al.*, 2016) e 6ANR (TRIPATHI *et al.*, 2017) (Figura 29)

Figura 29- Representação das proteínas utilizadas como carreadores

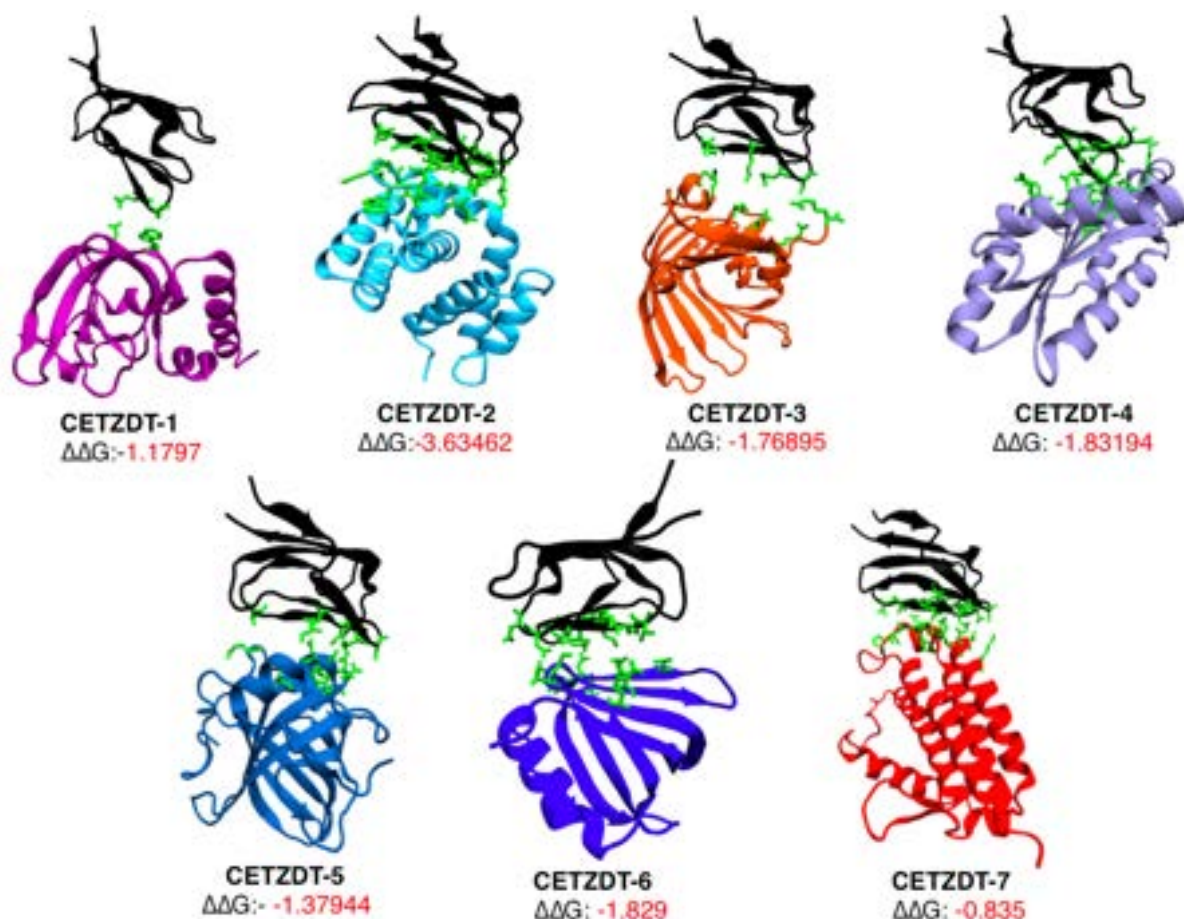


Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Representação *new cartoon*- Folhas- β estão representadas como setas na cor vermelha, hélices- α como espirais na cor azul e regiões não estruturadas na cor branca. 1JB3- Proteína de adesão celular, com 131 aminoácidos, do organismo: *Gallus gallus*. 1TZV- Proteína envolvida na transcrição proteica, com 166 aminoácidos, do organismo: *Thermotogamaritima*. 2ZPD- Proteína transportadora, com 190 aminoácidos, do organismo: *Escherichia coli* (cepa K12). 4YME- Liase, com 158 aminoácidos, do organismo: *Caulobacter vibrioides*. 5H9K- Proteína de ligação, com 156 aminoácidos, do organismo: *Rhodnius prolixus*. 5UMR- Proteína envolvida na transcrição proteica, com 100 aminoácidos, do organismo: Homo sapiens. 6ANR- Hidrolase, com 169 aminoácidos, do organismo: *Escherichia coli*.

O $\Delta\Delta G$ inicial dos aptâmeros quando ligados a E2B também foram considerados para triagem dos aptâmeros, muito embora esse parâmetro de afinidade tenha sido melhorado nas etapas de redesenho da interface apresentado nas seções a seguir. Obteve-se um total de 45 proteínas carreadoras contendo os resíduos-chave em sua conformação nativa. Uma lista de identidade de PDB dos candidatos junto com o $\Delta\Delta G$ para o domínio E2B pode ser encontrada na Tabela 1 do apêndice. As estruturas simuladas de menor energia para as proteínas estão representadas na Figura 30, destacados em verde os resíduos que interagem na interface a 4Å, os resíduos inseridos (motivo) foram mostrados nessa condição interagindo com resíduos da E2B de CHIKV. Aqui, os aptâmeros derivados dos PDBs nativos 1JB3, 1TZV, 2ZPD, 4YME, 5H9K, 5UMR e 6ANR são referidas como CETZDT-1, CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-4, CETZDT-5, CETZDT-6, CETZDT-7.

Figura 30- Representação dos aptâmeros interagindo com o domínio E2B



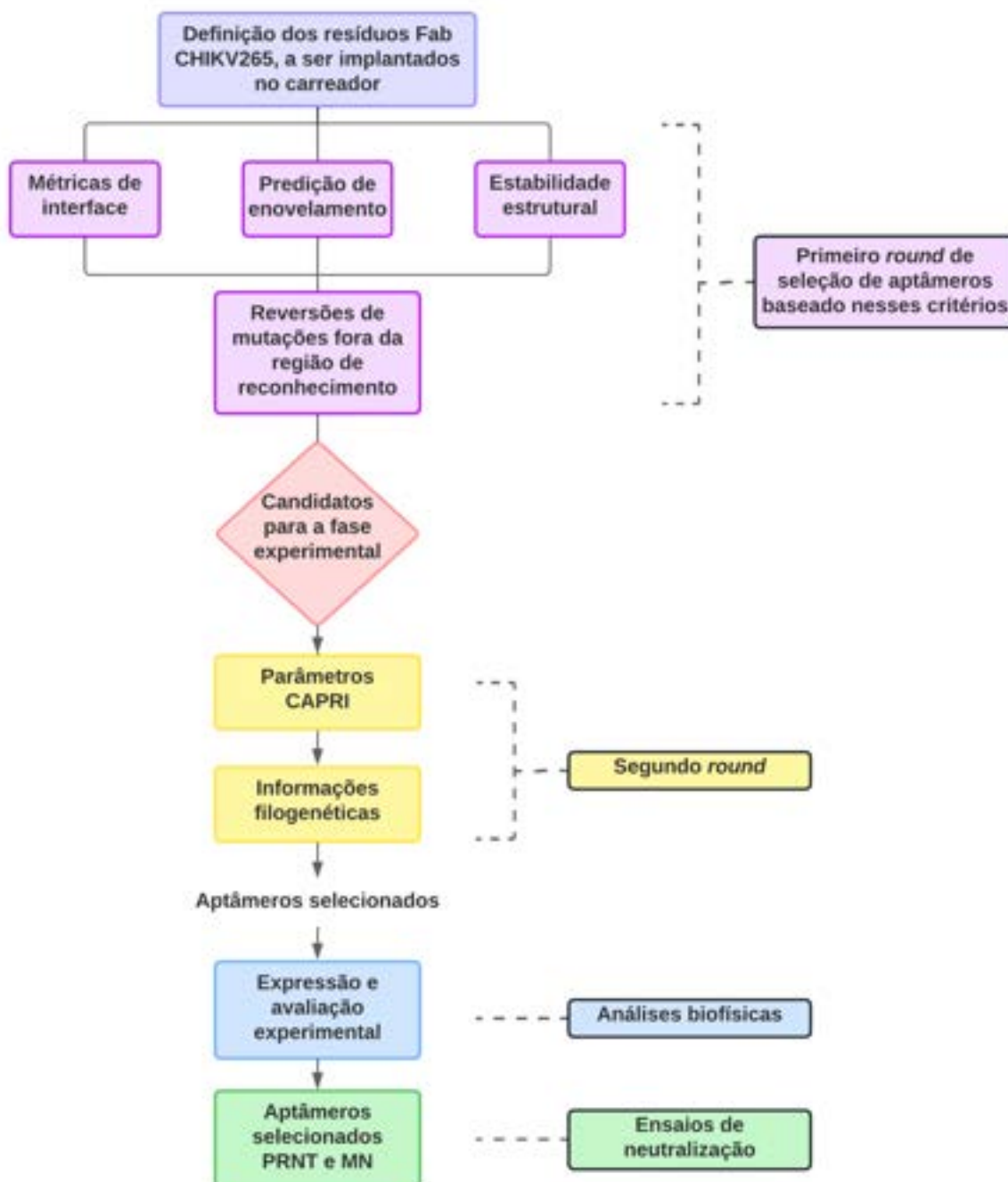
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Representação new cartoon de todos os aptâmeros desenhados pela abordagem *MotifGraft* para desenho de interface interagindo com a E2B. O $\Delta\Delta G$ inicial apresentado pelos aptâmeros foi também considerado na triagem dos aptâmeros, na etapa de redesenho de interface dos carreadores essa energia de ligação foi aprimorada como apresentado a frente no trabalho. Em verde os resíduos que estão interagindo há uma distância de 4Å.

Para aumentar a afinidade e estabilidade dos aptâmeros, uma abordagem de ancoragem molecular seguida de redesenho da interface foi empregada com base na amostragem de mutações combinatórias de Monte Carlo e no uso de restrições filogenéticas baseadas na diversidade de sequências naturais para cada proteína. Por meio de uma matriz de pontuação específica de posição (PSSM), é possível obter uma perspectiva geral sobre a distribuição global de aminoácidos para cada posição em sua sequência primária, considerando muitas variantes diferentes observadas na natureza. Uma informação importante que pode fornecer é a identificação de mutações que potencialmente aumentam a estabilidade da proteína a partir do efeito consenso (aminoácidos observados em uma determinada posição

geralmente aumentam a estabilidade de uma proteína). Um total de 100.000 estruturas foram projetadas para cada um dos sete complexos obtidos. Vale aqui ressaltar que fizemos duas tentativas de triagem de aptâmeros, onde na primeira foram triadas os candidatos CETZDT-1, CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-4, CETZDT-5, que foram filtrados através da avaliação de métricas de qualidade de interface calculadas usando a aplicação do *InterfaceAnalyzer* do Rosetta. Em uma segunda filtragem, além das métricas de interface utilizadas na primeira filtragem, foram levados em consideração os parâmetros CAPRI, evento de resolução de estrutura de proteínas que interagem com proteínas, já introduzido ao leitor durante a revisão de literatura desta tese, e os aptâmeros CETZDT-6, CETZDT-7 foram selecionados, como candidatos a parte experimental (Figura 31).

Figura 31- Fluxograma de desenho e seleção aptâmeros



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: de forma sequencial é apresentada a metodologia empregada para construção dos aptâmeros neste trabalho. A primeira dificuldade encontrada na construção de proteínas capazes de bloquear o vírus CHIKV, era selecionar uma estrutura do complexo, CHIKV e anticorpo neutralizante. Como o complexo existente no PDB tinha baixa resolução foi necessário construir uma estrutura. Com o complexo antígeno-anticorpo montado e aprimorado o encaixe por meio de etapas *dedocking design*, o mesmo foi simulado e possível analisar as interações de interface e selecionar resíduos que interagiam durante maior parte do tempo durante a dinâmica molecular. Esses resíduos, passaram por etapa de mutagêneses computacional e verificado a contribuição energética de cada para o complexo. Desta forma, os resíduos do FAB-CHIKV265, foram selecionados para ser inseridos em uma nova proteína, aqui chamada de carreador, de estrutura simplificada, que poderia ser expressa em *E. Coli*. Sabendo quais resíduos eram *hotspots* do FAB-CHIKV265, os aptâmeros foram então desenhado levando em consideração essas informações, com etapas posteriores para otimizar o reconhecimento proteína-

vírus. Na etapa seguinte, passamos fazer uma primeira tentativa de selecionar as estruturas com base nas características da interface, predição de enovelamento e estabilidade estrutural (primeiro *round*). Os aptâmeros selecionados no primeiro *round* passaram ainda por uma etapa de modificação com retirada de mutações fora da superfície de reconhecimento e para separar das estruturas originais sem reversões dessas mutações passaram ser chamadas pelo nome anterior mais a palavra reverso). Terminada essa primeira seleção decidimos inserir outros elementos (parâmetros CAPRI) para analisar as milhares de estruturas que tínhamos gerados, com base nos dados apresentados na literatura fazer um segundo *round* de seleção. Todas as estruturas selecionadas ao do segundo *round* foram submetidas a uma matriz de posição (PSSM) buscando reverter mutações não significativas com base em informações filogenética. Por ultimo alguns desses aptâmeros (CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7) foram expressos, purificado e avaliado afinidade a E2B de forma experimental. Um candidato se mostrou, CETZDT-2 mais promissor e seguiu para etapa de avaliação de estabilidade e ensaios de neutralização viral.

6.4 Seleção dos mutantes e otimização por meio de ancoragem molecular e redesenho da interface

Na primeira linha da Tabela 2, se tem os parâmetros da estrutura modelo Fab-CHIKV-265 e E2B usada inicialmente e em seguida são pontuados os aptâmeros que passaram por etapa de ancoragem molecular seguido por redesenho da interface. Interessante de se notar quando se compara os parâmetros é que a etapa de redesenho da interface conseguiu melhorar a interação das estruturas no que se refere aos aspectos energéticos que apontam para a afinidade do complexo, energia de ligação e *interface score* quando comparado com a estrutura modelo Fab-CHIKV-265 e E2B. Em diversos casos, os complexos de proteína desenhados mostram esses valores mais favoráveis do que os complexos naturais (FLEISHMAN, WHITEHEAD, et al., 2011). Como podemos observar na Tabela 2 temos dois exemplares de cada estrutura, isso porque nessa etapa do trabalho inicialmente selecionamos os dois melhores desenhos gerados de cada aptâmero. Além de observar as métricas de interface, essas estruturas foram visualizadas no VMD, a fim de verificar a representação dos encaixes produzidos por cada estrutura. As estruturas com destaque em vermelho reuniram todas as melhores características, indicando maior afinidade dos complexos, melhores encaixes e passaram a ser avaliadas por DM nas etapas seguintes desse trabalho com a finalidade verificar a estabilidade estrutural desses aptâmeros.

Tabela 2- Os aspectos energéticos dos aptâmeros selecionadas depois das etapas *docking* e *design* da interface

I_SC	$\Delta\Delta G$	PDB
-17.94	-9.70	Complexo montado, Fab-CHIKV-265 e E2B

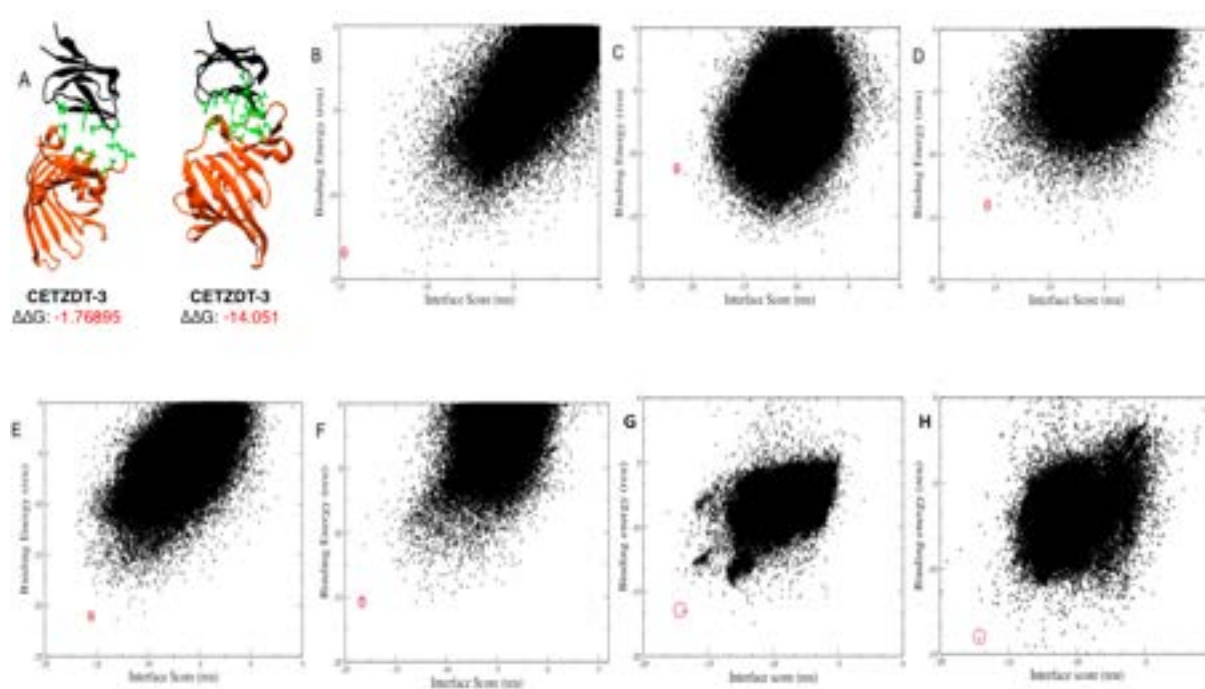
-13.455	-14.538	CETTZD-1 (1)
-12.496	-11.225	CETTZD-1 (2)
-21.414	-11.182	CETTZD-2 (1)
-16.403	-14.539	CETTZD-2 (2)
-15.562	-14.051	CETTZD-3 (1)
-17.408	-10.980	CETTZD-3 (2)
-15.495	-21.059	CETTZD-4 (1)
-14.936	-18.756	CETTZD-4 (2)
-18.380	-15.162	CETTZD-5 (1)
-18.132	-10.857	CETTZD-5 (2)

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Destaque em vermelho para as estruturas selecionadas, que reuniam menor energia e *interface score*, para as avaliações pelas metodologias de *de novo design (abinitio relax)* e dinâmica molecular.

Aproximadamente 100.000 estruturas interagindo com o alvo E2B-CHIKV foram gerados para cada aptâmero (Figura 32). As estruturas com os parâmetros de interface desejados foram selecionados como representante de cada aptâmero a seguir para etapas de análises de enovelamento e DM. O *docking* seguido de desenhada interface se mostrou preciso como observado no exemplo ilustrado com a (Figura- 32A), havendo uma aumento na energia de ligação dos complexos se comparado com os valores iniciais (Tabela 1 do apêndice) de energia de ligação de cada uma das estruturas selecionadas e apresentadas nas Tabela 2.

Figura 32- Representação das 100.000 estruturas geradas para cada aptâmero depois do ancoragemolecular e o redesenho da interface dos aptâmeros



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- representação do aptâmero, em laranja, com o domínio E2B, em preto, antes (esquerda) e depois (direita) da ancoragemolecular e redesenhada interfacee em verde os resíduos que estão interagindo na interface a uma distância de 4Å. B, C, D, E e F: representação dos funis de energia dos aptâmeros (CETZDT-1, CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-4, CETZDT-5, CETZDT-6, CETZDT-7, respectivamente) e a seleção feita com os círculos em vermelho das estruturas de menor energia de ligação e *interface score* que foram selecionadas para as análises estruturais e comparação com *de novodesign*.

6.5 Reversão de mutações não positivas para o desenho dos aptâmeros

Depois de selecionadas as estruturas de interesse (Tabela 2), foi executada uma etapa de reversão de mutações de resíduos. Essa reversão das mutações aconteceu fora da região de interação aptâmero-E2B, ou seja, preservando os resíduos que interagem na interface a 4Å de distância. As proteínas desenhadas com identidade de aminoácidos mais próxima da estrutura nativa do aptâmero podem colaborar com o enovelamento proteico adequado. As estruturas desenhadas se mantiveram bastante idênticas em relação às proteínas nativas, apresentando pequenas variações, e o protocolo de reversão se mostrou eficiente, revertendo algumas mutações e deixando as estruturas mais próximas das estruturas nativas, em torno de 90% de identidade de aminoácidos. Todas as estruturas que sofreram esse processo de reversões de mutações são chamadas pelo nome do aptâmero que lhe deu origem mais o nome "reverso" para diferenciar dos aptâmeros com todas as mutações colocadas das etapas de desenho, ancoragemolecular e redesenho de interface. No entanto, no caso das estruturas resultantes

dos carreadores CETZDT-1 e CETZDT-3 (Tabela 3), as energias de ligações se tornaram mais positivas e nesse caso a estrutura sem reversões de mutações ainda era a melhor escolha. Mas no caso CETZDT-2; CETZDT-4; CETZDT-5, as estruturas em que foram revertidas algumas das mutações impostas na fase construção se apresentaram com energias próximas dos aptâmeros originais (Tabela 3) e por isso optou-se em considerá-los.

Tabela 3- Comparação da energia de ligação entre aptâmeros sem reversão de mutações ($\Delta\Delta G$ inicial) e com reversão ($\Delta\Delta G$ final).

PDB	$\Delta\Delta G$ inicial	$\Delta\Delta G$ final
CETZDT-1	-13.4953	-5.29714
CETZDT-2	-14.5705	-14.4977
CETZDT-3	-14.0563	1.90651
CETZDT-4	-21.0583	-19.6659
CETZDT-5	-15.207	-14.3542

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A coluna identificada como $\Delta\Delta G$ inicial é referente a energia de ligação que os aptâmeros tinham antes de ter algumas das mutações que foram inseridas na etapa de ancoragem molecular e redesenho de interface e posteriormente foram revertidas passando a ter um novo $\Delta\Delta G$, especificado na coluna identificada como $\Delta\Delta G$ final. Essa reversão das mutações aconteceu fora da região de interação aptâmero-E2B, ou seja, preservando os resíduos que interagem na interface a 4Å.

6.6 Seleção dos aptâmeros por meio de *AbInitioRelax*

Como tentativa de prever a capacidade de enovelamento dos aptâmeros passaram ser testados usando o protocolo *AbinitioRelax*. A formação do funil de enovelamento pode ser

observada para carreador 1TZV (146aa), assim como para o aptâmero resultante dessa proteína e da estrutura com mutações revertidas (Figura 1 do apêndice). Foi postulado que para as demais proteínas com mais de 150 aminoácidos (2ZPD- 190aa; 4YME- 158aa; 5H9k- 156aa), o algoritmo de predição de estrutura do *ab initio* não mostrou acurácia para predição até quando se tratava dos próprios carreadores, algo já observado e descrito na literatura (BONNEAU et al., 2001).

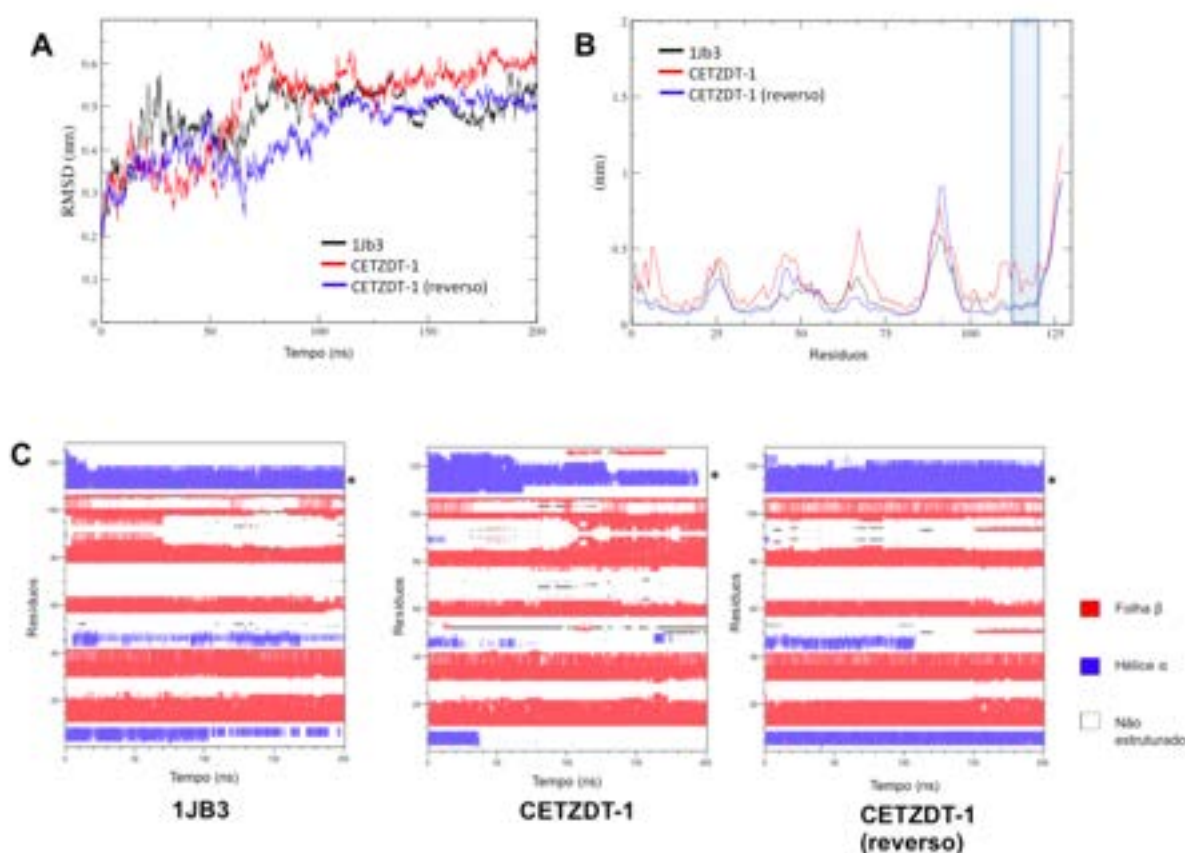
6.7 Seleção dos aptâmeros por meio de dinâmica molecular

Seguindo com análises para selecionar os aptâmeros, agora avaliando aspectos estruturais, foram realizadas simulações de DM para investigar se as conformações nativas dos carreadores se mantiveram ao longo do tempo simulado (Figura 32-37). Diversos trabalhos têm mostrado a simulação DM usada nesse contexto, avaliando a variação estrutural diante das mutações de resíduos, o que permite ter indícios do processo dinâmico de dobramento e agregação proteica (SANTINI e DERREUMAUX, 2004; CAMPOS *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2014). Para avaliar a estabilidade estrutural, foram analisados os valores de RMSD dos átomos dos *backbones* em relação às estruturas iniciais ao longo do tempo. O conteúdo de estrutura secundária ao longo do tempo de simulação também foi analisado, utilizando o software DSSP (*Database of Secondary Structure in Proteins*) (KABSCH e SANDER, 1983).

Todos os resultados de análises estruturais são comparados às proteínas nativas utilizadas como carreador e são utilizadas como referência para nossas análises, tendo em vista que essas proteínas existem na natureza e foram expressas experimentalmente em sistema procaríoto. A raiz quadrada da flutuação quadrática média (do inglês, *Root Mean Square Fluctuation*- RMSF) dos resíduos de aminoácidos transplantados foi avaliado com objetivo de verificar a variação da posição dos átomos de cada resíduo durante a dinâmica.

Como visto na 332A, a estabilidade do corredor 1JB3 e das três variantes se mantiveram, não variando da estrutura nativa, apresentando um RMSD em torno de 0,5nm. No entanto, quando se observa o gráfico com informações da estrutura secundária há alterações em diversos elementos da estrutura secundária no aptâmero, inclusive na região onde houve transplante do motivo, como pode ser observado na Figura 33B. Desta forma, como o aptâmero com mutações revertidas tinha um $\Delta\Delta G$ -5.29714 e o original perdeu estrutura secundária no local onde foram inseridos os resíduos de reconhecimento a E2B, esse desenho não foi selecionado para as etapas de expressão proteica e análises biofísicas.

Figura 33- Análise estrutural para a proteína nativa (1JB3), aptâmero (CETZDT-1) e aptâmero com reversões de mutações (CETZDT-1)



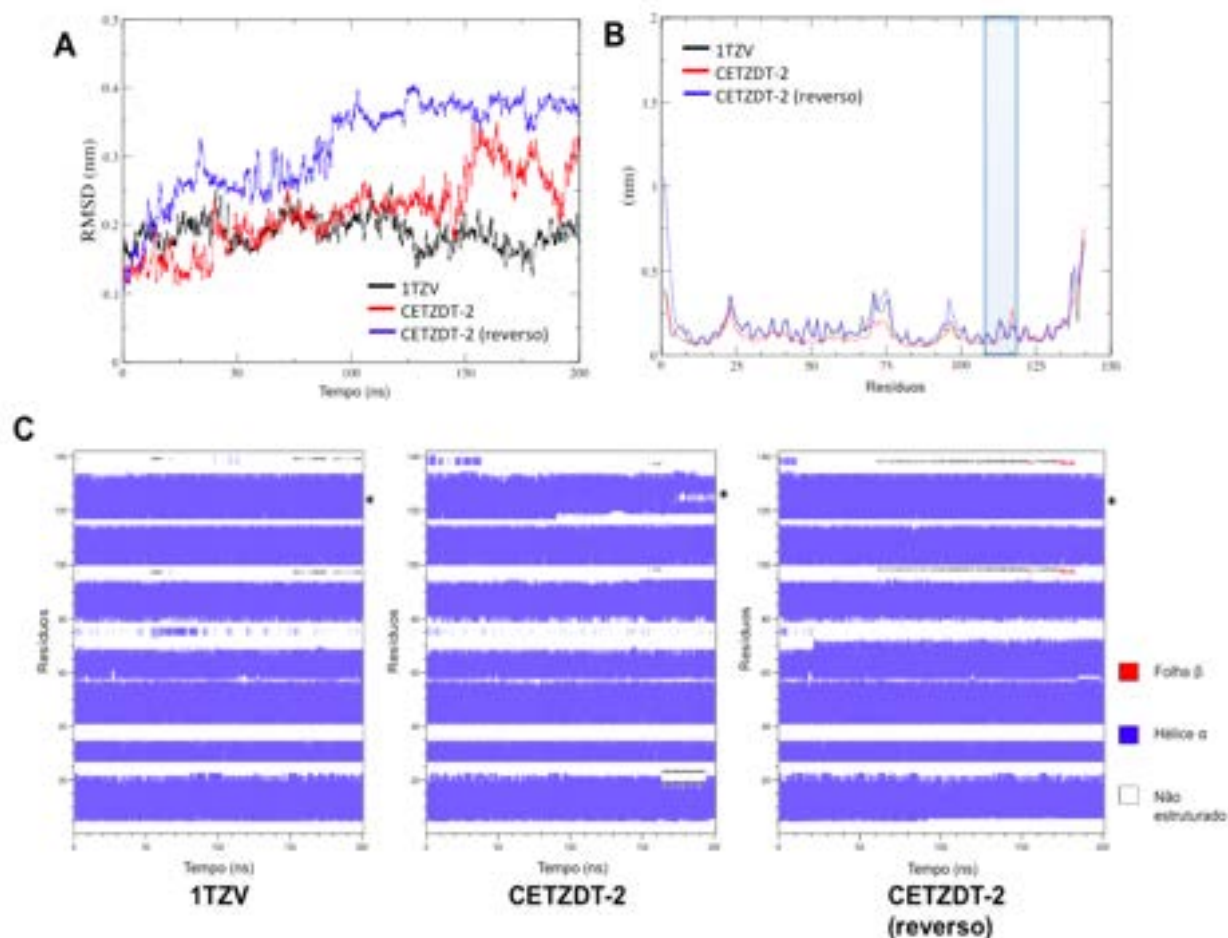
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: **A-** RMSD dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio de 0,5nm (1JB3), 0,55nm (CETZDT-1), 0,5 nm (CETZDT-1/reverso). **B-** O RMSF indica que a região onde foi inserido o enxerto (região destacada em azul), nas posições **113; 114; 115; 116**, ganha maior flexibilidade no aptâmero, (1JB3mt) o que pode ser interessante já que regiões de reconhecimento em anticorpos são *loops* e, portanto, apresentam flexibilidade. **C-** Conteúdo de estrutura secundária (eixo y-comportamento dos resíduos em função do tempo de simulação (eixo x), indicando que não há perda considerável de conteúdo estruturado para CETZDT-1 (aptâmero) e o CETZDT-1 (com reversão de algumas mutações nos resíduos 75+112+114+116+134+137) tem um comportamento semelhante a do carreador.

A trajetória DM sugere que o reverso do desenho CETZDT-2 é estruturalmente estável, como pode ser visto na Figura 34A. O RMSD para esse aptâmero ao longo do tempo usando os carbonos alfa em comparação com a referência (inicial) mostra que a simulação DM atinge o equilíbrio nos primeiros picossegundos e exibe um perfil semelhante à estrutura do tipo selvagem. Este comportamento reflete a escassez de mudanças estruturais significativas devido à perda de estrutura secundária ou mudanças conformacionais substanciais. Analisando o diagrama de estrutura secundária ao longo do tempo (Figura 34C), fica evidente que o motivo dos valores de RMSD ligeiramente mais alto é a perda parcial de conteúdo de hélice- α . Desta forma, o conteúdo de estrutura secundária ao longo do tempo

corroborar que a proteína projetada não apresenta perda de padrões estruturais, mantendo sua estrutura dobrada, com atenção especial às regiões de proximidade onde ocorreu a enxertia, nas quais os elementos da estrutura secundária são preservados. Para caracterizar a flexibilidade do CETZDT-2, utilizou-se como critério a RMSF, uma vez que mede a magnitude do movimento de um átomo. Desta forma, RMSF foi calculado para átomos de carbono alfa. Como pode ser observado, a proteína projetada apresenta um perfil de RMSF ligeiramente mais rígido em relação à sua estrutura nativa, destacando sua estabilidade. Um aspecto crítico para a concepção de proteínas terapêuticas reside na sua estabilidade, uma vez que a baixa estabilidade impede a sua eficácia e segurança. O alinhamento da sequência mostrou que a CETZDT-2/reverso e a proteína nativa do qual foi derivado esse aptâmero, 1TZV, compartilham 92% de identidade entre seus aminoácidos, diferindo por um total de 11 resíduos e por esse motivo resolvemos seguir com essa estrutura para as próximas etapas pelas vantagens já colocada no texto nas etapas de produção de proteica e para fácil entendimento essa estrutura CETZDT-2/reverso será chamada apenas por CETZDT-2 nas próximas etapas.

Figura 34- Análise estrutural da proteína nativa (1TZV), aptâmero (CETZDT-2) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-2)

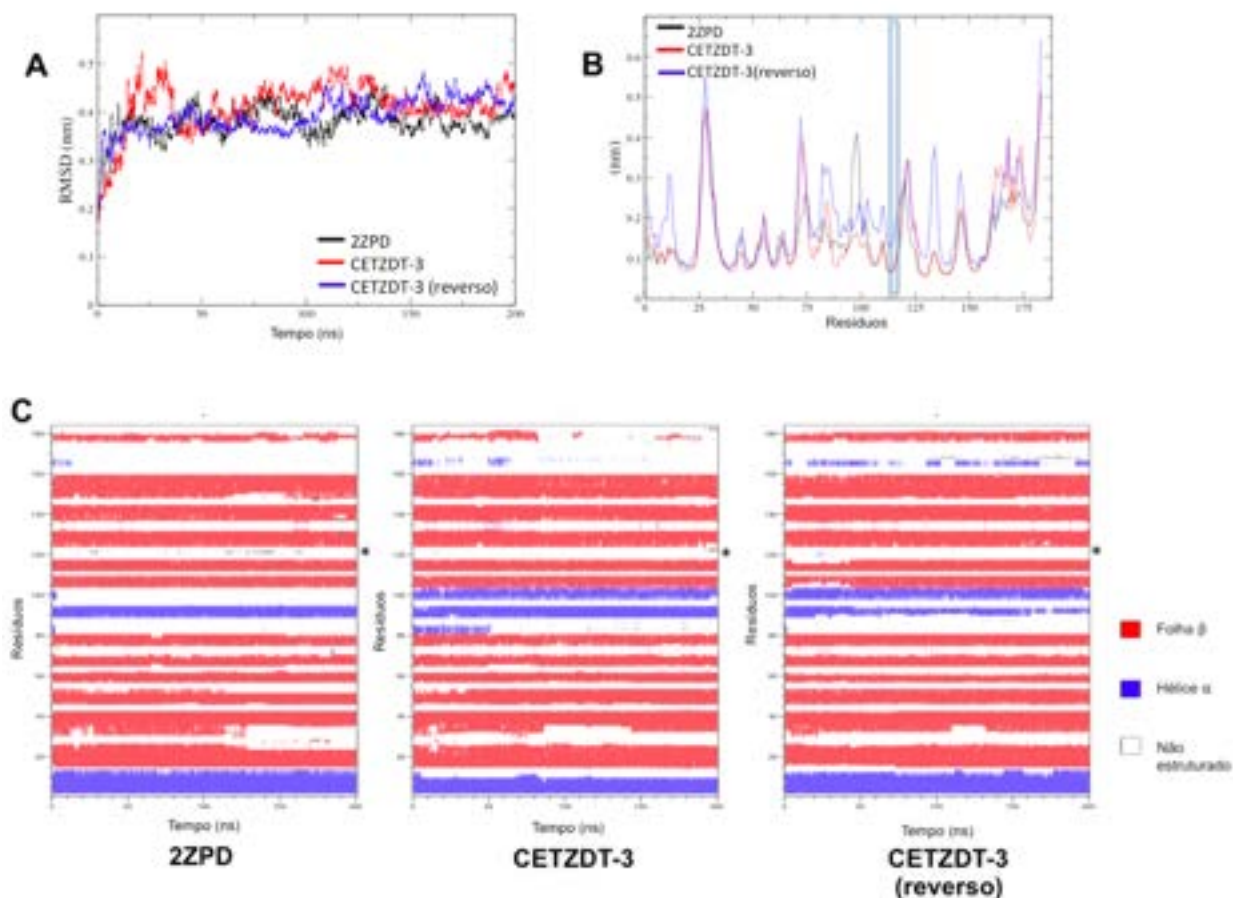


Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: **A-** RMSD dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio de 0,2 nm (1TZV), 0,25nm (CETZDT-2), 0,35nm (CETZDT-4/reverso). **B-** RMSF, mostra que não há variação na região onde foi inserido o enxerto, nas posições **125; 132; 133; 134; 135**, portanto não houve ganho ou perda de flexibilidade na região em questão. **C-** conteúdo de estrutura secundária da 1TZV (carreador), CETZDT-2 (aptâmero), CETZDT-2/reverso (reversão das mutações nos resíduos 118+119+121+122+130 do aptâmero) se manteve ao longo do tempo de simulação, indicando que não há perda considerável de conteúdo estruturado e o aptâmero se apresentou estruturalmente estável.

As variantes da 2ZPD apresentam RMSD bastante estáveis, convergindo de forma inicial para valores de RMSD próximo ao da proteína nativa (2ZPD). Há perda parcial de estrutura em uma extremidade da proteína, mas na região onde foi enxertado o motivo não há alterações, como pode ser observado na Figura 35.

Figura35- Análise estrutural da proteína nativa (2ZPD), aptâmero (CETZDT-3) e aptâmero modificado (CETZDT-3)

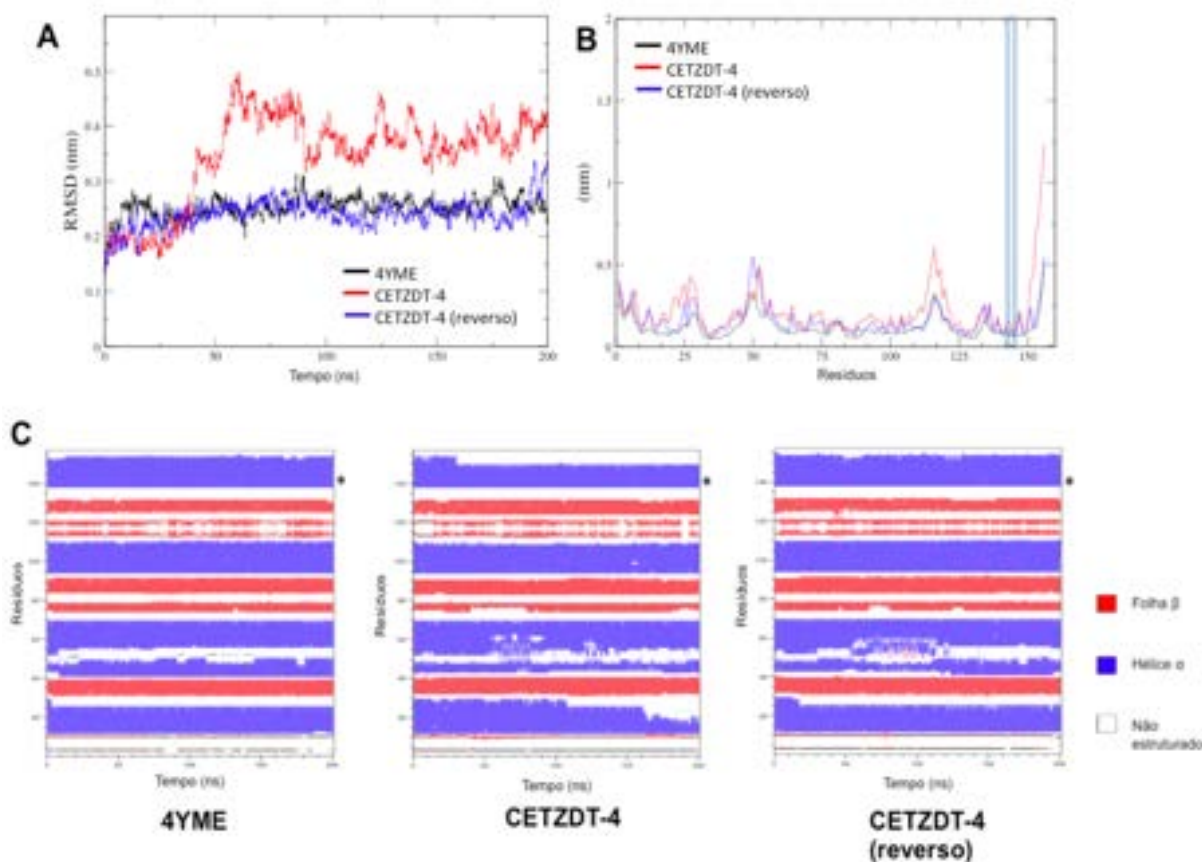


Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- RMSD, dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio em torno de 0,35 nm. B- RMSF, não há muita variação quando comparada às três estruturas onde foi inserido o enxerto, nas posições **121; 122; 123; 124**. C- Conteúdo de estrutura secundária da 2ZPD (nativo), CETZDT-3 (aptâmero), CETZDT-3/reverso (reversão de algumas mutações nos resíduos-123+124+126+137+139+226) em função do tempo de simulação, indicando que há perda parcial de conteúdo estruturado na região terminal no caso de CETZDT-3 (fora da região onde foi inserido o enxerto), no entanto a proteína se mantém estável.

No caso da 4YME, uma maior alteração acontece na estrutura CETZDT-4, mas a reversão de algumas mutações possibilitou uma maior estabilidade estrutural, como visto na Figura 36A, com o RMSD do reverso do CETZDT-4 próximo ao nativo. Outro ponto negativo deste desenho é a perda de estrutura na região do transplante, algo que também é revertido na estrutura do reverso do CETZDT-4.

Figura 36- Análise estrutural da proteína nativa (4YME), aptâmero (CETZDT-4) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-4)

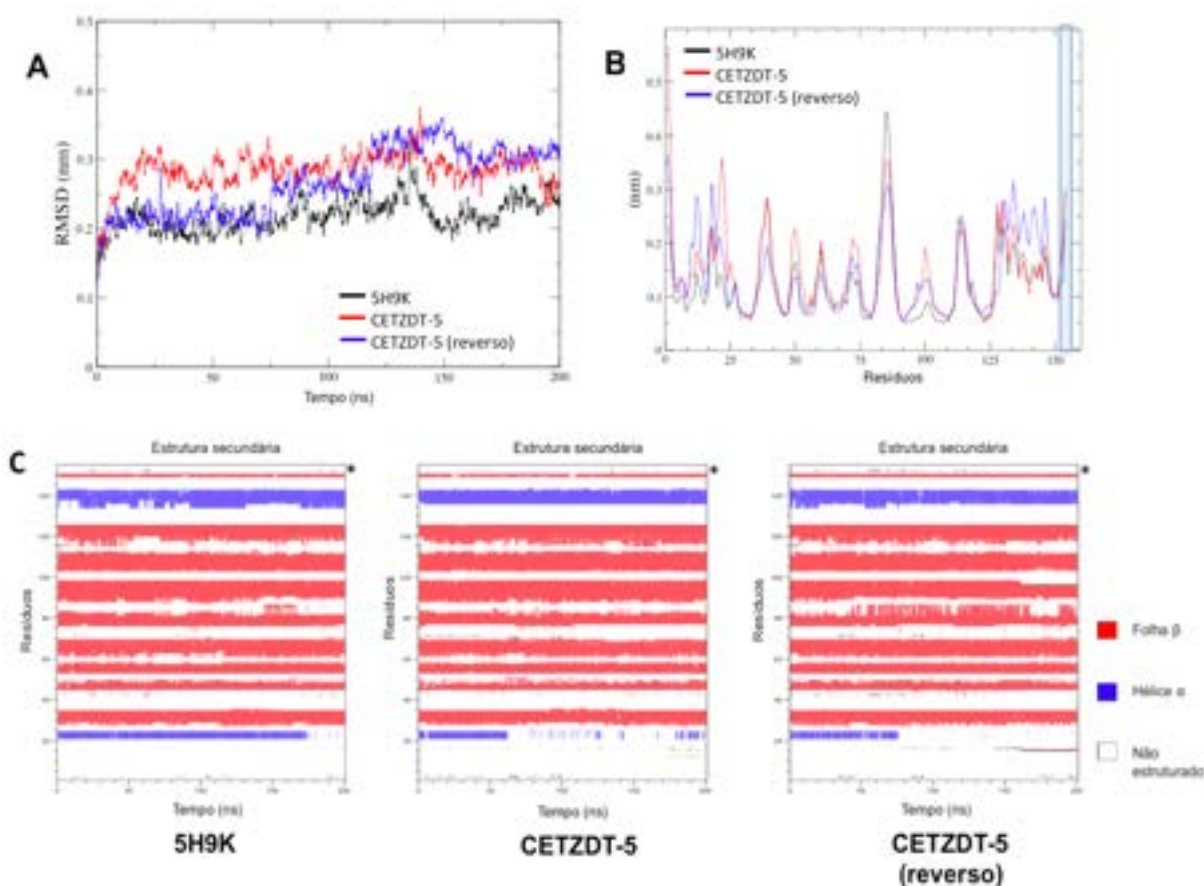


Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: **A-** RMSD dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio de 0,25 nm (4YME e CETZDT-4/reverso) e 0,4 nm (CETZDT-4). **B-** RMSF, não há muita variação quando comparada às três estruturas onde foi inserido o enxerto, nas posições **139; 140; 141; 142**. **C-** Conteúdo de estrutura secundária da 4YME (nativo), CETZDT-4 (aptâmero), CETZDT-4/reverso (reversão de algumas mutações nos resíduos- 100+106+139+140+141+142+184+185+202) em função do tempo de simulação, indicando que não há perda considerável de conteúdo estruturado e a proteína se mantém estável.

Nas análises referentes à estrutura 5H9K e suas variantes, Figura 37A, a estabilidade das três proteínas se mantém, não variando muito do carreador. Os elementos de estrutura secundária são preservados durante a simulação. As proteínas CETZDT-5 e reverso do CETZDT-5 apresentam um RMSD estável, porém mais elevado em comparação ao nativo, provavelmente pela perda parcial de estrutura de alfa-hélice, mas acontece fora da região onde foram inseridos os resíduos.

Figura 37- Análise estrutural da proteína nativa (5H9K), aptâmero (CETZDT-5) e aptâmero com mutações revertidas (CETZDT-5)



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: **A-** RMSD dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio de 0,2 nm (5H9K), 0,3 nm (CETZDT-5 e CETZDT-5/reverso). **B-** RMSF, não há muita variação quando comparada às três estruturas onde foi inserido o enxerto, nas posições 158; 159; 160; 161. **C-** Conteúdo de estrutura secundária da 5H9k (nativo), CETZDT-5 (aptâmero), CETZDT-5/reverso (reversão de algumas mutações nos resíduos- 79+159+160+193+197) em função do tempo de simulação, indicando que não há perda considerável de conteúdo estruturado e a proteína se mantém estável.

Até então apresentamos os parâmetros de filtragem para os primeiros aptâmeros produzidos. No entanto, na próxima seção apresentamos a inclusão de um critério de classificação de estrutura e aplicamos para seleção de estruturas dentro das já produzidas nas etapas de desenho e ancoragem molecular e que foram recusadas no primeiro momento, mas que foram bem ranqueadas segundo esses critérios que introduzimos. Para manter uma uniformidade nas nossas análises, seguimos observado também as métricas de interface e estruturais, já pontuados na seleção anterior e também aplicamos esses parâmetros nos aptâmeros analisados anteriormente.

6.7 Filtrando outros aptâmeros por meio de parâmetros CAPRI

Terminado a etapa anterior e escolhido até então os aptâmeros com melhores características de interface e estrutura (CETZDT-2, CETZDT-3), iniciamos uma segunda tentativa de filtrar estruturas, resolvemos observar os parâmetros de interface CAPRI (Tabela 4) de todas estruturas que produzimos e armazenamos, triar aptâmeros dentro dos milhões de estruturas que já tínhamos nas etapas anteriores. Como já pontuado na revisão desta tese, CAPRI (Avaliação Crítica de Interações Previstas, *do inglês Critical Assessment of Predicted Interactions*) (MÉNDEZ *et al.*, 2003) é uma iniciativa para testar algoritmos computacionais em previsões às cegas de estruturas 3D de complexos de proteínas determinados experimentalmente.

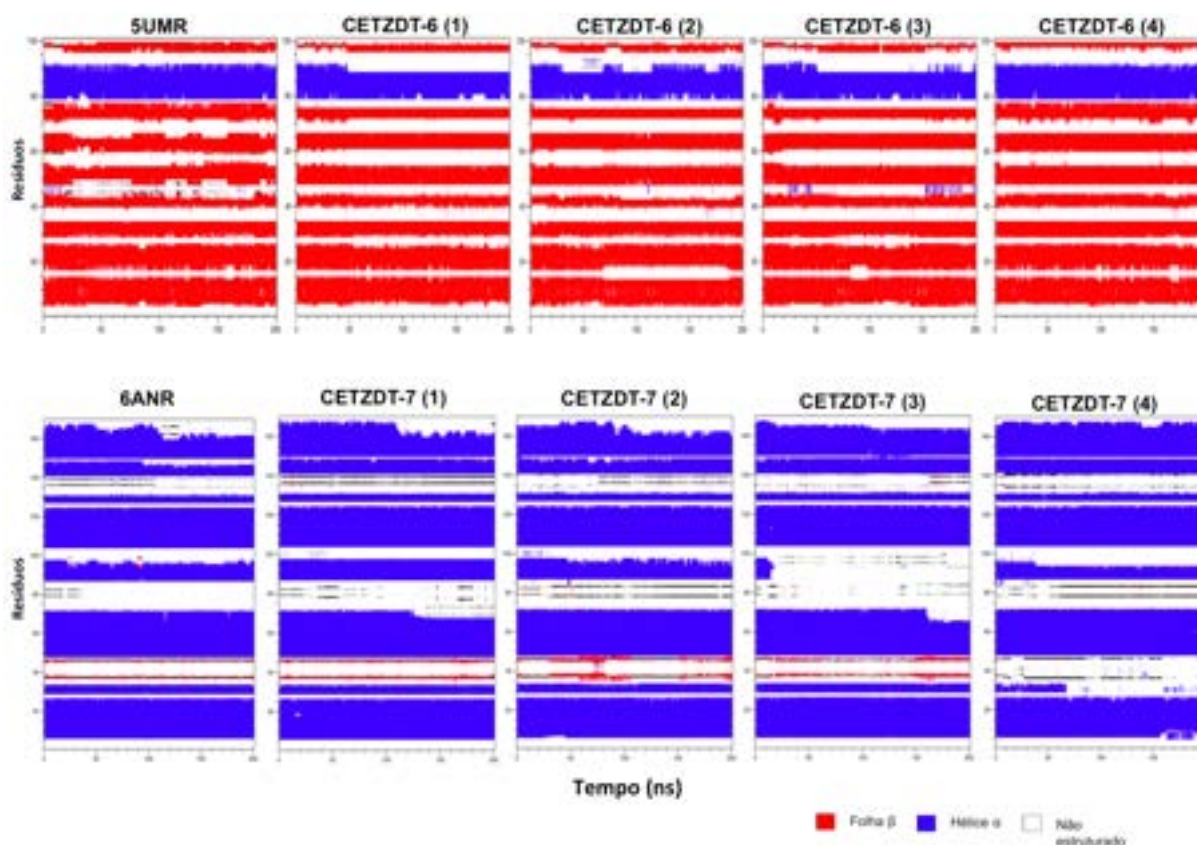
Além das métricas de interface já usadas na seleção dos aptâmeros anteriores, adicionamos os parâmetros de interface preconizados pelo CAPRI que não tinham sido avaliados até então para nenhuma das estruturas. Desta forma, as estruturas foram agrupadas em quatro categorias com base nos três parâmetros de ranqueamento fornecidos pelo *ancoragem* molecular proteína-proteína, *fnat*, *I_RMS* e *L_rms*. Assim os aptâmeros foram classificados em altamente precisos, de média precisão, aceitáveis e incorretos (Tabela 4). Depois de selecionar os 8 novos aptâmeros, quatro originados do carreador 5UMR, nomeados de CETZDT-6 e quatro 6ANR nomeados de CETZDT-7, quatro de cada resultante de cada carreador, decidimos verificar as métricas de interface (Tabela 3 e 4 no apêndice do trabalho) com a finalidade de ter uma corroboração e assim mais elementos que apontasse para a qualidade das estruturas.

Tabela 4- Estruturas melhores ranqueadas segundo os critérios CAPRI

Fnat	I_rmsd	I_sc	ID
1.000	0.373	-19.921	CETZDT-6 (1) (acetável)
1.000	0.845	-17.103	CETZDT-6 (2) (alta)
1.000	0.512	-17.125	CETZDT-6 (3) (alta)
0.857	0.696	-13.030	CETZDT-6 (4) (alta)
1.000	0.765	-16.687	CETZDT-7 (1) (alta)
1.000	0.643	-11.474	CETZDT-7 (2) (alta)
1.000	0.623	-17.378	CETZDT-7 (3) (alta)
0.985	0.612	-16.996	CETZDT-7 (4) (alta)

Fonte: Elaborado pelo o autor

Para verificar a estabilidade dos novos desenhos selecionados, os mesmos foram submetidos a DM e apresentados na Figura 38, pode se verificar nas análises de estruturas secundárias, todos os desenhos foram comparados ao comportamento dos carreadores, assim como anteriormente para os primeiro grupo de aptâmeros. Os desenhos referentes ao 5UMR, o aptâmetro CETZDT-6 (4) se apresentou mais estável do que os demais, no entanto todos os desenhos não foram perturbados na região do enxerto. No estudo dos aptâmeros que foram resultantes das modificações na estrutura da 6ANR, apenas CETZDT-7 (2) teve uma semelhança com o carreador. O CETZDT-7 (3) foi bastante perturbado, no entanto fora da área do transplante.

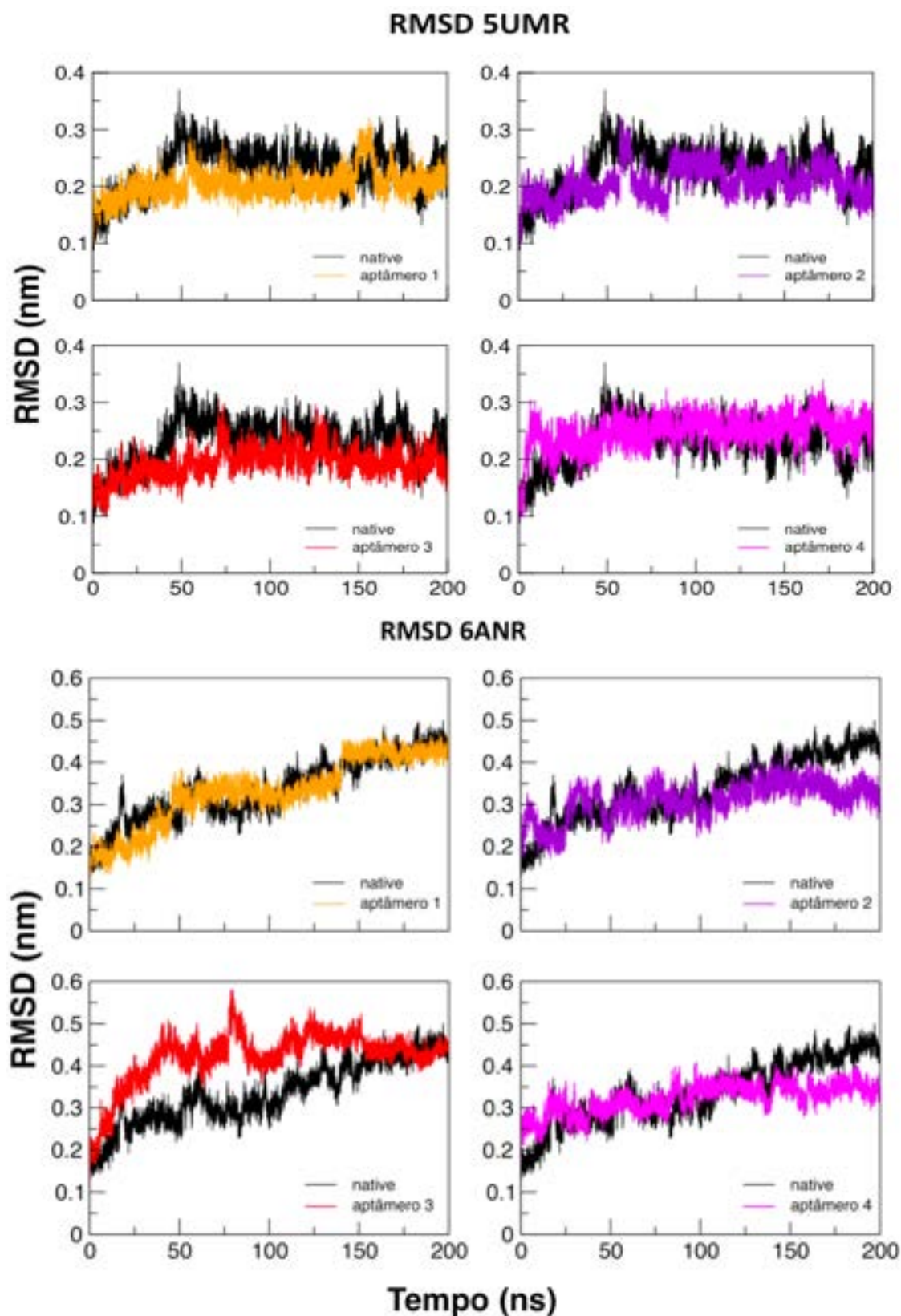
Figura 38- Análise estrutural da proteína nativa (5UMR e 6ANR) e de 4 desenhos com esses carreadores

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Nos desenhos com a 5UMR os resíduos transplantados foram SER27, ASP44, THR45, ASN46, ASN47; Nos desenhos com 6ANR os resíduos transplantados: ASP5, THR6, ASN7, ASN8, SER127.

Os desenhos resultantes dos carreadores 5UMR e 6ANR apresentaram RMSD estáveis, convergindo de forma inicial para valores de RMSD próximos aos das suas proteínas nativas (Figura 39). Os desenhos oriundos da 5UMR como era esperado pela conservação das estruturas secundárias, os RMSD foram estáveis. Como foi observado, o CETZDT-7 (3) apresentou perda de alfa-hélice que contribuiu para uma instabilidade inicial. Já as mutações no CETZDT-7 (2) permitiram ganho de estabilidade.

Figura 39- Estabilidade dos aptâmeros selecionados



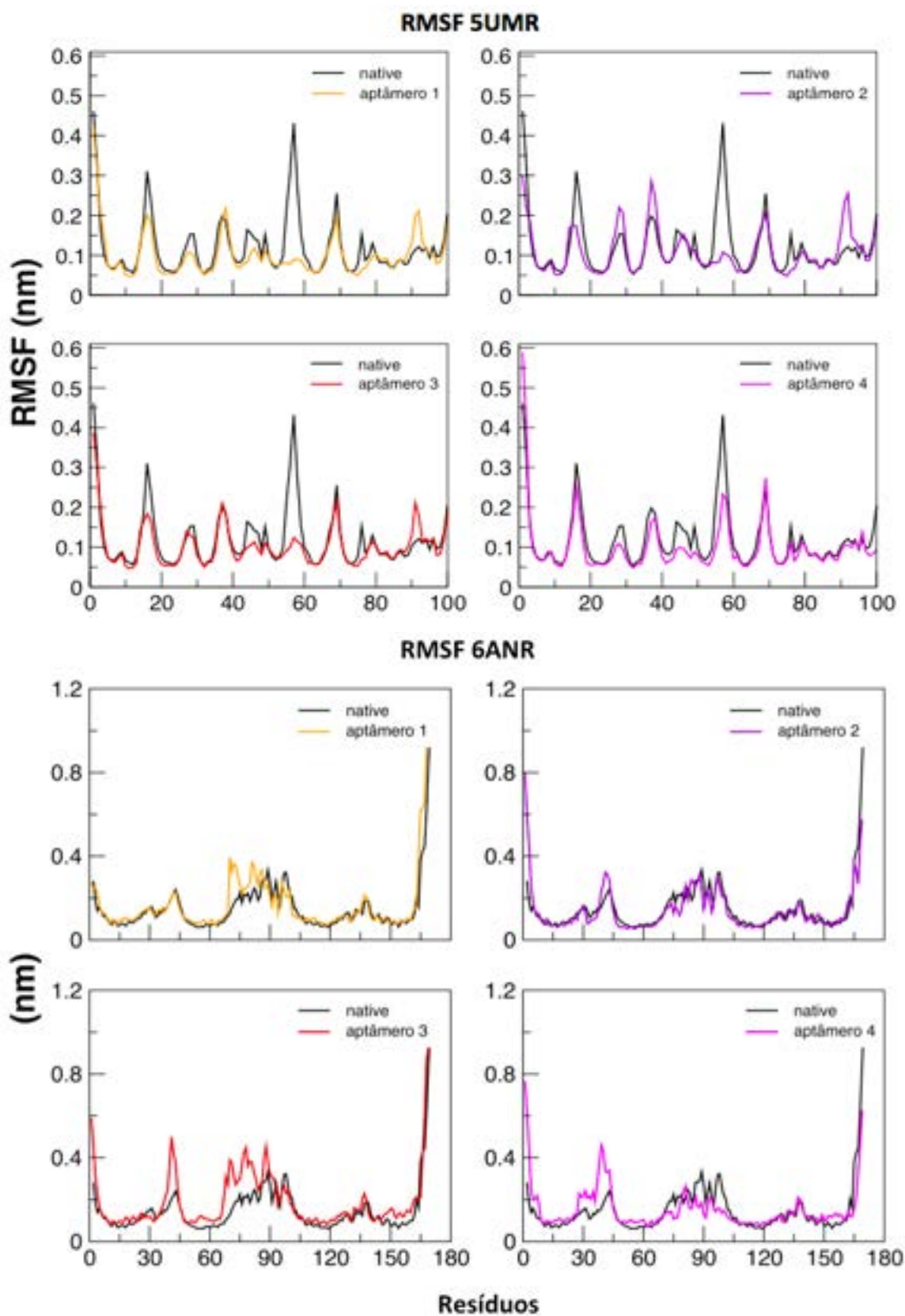
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- RMSD dos átomos do *backbone* da proteína em função do tempo, convergindo para um RMSD médio de 0,2nm, o mesmo apresentado pela estrutura nativa 5UMR e para todos os desenhos resultante desse carreador, apontando para a estabilidade das estruturas após o transplante do motivo. Todas as estruturas

projetadas com a proteína 6ANR convergiram em picossegundos com RMSD médio de 0,35nm, o mesmo comportamento apresentado pelo carreador.

Os aptâmeros que foram desenhados com a 5UMR nas áreas que os resíduos foram inseridos (SER27, ASP44, THR45, ASN46, ASN47), ganhou flexibilidade (Figura 40), alterações podem ser observadas na região dos resíduos 50-60, mas que não foram modificados. Os aptâmeros 6ANR, 1, 3 e 4 tiveram regiões mais flexíveis do que o nativo, mas foram da região do enxerto 60-90 e 30-45 no caso do aptâmero 4. Com exceção do aptâmero 1, todos os demais tiveram a região inicial mais flexível do que a 6ANR.

Figura 40- Análise de flutuação dos aptâmeros selecionados



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Nos desenhos com a 5UMR os resíduos transplantados foram SER27, ASP44, THR45, ASN46, ASN47. Após os transplantes, todos os desenhos apresentaram menor flexibilização em relação ao nativo, não somente no local enxerto, mas também na região 50-60. Nos desenhos com 6ANR os resíduos transplantados: ASP5, THR6, ASN7, ASN8, SER127. No caso dos aptâmeros oriundos da 6ANR, ficaram mais flexíveis no local do enxerto, como pode ser observado nos primeiros resíduos.

As estruturas selecionadas na primeira etapa também foram avaliadas através dos parâmetros da CAPRI (Fnat, I_{rms}) e assim classificada em aceitável. Como pode se observar na Tabela 5, todas as estruturas que tínhamos selecionado anteriormente foram aprovadas segundo esses critérios sendo a CETZDT-2 altamente precisa, CETZDT-1 e CETZDT-4 de média precisão, CETZDT-5 como aceitável, nenhuma ranqueada como incorreta que são previsões consideradas equivalentes a soluções aleatórias. Isso se mostra interessante, pois conforme tem sido visto na literatura desenhos bem ranqueados nesse tipo de classificação têm maior chance de se apresentarem estáveis, sendo estruturas mais próximas das nativas (MÉNDEZ *et al.*, 2003).

Tabela 5- Classificação dos aptâmeros selecionados

Fnat	I_{rms}	I_{sc}	ID
0.500	1.830	-14.764	CETZDT-1 (médio)
0.929	0.617	-21.414	CETZDT-2 (alto)
1.000	2.304	-15.635	CETZDT-3 (acetável)
0.650	1.405	-15.495	CETZDT-4 (médio)
0.333	3.377	-18.380	CETZDT-5 (acetável)

Fonte: Elaborado pelo o autor

6.8 Melhoramento das proteínas desenhadas com base em informações filogenéticas

Um aspecto a considerar na engenharia de proteínas, principalmente quando se tem o interesse em manter a estrutura da proteína modificada (carreador), é a tolerância às mutações. Esse aspecto é ainda mais relevante quando existe o interesse em manter a estrutura proteica importante para o reconhecimento durante a interação com um determinado alvo, como foi o caso do presente trabalho. Empregamos informações filogenéticas com a finalidade de inserir mutações estabilizadoras nos desenhos selecionados, levando em consideração a diversidade das sequências naturais. Através da PSSM é possível ter a visão global da distribuição dos

aminoácidos para cada posição em sua sequência primária.

A PSSM expressa os padrões inerentes a um alinhamento de sequência múltipla de um conjunto de sequências homólogas. A ideia básica de usar perfis é comparar as sequências de consulta no banco de dados com as sequências na tabela de alinhamento, dando maior peso às posições conservadas do que às variáveis. Esses perfis são obtidos com um conjunto de pontuações de probabilidade para cada aminoácido (ou intervalo) em cada posição do alinhamento. Desta maneira, puderam ser excluídos aminoácidos pouco frequentes ou raros nas sequências dos aptâmeros, levando em consideração o consenso para determinada posição, essas modificações se refletem no aumento da estabilidade, expresso pelo *score* dos desenhos, conforme a Tabela 6. Esse tipo de metodologia já vem sendo aplicada na engenharia de proteína levando aumento de rendimento da expressão proteica e estabilidade de anticorpos (WARSZAWSKI *et al.*, 2019; Borenstein-Katz *et al.*, 2021). Como os aptâmeros, já se mostraram estáveis com mutações não conservadas, optou-se nesse caso não repetir as DM dos desenhos após serem submetidos a essa etapa.

Tabela 6- O *score* das estruturas depois de modificações baseadas na PSSM

Descrição	<i>Score</i>	<i>Score - PSSM</i>
CETZDT-1	-390.836	-396.557
CETZDT-2	-472.246	-489.163
CETZDT-3	-539.986	-549.755
CETZDT-4	-454.341	-519.513
CETZDT-5	-340.539	-345.826
CETZDT-6	-290.539	-290.754
CETZDT-7	-456.891	-501.492

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Todas as estruturas apresentaram maior *score* depois da etapa de modificações das mutações por aminoácidos consensos, apontando para uma maior estabilidade proteica.

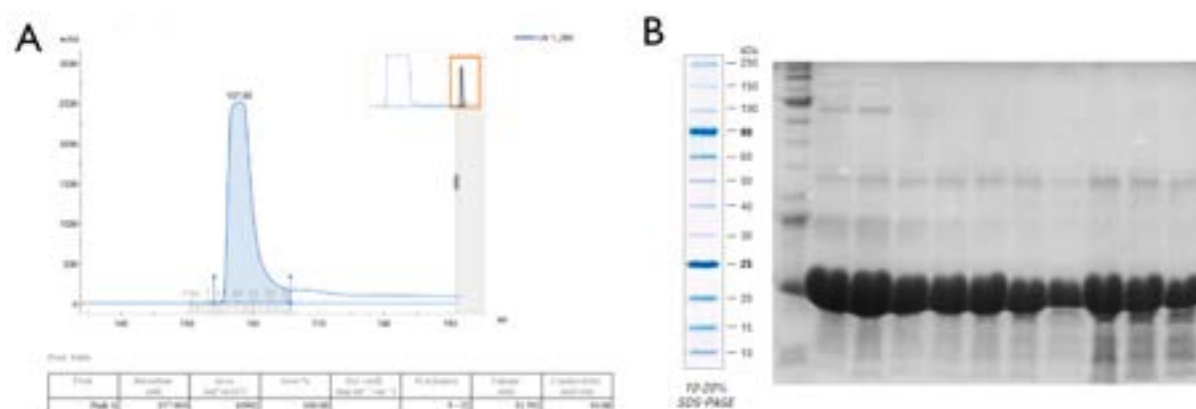
Com o conjunto de técnicas computacionais foi possível desenvolver e analisar milhares de possíveis candidatos a aptâmeros do CHIKV em curto intervalo de tempo e de forma racional. As métricas de interface foram calculadas para os aptâmeros que apresentam simultaneamente menor energia de ligação e *interface score*. Além disso, simulações de DM de 150ns foram usadas para investigar se as conformações nativas dos carreadores foram mantidas durante o tempo simulado. Através da geração de um conjunto estatístico-mecânico

de configurações, propriedades de equilíbrio de interesse foram inferidas. Assim, com base em um conjunto de dados de DM, os aptâmeros CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram escolhidos para posterior caracterização experimental, uma vez que apresentaram concomitantemente os parâmetros de interface desejado e estabilidade estrutural conforme verificado por meio de simulações DM, além de terem sido aperfeiçoados com informações filogenéticas, mostrado através do score como visto na Tabela 6.

6.9 Expressão e purificação dos aptâmeros

Devido aos resultados teóricos promissores indicando que as proteínas projetadas (CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7) são estáveis e com potencial de se ligarem a E2B, foram otimizadas as sequências de DNA codificadoras das mesmas, visando a expressão bacteriana. As proteínas CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram produzidas e purificadas a partir de lisados celulares bacterianos submetidos a cromatografia de afinidade. Depois de purificadas, os aptâmeros passaram pela avaliação de afinidade por MST e diante desse resultado a de melhor afinidade, CETZDT-2 foi escolhida para a caracterização de estabilidade estrutural por CD e posteriormente para ensaios de neutralização viral.

Alíquotas purificadas da CETZDT-2 em SDS-PAGE mostraram bandas de massa molecular esperada, além disso houve um alto rendimento de expressão de 154,62mg/mL (Figura 41). O carreador que originou essa proteína é um fator de transcrição bacteriana e por ter sido expressa em *E. coli*, pode ter possibilitado esse alto rendimento em detrimento aos demais desenhos 40,76mg/mL (CETZDT-3) e 60,34mg/mL (CETZDT-7). Importante pontuar que todos os carreadores da biblioteca montada para as etapas de desenho, como já mencionado, tinham sido expressos anteriormente em sistema procarioto. Apesar do enxerto dos resíduos para reconhecimento da E2B, foram retirados os aminoácidos que não faziam parte da interface de ligação, sempre que possível foram revertidas essas mutações para que os desenhos tivessem uma alta taxa de identidade com seus respectivos carreadores. Essas etapas que colaboraram para conservação das características provavelmente favoreceram o enovelamento proteico e conseqüentemente para o bom rendimento de produção dos aptâmeros.

Figura 41- Expressão e purificação da proteína CETZDT-2

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: (A) Perfil de purificação da amostra CETZDT-2 no equipamento ÄKTA com a coluna HiTrap Histidina HP. No gráfico, o eixo Y representa a absorvância da luz UV (mAU) e o eixo X o volume de eluição. A região em azul representa as frações coletadas (B) Análise SDS-PAGE da proteína CETZDT-2 purificada. As bandas na altura de 20kDa referentes ao aptâmero são visualizadas em cada fração coletada e aplicada no gel de SDS-page conforme a ordem da coleta na etapa de purificação por afinidade, sendo a primeira coluna referente ao marcador de peso molecular. O rendimento total da CETZDT-2 foi de 154,62mg/ml. O marcador de peso molecular utilizado foi ProteinLadder (10-250 kDa) - New EnglandBiolabs(colocado anteriormente ao gel SDS-page para visualização das bandas com o peso de cada uma delas à direita).

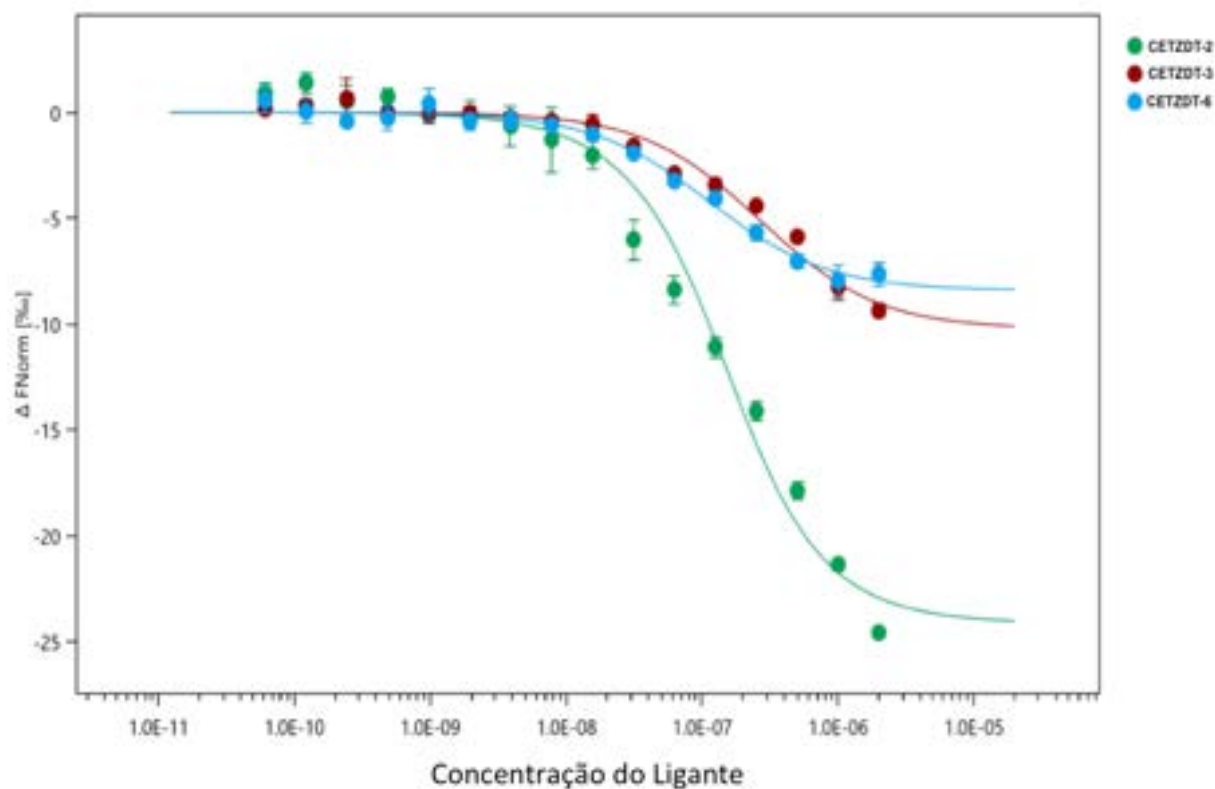
6.10 Avaliação da afinidade entre os aptâmeros e o CHIKV

A MST permite análises quantitativas de interações de proteínas em solução livre. A técnica é baseada na termoforese, o movimento direcionado de moléculas em gradientes de temperatura. A técnica se mostra altamente sensível a todos os tipos de alterações de propriedades moleculares induzidas por ligação, seja em tamanho, carga, camada de hidratação ou conformação e, por esse motivo, tem sido utilizada para fazer análises biofísicas (Jerabek-Willemsenet *al.*, 2011).

Neste trabalho, foi empregada para obtenção da afinidade de ligação expressa em termos de constante de dissociação no equilíbrio (K_D). Para tanto, a concentração dos aptâmeros marcados CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram mantidas fixas em 100nM, enquanto as concentrações do domínio CHIKV E2B (variando de 317 μ M a 0,0096 μ M), em uma série de 16 diluições de 1:2. O termógrafo para estas interações de ligação resulta em curvas MST bem definidas (Figura 42), decrescente com o aumento da concentração de proteína (norma F [%] começando em 0 unidades, diminuindo para 10 unidades para CETZDT-3, CETZDT-7 e 25 unidades para CETZDT-2, a proteína mostrou uma diminuição mais forte na fluorescência no estado ligado do que no estado não ligado) é observado com um comportamento sigmoidal que permite deduzir um K_D de 1.003E-07, 2.6825E-07 e 1.1213E-07, respectivamente. Essa afinidade de ligação é semelhante às que são tipicamente observadas para anticorpos naturais,

que variam de escala micromolar (10 a 300 μ g/ml) a nanomolar (4 a 2.266ng/mL) (HUCKER *et al.*, 2021; KOSE *et al.*, 2019).

Figura 42- Afinidade entre CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-6 e a E2B medida por meio de MST



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A concentração dos aptâmeros marcados CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram mantida fixas em 100nM, enquanto as concentrações do domínio CHIKV E2B (variando de 317 μ M a 0,0096 μ M), em uma série de 16 diluições de 1:2. A proteína mostrou uma diminuição mais forte na fluorescência no estado ligado do que no estado não ligado. As barras de erro representam o erro padrão de n= 3 medições.

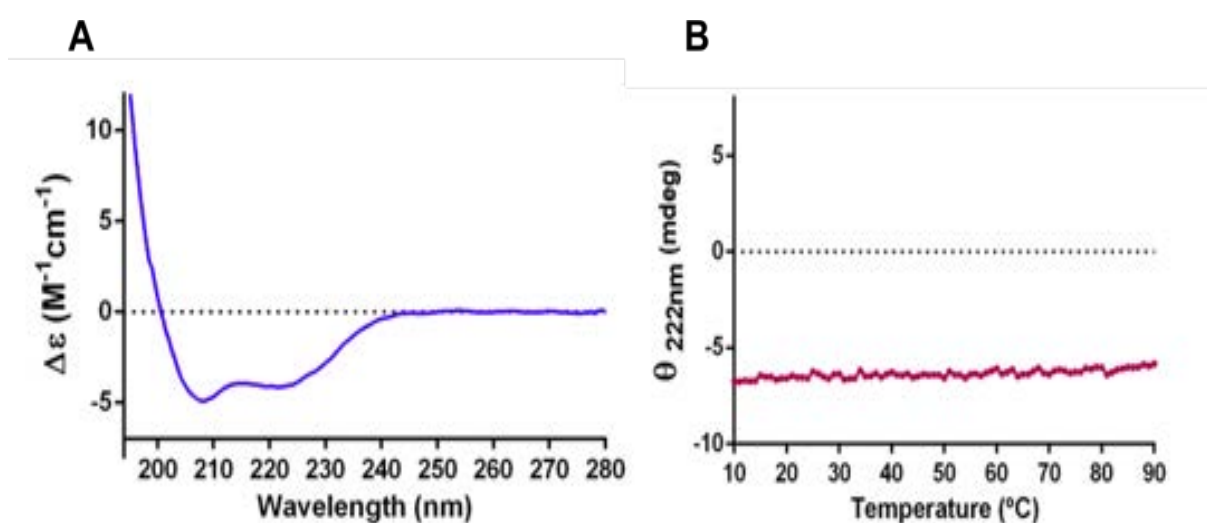
Tendo em vista que a CETZDT-2 reunia as melhores características frente aos outros aptâmeros, como os parâmetros de interface, energia de ligação e o *interfacesscore* e também apresentou o melhor KD e rendimento protéico e os três aptâmeros tinham recebido os mesmos enxertos, a mesma foi selecionada para outras avaliações biofísicas e ensaios de neutralização apresentadas a seguir.

6.11 Verificação da estabilidade do CETZDT-2

Os espectros apresentaram bandas negativas em 222nm e 208nm, sugerindo a predominância de estruturas helicoidais (GREENFIELD *et al.*, 2006), corroborando o conteúdo de estrutura secundária previsto (Figura 43). Mesmo assim, a análise de deconvolução dos espectros indicou uma quantidade de 40% de conteúdo helicoidal, enquanto

os dados de simulação MD para trajetória de 200ns computaram um total de 70% da estrutura helicoidal. Essa discrepância pode ser atribuída aos elementos estruturais não identificados na análise experimental. A predominância desse tipo de estrutura secundária está relacionada à estrutura do carreador, a proteína NusB, na qual a estrutura tridimensional revela esse mesmo perfil de uma dobra alfa-helicoidal (BONIN *et al.*, 2004). O experimento de desnaturação térmica mostrou que os valores de elipticidade em 222nm permaneceram constantes (Figura 43B), indicando que a variação de temperatura não causou alterações estruturais no CETZDT-2. Assim, na faixa de temperatura avaliada (10°C a 90°C), não foi observado nenhum processo de desenovelamento para esta proteína. Essa estabilidade térmica pode ser explicada pelo fato do carreador ser proveniente de *Thermotogamaritima*, única bactéria conhecida capaz de crescer em altas temperaturas, sugerindo que a transição do CETZDT-2 para o estado desenovelado ocorre em temperaturas superiores à temperatura máxima avaliada.

Figura 43- Caracterização da estrutura secundária da CETZDT-2



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A) Espectros de CD de CETZDT-2. Os valores de elipticidade foram convertidos para delta épsilon usando os parâmetros: concentração de proteína, comprimento do caminho da cubeta e número de ligações peptídicas. B) Curva de desnaturação térmica de CETZDT-2. Os valores de elipticidade foram monitorados no comprimento de onda fixo de 222nm em função da temperatura.

O fato da CETZDT-2 ter apresentado essa alta estabilidade térmica pode oferecer vantagens para o uso dessa molécula. A utilização terapêutica de proteínas é de grande importância para o tratamento de várias doenças devido a especificidade e atividade mesmo em pequenas concentrações. Entretanto, manter a complexidade estrutural se apresenta como

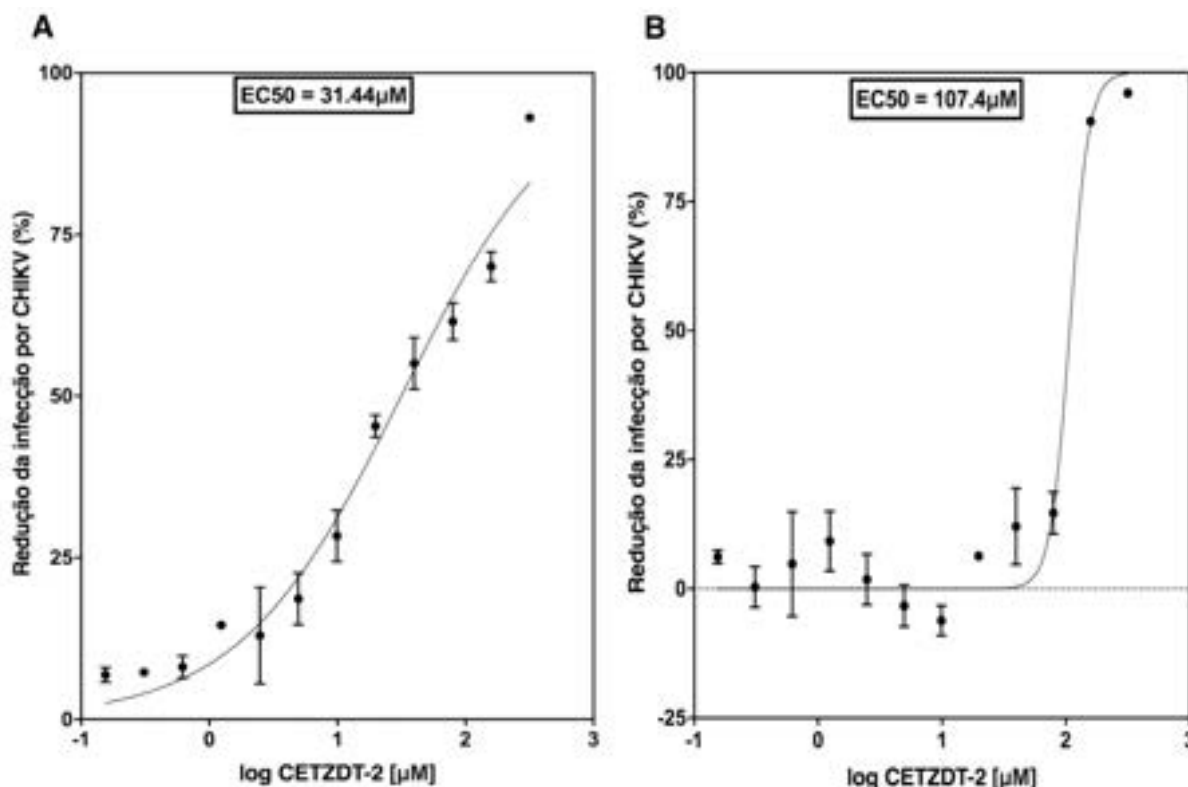
uma barreira para uso terapêutico, perdas na composição tridimensional podem afetar a atividade. Na fase crônica de CHIKV, os pacientes têm sintomas parecidos com os da artrite reumatóide, dores fortes, inchaço e limitação de movimento, e alguns trabalhos evidenciaram que esses sintomas estão relacionados com um processo inflamatório sustentado por uma replicação viral persistente (LIN; YEH; LIN; WAN *et al.*, 2011; REDDY; DESAI; KRISHNA; VASANTHAPURAM, 2017). Apesar desse entendimento, pouco se evoluiu no tratamento da fase crônica que se resumisse a amenizar sintomas. Moléculas pequenas como a CETZDT-2 podem ser usadas como terapias a nível de articulação para neutralização do CHIKV e com a segurança de manter o envelhecimento adequado ao longo do percurso mesmo que submetida à temperatura corporal.

6.12 Avaliação do potencial de neutralização viral dos aptâmeros

Depois de determinada a afinidade a CETZDT-2 foi selecionada para avaliar a capacidade de neutralização da entrada do vírus em células, para isso foram realizados os ensaios de neutralização. Nesses ensaios, as diluições da CETZDT-2 foram previamente incubadas com CHIKV e MAYV, para promover a formação dos imunocomplexos, se de fato das proteínas apresentarem essa capacidade. Caso essa ligação ocorra, não detectamos a formação de placas nas células vero. Sugerindo assim, que a proteína foi capaz de neutralizar a ação viral na célula.

Os ensaios de neutralização de pré-fixação determinam se os anticorpos bloqueiam o envolvimento viral antes da fixação celular (por exemplo, através da agregação de vírions ou inibição da fixação nas células). Após as células serem incubadas, a produção viral foi medida usando testes de neutralização por redução de placa (PRNT) e microneutralização (MN). Metade da concentração efetiva máxima (EC50) de CETZDT-2 foi determinada como sendo 31,44 μ M (1620ng/mL) (PRNT) e 107,4 μ M (5536ng/mL) (MN) para CHIKV (Figura 44). Todas as concentrações da CETZDT-2 testadas nos ensaios de neutralização foram usadas sozinhas em células vero com a finalidade de verificar efeito citotóxico, que não foi evidenciado para nenhum dos poços incubados em iguais condições de tempo e temperatura do ensaios.

Figura 44- Neutralização do CHIKV pelo CETZDT-2



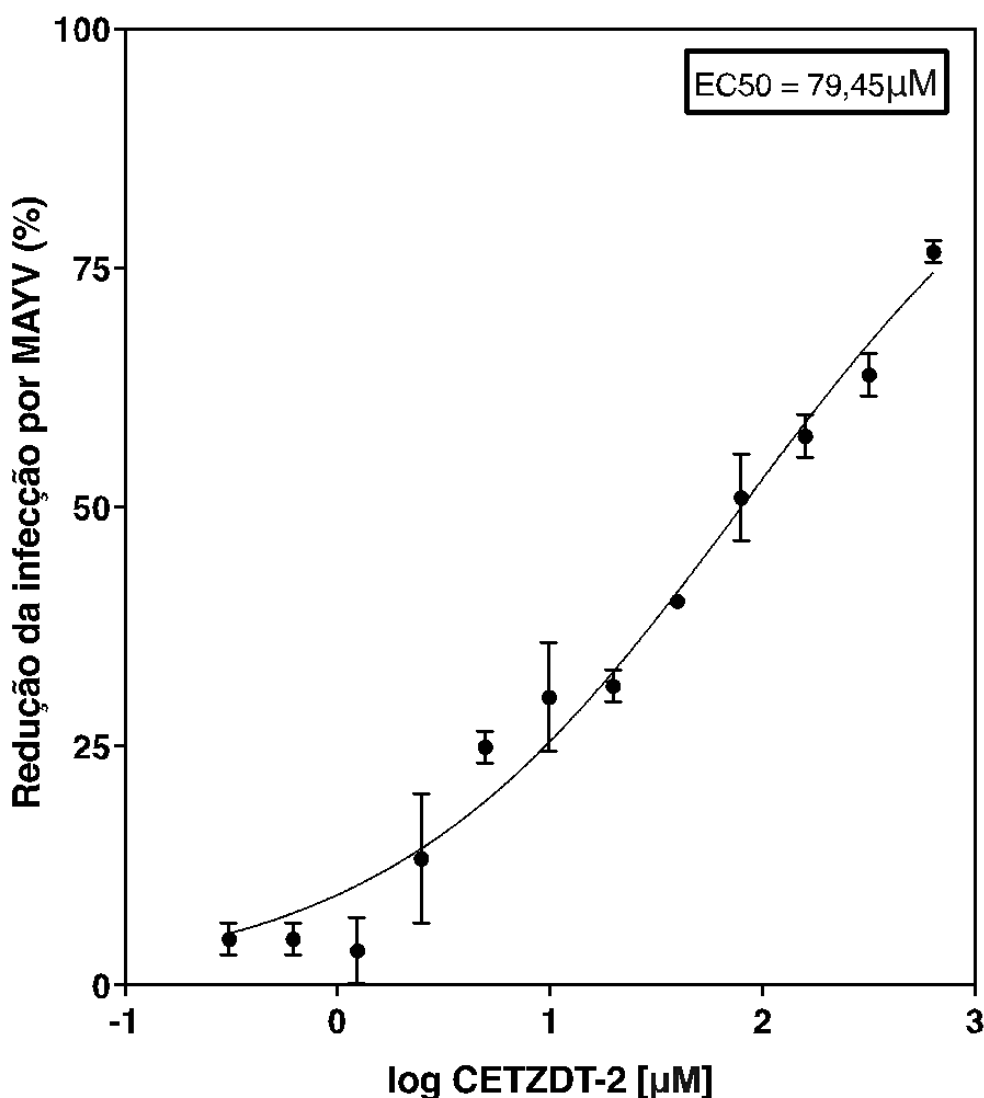
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A atividade de neutralização do CETZDT-2 foi medida por PRNT (A) e MN (B). As concentrações indicadas de ligantes foram incubadas com 240.000 PFU (PRNT) e 625 PFU/poço (MN) de CHIKV e subsequentemente transferidos para monocamadas de Vero E6. O CETZDT-2 neutraliza potentemente o CHIKV, com valores de EC50 31,44 μM (PRNT) ou 107,4 μM (MN). Os dados são representativos de dois experimentos independentes, cada um realizado em duplicata técnica. Os valores de PRNT50 (A) e MN (B) indicando a concentração da proteína desenhada que neutralizou 50% das unidades formadoras de placa foram determinados por ajustes de curva usando regressão não linear em *GraphPad Prism v.8.0*.

Avaliamos a capacidade de reação cruzada e também o potencial de neutralização do CETZDT-2 contra o MAYV, que também é um alfavírus. A febre Mayaro é uma infecção causada pelo vírus Mayaro (MAYV) que se destaca entre as doenças negligenciadas transmitidas por artrópodes. O Brasil é o país com o maior número de casos confirmados de infecção por MAYV (LIMA *et al.*, 2018). Como os estudos provaram que o domínio B da proteína de superfície E2 é altamente conservado em todo o reino dos alfavírus, o fato de os anticorpos policlonais CHIKV mostrarem uma reatividade cruzada e proteção contra vários alfavírus não é surpreendente (FOX *et al.*, 2015). Essas regiões se apresentam como locais de ligação de Mabs amplamente neutralizantes (DAVIDSON e DORANZ, 2014). Conforme já visto na literatura, os Mabs que neutralizam o CHIKV, conseguiram neutralizar os alfavírus relacionados (FOX *et al.*, 2015). Fox identificou 2 mAbs (187 e 265) que protegem camundongos contra CHIKV e de forma cruzada contra ONNV e MAYV. O ONNV mostra uma identidade de aminoácidos da proteína de envelope de 86% e MAYV de 60% com

CHIKV. Ambos os vírus relacionados também podem causar sintomas artríticos como CHIKV. Como alguns resíduos do paratopo transplantado para a CETZDT-2 pertencia ao Mab265, era esperado que houvesse reconhecimento por parte do estapele MAYV (Figura 45). O ensaio de microneutralização para o MAYV não foi produzido, pois não tínhamos disponível um anticorpo monoclonal ou soro caracterizado que fizesse o reconhecimento desse vírus disponível no laboratório de virologia da FIOCRUZ/PE.

Figura 45- Neutralização do MAYV pelo CETZDT-2



Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A atividade de neutralização do CETZDT-2 foi medida pelo PRNT para o MAYV. As concentrações indicadas de ligantes foram incubadas com 300.000 PFU/poço de MAYV e subsequentemente transferidos para monocamadas Vero E6. O CETZDT-2 neutraliza o MAYV, com valores de EC50 79,45μM (PRNT).

A prevenção de doenças infecciosas por meio de vacinas ocorre em grande parte por meio da resposta imune humoral e da produção resultante de anticorpos específicos de alta afinidade. Anticorpos que fornecem proteção contra infecção, ou imunidade esterilizante, são chamados de anticorpos neutralizantes porque inibem diretamente a infecção produtiva das células hospedeiras. Como mencionado, os alfavírus entram nas células através da via endocítica. A proteína do envelope viral E2 é a proteína de ligação ao receptor. A neutralização provinda do bloqueio de ligação à E2B pode ser explicada por modificações no padrão de mudanças necessárias para que a ligação ao receptor celular aconteça. Como já posto em trabalho anterior (SAHOO *et al.*, 2019) com base em informações de estrutura

disponíveis em diferentes proteínas E2-E1 de alfavírus, foi proposto um modelo mecanicista para a ligação ao receptor como um evento desencadeante na entrada de alfavírus. A ligação do receptor no domínio A desencadeia alostericamente o movimento do domínio C em direção a E1, empurrando E1 para longe do pico trimérico. Simultaneamente ou posteriormente, o domínio B se afasta do domínio A, abrindo e expondo uma alça de fusão interna (LF) no domínio II de E1, essa se insere e âncora na membrana do hospedeiro durante a fusão. Sendo assim esse LF é mascarado pelos domínios A e B de E2, que formam uma estrutura tipo 'grampo' (VOSS *et al.*, 2010). O LF de E1 pode ser desmascarado somente quando os domínios E2 A e B se afastam do domínio E1 II. Movimentos de domínio após a ligação do receptor para desencadear a ativação da proteína de fusão também foram relatados para outros vírus (NAVARATNARAJAH *et al.*, 2011).

Vale ressaltar a existência de Mabs CHIKV mais potentes, humanos (SELVARAJAH, *et al.*, 2013) e murinos (PAL *et al.*, 2013), porém nossos resultados são encorajadores como ponto de partida para a maturação da afinidade. Uma vez que os Mabs neutralizantes estão sendo investigados como plataforma para o tratamento de infecções por CHIKV e, portanto, moléculas com capacidade de neutralização comparável com menor custo de produção podem impulsionar a implantação de estratégias terapêuticas e profiláticas contra o CHIKV. Embora ainda não existam anticorpos terapêuticos com esse tipo de metodologia licenciados, o custo final de produção provavelmente será muito menor do que o da molécula de IgG correspondente feita em células cultivadas. Os aptâmeros, como CETZDT-2, podem eliminar ou diminuir a necessidade da humanização da terapêutica de mAb, podendo assim oferecer vantagens de tempo e custo de fabricação (BRUGGEMANN *et al.*, 2015; SPIESS *et al.*, 2015). Sendo assim, este estudo pode sugerir uma plataforma para o rápido desenvolvimento e implantação de bloqueadores virais e para muitas outras doenças infecciosas emergentes.

Outra forma de aumentar a capacidade da CETZDT-2 é se estudar o uso combinado ou com outros bloqueadores que podem vir a ser desenhados com a metodologia proposta neste trabalho, talvez com adição de inteligência artificial ou até mesmo com outros anticorpos disponíveis. Esse tipo de estratégia tem se mostrado bem sucedida e verificada a sua eficiência frente a desafio com CHIKV em camundongos e primatas não humanos (PAL *et al.*, 2013; PAL *et al.*, 2014). Uma combinação de mAbs pode apresentar alta atividade neutralizante mais do que a de mAbs individuais. A pesquisa sobre o vírus da hepatite B e o vírus sincicial respiratório mostrou o potencial de neutralização dos coquetéis de mAb (uma combinação de dois ou mais mAbs). Outra maneira é explorar a ação sinérgica de fármacos antivirais com a CETZDT-2, esse tipo de conduta já vem sendo observada com êxito em

certos vírus, como influenza (JULIEN *et al.*, 2019). No caso do CHIKV, o uso de uma combinação de CTLA4-Ig e terapia de anticorpos antivirais mostrou capacidade de controlar a artrite e a doença grave e é candidato para testes em humanos (BREGENHOLT *et al.*, 2006).

Além das limitações de produção de anticorpos humanos, um número limitado de mAbs CHIKV humanos foi relatado, a grande maioria dos quais exibe atividade neutralizante modesta (FONG *et al.*, 2014; FRIC *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2011; SELVARAJAH *et al.*, 2013; WARTER *et al.*, 2011). Outra vantagem do presente trabalho é ter direcionado a CETZDT-2 para se ligar a um epítipo conservado de E2B, seguindo seu potencial para neutralizar diferentes cepas da linhagem CHIKV, como já foi descrito pela neutralização de Mabs que foram isolados de indivíduos infectados recuperados. Esse planejamento se mostra interessante principalmente diante da possibilidade de aumento da afinidade e potencial de neutralização de vírus com diferentes cepas.

Dada a urgência do desenvolvimento de abordagens terapêuticas contra a infecção por CHIKV e MAYV, as propriedades anti-CHIKV e MAYV do CETZDT-2 identificadas neste estudo o tornam um candidato promissor para ensaios *in vivo*. Além disso, estudos adicionais combinando CETZDT-2 com outros inibidores de CHIKV recentemente identificados são necessários e podem abrir caminho para mitigar os resultados graves da infecção por CHIKV e MAYV na população.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, projetamos proteínas artificiais direcionadas ao domínio E2B do CHIKV que de forma cruzada reconheceram também o MAYV. Por meio da construção do complexo e de nossas análises foi possível mapear o comportamento de diferentes métricas da interface de interação Fab-CHIKV 265 e E2B. Os dados de interface foram primordiais para entendimento do reconhecimento antígeno-anticorpo que possibilitou a engenharia de aptâmeros por meio de um procedimento de desenho de interface com base em interações favoráveis identificadas de forma teórica dentro da interface de um anticorpo anti-CHIKV previamente relacionado, mAb-265. A etapa computacional deste trabalho foi realizada por um esquema de busca Monte-Carlo levando em consideração informações filogenéticas, gerando milhões de proteínas projetadas, as quais foram filtradas por métricas de interface. Simulações de dinâmica molecular mostraram que as proteínas CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-7 foram estruturalmente estáveis e aptas para serem selecionadas para etapas de expressão e estudo de afinidade. A afinidade de ligação foi obtida através de MST, produzindo valores que são consistentes com as interações antígeno-anticorpo naturais, na escala nanomolar. No entanto, o aptâmero que apresentou maior afinidade durante a MST, a CETZDT-2, foi escolhido para análises estruturais e ensaios de neutralização viral. Já se tinha observado durante os cálculos computacionais que o CETZDT-2 mantinha sua dobra nativa, dado confirmado no ensaio de dicroísmo circular. A explicação da estabilidade está atrelada à origem do carreador, de bactérias extremófilas, suportando altas temperaturas sem sofrer perda estrutural faz dessa proteína interessante carreador a vir ser utilizado em outros trabalhos de engenharia de proteínas. Durante os ensaios de neutralização viral com CETZDT-2 feitos em células Vero E6 a neutralização aconteceu na faixa de 31,44 μ M (PRNT) ou 107,4 μ M (MN) para o CHIKV. Já para o MAYV o CETZDT-2 neutraliza com valores de EC50 79,45 μ M (PRNT). A perda de infecciosidade viral sugere fortemente que o CETZDT-2 se liga à proteína do envelope 2 do CHIKV e MAYV, o que impede a ligação posterior desses vírus aos receptores celulares ou moléculas de adesão celular e, conseqüentemente, não leva ao processo de infecção *in vitro*. Portanto, nossos resultados formam a base de uma molécula terapêutica/diagnóstica promissora contra a doença induzida pelo CHIKV, com uso expandido contra o vírus Mayaro pela semelhança das proteínas e conseqüente de epítomos e apresentado por esses dois alfavírus.

REFERÊNCIAS

ABAGYAN, R.; TOTROV, M. High-throughput docking for lead generation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 375-382, 2001/08/01/ 2001. ISSN 1367-5931. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593100002179>>.

ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chem Rev**, v. 106, n. 5, p. 1589-615, May 2006. ISSN 0009-2665 (Print) 0009-2665 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16683746>>.

AHOLA, T.; KAARIAINEN, L. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 2, p. 507-11, Jan 17 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831320>>.

AHRENS, B. Antibodies in metabolic diseases. **N Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 530-7, Sep 2011. ISSN 1876-4347 (Electronic) 1871-6784 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21473944>>.

AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat Med**, v. 16, n. 3, p. 334-8, Mar 2010. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111039>>.

ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. **The Journal of Chemical Physics**, v. 27, n. 5, p. 1208-1209, 1957. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1743957>>.

ALFORD, R. F. et al. An Integrated Framework Advancing Membrane Protein Modeling and Design. **PLoS Comput Biol**, v. 11, n. 9, p. e1004398, Sep 2015. ISSN 1553-7358 (Electronic) 1553-734X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26325167>>.

ALFORD, R. F., LEAVER-FAY, A., et al. The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 6, p. 3031–3048. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00125>>.

ALIPERTI, G.; SCHLESINGER, M. J. Evidence for an autoprotease activity of Sindbis virus capsid protein. **Virology**, v. 90, n. 2, p. 366-9, Oct 15 1978. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/726255>>.

ALLISON, B. et al. Computational design of protein-small molecule interfaces. **J Struct Biol**, v. 185, n. 2, p. 193-202, Feb 2014. ISSN 1095-8657 (Electronic) 1047-8477 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962892>>.

AN, W. et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 441-453, December 01 2017. ISSN 1995-820X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12250-017-4072-x>>.

Anfinsen CB. Principles That Govern the Folding of Protein Chains. **Science**. 1973;181(4096):223-230. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.181.4096.223>>.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology, Elsevier**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)>.

ASHWORTH, J. et al. Computational reprogramming of homing endonuclease specificity at multiple adjacent base pairs. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. 16, p. 5601-8, Sep 2010. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20435674>>.

ARE, V. N.; GHOSH, B.; KUMAR, A.; GADRE, R.; MAKDE, R. D. Crystal structure and dynamics of Spt16N-domain of FACT complex from *Cicer arietinum*. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 88. p. 36-43. 16. Mar. 2016. Elsevier. Acesso em: 16/3/2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.029>>.

BARDERAS R, DESMET J, TIMMERMAN P, MELOEN R, CASAL JI. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008;105(26):9029-9034. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0801221105>>.

BECKMAN RA, WEINER LM, DAVIS HM. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. **Cancer**. 2007;109(2):170-179. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cncr.22402>>.

BENDER, B. J. et al. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts. **Biochemistry**, v. 55, n. 34, p. 4748-4763, 2016/08/30 2016. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444>>.

BERENDSEN, H. et al. **Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration**. 1981. 331-342.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.448118>>.

BERNARD, E. et al. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11479-e11479, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628602>> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2900206/>>.

BONIN, I.; ROBELEK, R.; BENECKE, H.; et al. Crystal structures of the antitermination factor NusB from *Thermotoga maritima* and implications for RNA binding. **Biochemical Journal**. v. 383(Pt. 3): p. 419-28 1. Nov. 2004. Portland Press. Acesso em: 1/11/2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/BJ20040889>>.

BONNEAU, R. et al. Rosetta in CASP4: progress in ab initio protein structure prediction. **Proteins**, v. Suppl 5, p. 119-26, 2001. ISSN 0887-3585 (Print) 0887-3585 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835488>>.

BORENSTEIN-KATZ, A.; WARSZAWSKI, S.; AMON, R.; et al. Biomolecular Recognition of the Glycan Neoantigen CA19-9 by Distinct Antibodies. **Journal of Molecular Biology**. 433(15), 167099, 11. Jun. 2021. Elsevier. Acesso em: 11/6/2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167099>>.

BREGENHOLT, S.; JENSEN, A.; LANTTO, J.; HYLDIG, S.; HAURUM, J. S. Recombinant human polyclonal antibodies: A new class of therapeutic antibodies against viral infections. **Current Pharmaceutical Design**. v.12, n. 16, p. 2007–2015 1. Jan. 2006. Bentham Science. Acesso em: 1/1/2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.2174/138161206777442173>>.

BRGGEMANN, M.; OSBORN, M. J.; MA, B.; et al. Human antibody production in transgenic animals. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**. v.63, n. 2, p.101–108. 3. Dec. 2014. Springer Nature. Acesso em: 3/12/2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00005-014-0322-x>>.

BRUCE, V. J.; TA, A. N.; MCNAUGHTON, B. R. Minimalist Antibodies and Mimetics: An Update and Recent Applications. **ChemBiochem**, v. 17, n. 20, p. 1892-1899, Oct 17 2016. ISSN 1439-7633 (Electronic) 1439-4227 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477215>>.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **J Chem Phys**, v. 126, n. 1, p. 014101, Jan 7 2007. ISSN 0021-9606 (Print) 0021-9606 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17212484>>.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 211-27, Jul 2013. ISSN 1121-7138 (Print) 1121-7138 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>>.

CAMPOS, G. S. et al. First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. **Pediatr Infect Dis J**, v. 36, n. 10, p. 1015-1017, Oct 2017. ISSN 1532-0987 (Electronic) 0891-3668 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28650420>>.

CAMPOS, S. R. R.; MACHUQUEIRO, M.; BAPTISTA, A. M. Constant-pH Molecular Dynamics Simulations Reveal a β -Rich Form of the Human Prion Protein. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 39, p. 12692-12700, 2010/10/07 2010. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp104753t>>.

CAVRINI, F. et al. Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. **J Infect Dev Ctries**, v. 3, n. 10, p. 744-52, Dec 15 2009. ISSN 1972-2680 (Electronic) 1972-2680 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009275>>.

CECILIA, D. et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. **Arch Virol**, v. 160, n. 1, p. 323-7, Jan 2015. ISSN 1432-8798 (Electronic)

0304-8608 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233940>>.

CHAN, A. C.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 5, p. 301-16, May 2010. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414204>>.

CHANDAK, N. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177-180, March 1, 2009. ISSN 0028-3886. Disponível em: <<http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886;year=2009;volume=57;issue=2;spage=177;epage=180;aualast=Chandak>>.

CHAUDHURY, S. et al. Benchmarking and analysis of protein docking performance in Rosetta v3.2. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e22477-e22477, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829626>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3149062/>>.

CHAUDHURY, S.; GRAY, J. J. Conformer selection and induced fit in flexible backbone protein-protein docking using computational and NMR ensembles. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, n. 4, p. 1068-1087, 2008/09/12/ 2008. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283608006086>>.

CHAUDHURY, S. et al. Incorporating biochemical information and backbone flexibility in RosettaDock for CAPRI rounds 6-12. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 69, n. 4, p. 793-800, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.21731>>.

CHEN, C. I. et al. Comparative pathogenesis of epidemic and zoonotic Chikungunya viruses in a pregnant Rhesus macaque model. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 6, p. 1249-58, Dec 2010. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21118930>>.

CHEN, J. et al. A comparative insight into amprenavir resistance of mutations V32I, G48V, I50V, I54V, and I84V in HIV-1 protease based on thermodynamic integration and MM-PBSA methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 9, p. 1903-1913, 2015/09/28 2015. ISSN 1549-9596. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00173>>.

CHEN, W.; VAN DER KAMP, M. W.; DAGGETT, V. Structural and dynamic properties of the human prion protein. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 5, p. 1152-1163, 2014. ISSN 1542-0086 0006-3495. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606939>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4026773/>>.

CHO, B. et al. Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 5, p. 828-35, Oct 31 2008. ISSN 0513-5796 (Print) 0513-5796 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18972604>>.

CHOI, H. K. et al. Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 37-43, Nov 7 1991. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1944569>>.

CLEMENTI, N. et al. Role and potential therapeutic use of antibodies against herpes infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 23, n. 6, p. 381-386, Jun 2017. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28057561>>.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A.-B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus-vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014. ISSN 1999-4915. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421891>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4246241/>>.

COLAS, P. et al. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. **Nature**, v. 380, n. 6574, p. 548-550, 1996/04/01 1996. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/380548a0>>.

CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179-5197. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 9, p. 2309-2309, 1996/01/01 1996. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja955032e>>.

DAILY, M. D. et al. CAPRI rounds 3-5 reveal promising successes and future challenges for RosettaDock. **Proteins**, v. 60, n. 2, p. 181-6, Aug 1 2005. ISSN 1097-0134 (Electronic) 0887-3585 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15981262>>.

DAILY, M. D. et al. CAPRI rounds 3-5 reveal promising successes and future challenges for RosettaDock. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 60, n. 2, p. 181-186, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.20555>>.

DANIELS, C. M.; ONG, S. E.; LEUNG, A. K. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation. **Mol Cell**, v. 58, n. 6, p. 911-24, Jun 18 2015. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091340>>.

DAPIAGGI, F.; PIERACCINI, S.; SIRONI, M. In silico study of VP35 inhibitors: from computational alanine scanning to essential dynamics. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 8, p. 2152-2157, 2015. ISSN 1742-206X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5MB00348B>>.

DAS, P. K.; MERITS, A.; LULLA, A. Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. **J Biol Chem**, v. 289, n. 9, p. 5635-53, Feb 28 2014. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24407286>>.

DAVIS, I. W. et al. The Backrub Motion: How Protein Backbone Shrugs When a Sidechain Dances. **Structure**, v. 14, n. 2, p. 265-274, 2006/02/02/ 2006. ISSN 0969-2126. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212606000402>>.

DECROLY, E. et al. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 51-65, Dec 5 2011. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138959>>.

ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. **Epidemiol Infect**, v. 137, n. 4, p. 534-41, Apr 2009. ISSN 0950-2688 (Print) 0950-2688 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18694529>>.

EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **J Clin Virol**, v. 39, n. 4, p. 271-5, Aug 2007. ISSN 1386-6532 (Print) 1386-6532 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627877>>.

ERASMUS, J. H. et al. Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004119-e0004119, 2015. ISSN 1935-2735 1935-2727. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492074>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4619601/>>.

FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virol J**, v. 5, p. 108, Sep 26 2008. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18822126>>.

FLEISHMAN, S. J. et al. RosettaScripts: a scripting language interface to the Rosetta macromolecular modeling suite. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20161-e20161, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731610>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3123292/>>.

FLEISHMAN, S. J. et al. RosettaScripts: a scripting language interface to the Rosetta macromolecular modeling suite. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20161, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21731610>>.

FLEISHMAN, S. J. et al. Computational design of protein targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. **Science**, v. 332, n. 6031, p. 816-21, May 13 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566186>>.

FOX, J. M. et al. Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind and Inhibit Entry and Egress. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1095-1107, Nov 19 2015. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553503>>.

FRAUENFELDER, H.; SLIGAR, S.; WOLYNES, P. The energy landscapes and motions of proteins. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1598-1603, 1991. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/sci/254/5038/1598.full.pdf>>.

FREDDOLINO, P. L. et al. Challenges in protein folding simulations: Timescale, representation, and analysis. **Nature Physics**, v. 6, n. 10, p. 751-758, 2010. ISSN 1745-2473. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297873>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3032381/>>.

FRIC, J. et al. Use of human monoclonal antibodies to treat Chikungunya virus infection. **J Infect Dis**, v. 207, n. 2, p. 319-22, Jan 15 2013. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125446>>.

GAEDIGK-NITSCHKO, K.; SCHLESINGER, M. J. The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 274-281, 1990/03/01/ 1990. ISSN 0042-6822. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004268229090209A>>.

GANESAN, K. et al. Chikungunya Encephalomyelitis: Report of 2 Cases with Neuroimaging and 1 Case with Autopsy Findings. **American Journal of Neuroradiology**, v. 29, n. 9, p. 1636-1637, 2008. Disponível em: <<http://www.ajnr.org/content/ajnr/29/9/1636.full.pdf>>.

GANGNEUX, N. et al. Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 4, p. 516-523, 2009. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1086/600381>>. Acesso em: 2/11/2019.

GARMASHOVA, N. et al. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. **J Virol**, v. 81, n. 5, p. 2472-84, Mar 2007. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108023>>.

GERARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS Med**, v. 5, n. 3, p. e60, Mar 18 2008. ISSN 1549-1676 (Electronic) 1549-1277 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351797>>.

GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL SE, et al. Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability. **Molecular Cell, Elsevier**. V. 63, n. 2, p. 337-346, 2016. Disponível em: <<https://doi:10.1016/j.molcel.2016.06.012>>.

GOULET, D. R.; ATKINS, W. M. (2020). Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 109(1), 74–103. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>>.

GRAY, J. J. High-resolution protein-protein docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 2, p. 183-193, 2006/04/01/ 2006. ISSN 0959-440X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X0600042X>>.

GRAY, J. J. et al. Protein-Protein Docking with Simultaneous Optimization of Rigid-body Displacement and Side-chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 331, n. 1, p. 281-299, 2003/08/01/ 2003. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283603006703>>.

GRAY, J. J. et al. Protein–protein docking predictions for the CAPRI experiment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 1, p. 118-122, 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.10384>>.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectroscopy to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-90. 1. Jan. 2006. Springer Nature. Acesso em: 1/1/2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>>.

HARDING FA, STICKLER MM, RAZO J, DUBRIDGE RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. **MAbs**. 2010;2(3):256–265. Disponível em: <<https://doi.org/10.4161/mabs.2.3.11641>>.

HESS, B. et al. LINC: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997. ISSN 1096-987X. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)>.

HOCKNEY, R. W. The potential calculation and some applications. **Methods Comput. Phys.**, v. 9, p. 136-211, 1970.

HONG, E. M.; PERERA, R.; KUHN, R. J. Alphavirus capsid protein helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. **J Virol**, v. 80, n. 18, p. 8848-55, Sep 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940497>>.

HUANG, S. Y.; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 8, p. 3016-34, Aug 18 2010. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152288>>.

HUCKE, F. I. L.; BESTEHORN-WILLMANN, M.; BUGERT, J. J. Prophylactic strategies to control chikungunya virus infection. **Virus Genes**. V. 57, n. 2, p. 133-150 15. Feb. 2021. Springer Nature. Acesso em: 15/2/2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11262-020-01820-x>>.

HWANG WYK, FOOTE J. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**. 2005;36(1):3–10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2005.01.001>>.

JABLONKA, W.; PHAM, V.; NARDONE, G.; et al. Structure and Ligand-Binding Mechanism of a Cysteinyl Leukotriene-Binding Protein from a Blood-Feeding Disease Vector. **ACS Chemical Biology**. V. 11, n. 7, p. 1934-44. 12. May 2016. American Chemical Society (ACS). Acesso em: 12/5/2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00032>>.

JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clin Chem**, v. 45, n. 9, p. 1628-50, Sep 1999. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471678>>.

JIANG, Y. et al. Refined Dummy Atom Model of Mg²⁺ by Simple Parameter Screening Strategy with Revised Experimental Solvation Free Energy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 12, p. 2575-2586, 2015/12/28 2015. ISSN 1549-9596. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00286>>.

JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 1, p. 182-92, Jul 6 2016. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976887>>.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **J Infect Dis**, v. 214, n. suppl 5, p. S471-S474, Dec 15 2016. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920176>>.

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquids simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **J Am Chem Soc**, v. 110, n. 6, p. 1657-66, Mar 1 1988. ISSN 0002-7863 (Print) 0002-7863 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27557051>>.

JIN, J.; SIMMONS, G. Antiviral Functions of Monoclonal Antibodies against Chikungunya Virus. **Viruses**. V.11, n. 4, 305. 28. Mar. 2019. Multidisciplinary Digital Institute (MDPI). Acesso em: 28/3/2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v11040305>>.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577-2637, 1983. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bip.360221211>>.

KAM, Y. W. et al. Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. **J Virol**, v. 86, n. 23, p. 13005-15, Dec 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015702>>.

KARPE, Y. A.; AHER, P. P.; LOLE, K. S. NTPase and 5'-RNA triphosphatase activities of Chikungunya virus nsP2 protein. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22336, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811589>>.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulation of biomolecules. **Nat Struct Biol**, v. 9, n. 9, p. 646-52, Sep 2002. ISSN 1072-8368 (Print) 1072-8368 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198485>>.

KASHYAP, R. S. et al. Diagnosis of Chikungunya fever in an Indian population by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay protocol based on an antigen detection assay: a prospective cohort study. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 291-7, Feb 2010. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007365>>.

KAUFMANN, K. W. et al. Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. **Biochemistry**, v. 49, n. 14, p. 2987-98, Apr 13 2010. ISSN 1520-4995 (Electronic) 0006-2960 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20235548>>.

KEEFE, A. D.; PAI, S.; ELLINGTON, A. Aptamers as therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 537, 07/01/online 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd3141>>.

KELLOGG, E.H., A. Leaver-Fay, and D. Baker, *Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability*. **Proteins**, 2011. **79**(3): p. 830-8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/prot.22921>>.

KENNEDY PJ, OLIVEIRA C, GRANJA PL, SARMENTO B. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. **Crit Rev Biotechnol**. 2018;38(3):394-408. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1357002>>.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 12, p. 3075-84, Dec 2002. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466484>>.

KHAN, M. et al. Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 7, p. 1169-1175, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.23752>>.

KILAMBI, K. P. et al. Extending RosettaDock with water, sugar, and pH for prediction of complex structures and affinities for CAPRI rounds 20-27. **Proteins**, v. 81, n. 12, p. 2201-2209, 2013. ISSN 1097-0134 0887-3585. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24123494>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4037910/>>.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 935-49, Nov 2004. ISSN 1474-1776 (Print) 1474-1776 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520816>>.

KOGA, N. et al. Principles for designing ideal protein structures. **Nature**, v. 491, n. 7423, p. 222-7, Nov 8 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135467>>.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495-497 (1975). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/256495a0>>.

KORTEMME, T., KIM, D. E., BAKER, D. Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, 2004 (219), pl2. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/stke.2192004pl2>>.

KORTEMME, T., D. BAKER. A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V. 99, n. 22, p. 14116-21. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.202485799>>.

KOSE, N.; FOX, J. M.; SAPPARAPU, G.; et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potentially neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. **Science Immunology**. V.4, n. 35, eaaw664717. May 2019. American Association for the Advancement of Science. Acesso em: 17/5/2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw6647>>.

KOSTOLANSKÝ F, VAREČKOVÁ E, BETÁKOVÁ T, MUCHA V, RUSS G, WHARTON SA. The strong positive correlation between effective affinity and infectivity neutralization of highly cross-reactive monoclonal antibody IIB4, which recognizes antigenic site B on influenza A virus haemagglutinin. **J Gen Virol**. 2000;81(7):1727–1735. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1727>>.

KRITZER, J. A. et al. Miniature protein inhibitors of the p53-hDM2 interaction. **Chembiochem**, v. 7, n. 1, p. 29-31, Jan 2006. ISSN 1439-4227 (Print) 1439-4227 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397877>>.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 325-329, 2012/06/01/ 2012. ISSN 0953-6205. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953620512000337>>.

KUHLMAN, B. et al. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1364-8, Nov 21 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631033>>.

KUHN C, WEINER HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. **Immunotherapy**. 2016;8(8):889–906. doi: 10.2217/imt-2016-0049. Disponível em: <<https://doi.org/10.2217/imt-2016-0049>>.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 8, p. 1945-8, Aug 2008. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632966>>.

KUO, S. C. et al. Cell-based analysis of Chikungunya virus E1 protein in membrane fusion. **J Biomed Sci**, v. 19, p. 44, Apr 21 2012. ISSN 1423-0127 (Electronic) 1021-7770 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22520648>>.

KWAKKENBOS, M., DIEHL, S., YASUDA, E. et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. **Nat Med** 16, 123–128 (2010). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm.2071>>.

LAHARIYA, C.; PRADHAN, S. K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. **J Vector Borne Dis**, v. 43, n. 4, p. 151-60, Dec 2006. ISSN 0972-9062 (Print) 0972-9062 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17175699>>.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al. Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: seroprevalence, seroincidence and maternal-fetal transmission, southern Thailand, 2009-2010. **Epidemiol Infect**, v. 144, n. 2, p. 381-8, Jan 2016. ISSN 1469-4409 (Electronic)

0950-2688 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113247>>.

LEAVER-FAY, A. et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. **Methods Enzymol**, v. 487, p. 545-74, 2011. ISSN 1557-7988 (Electronic)

0076-6879 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187238>>.

LEES, J. G.; SMITH, B. R.; WIEN, F.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. CDtool: an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. **Analytical Biochemistry**. V. 332, n. 2, p. 285-9. 15. Sep. 2004. Elsevier. Acesso em: 15/9/2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.002>>.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, Feb 8 2014. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506907>>.

LI, L. et al. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 705-8, Dec 2 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124457>>.

LIMA, W. G.; PEREIRA, R. S.; NIZER, W. S. DA C.; et al. Rate of exposure to Mayaravirus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**. V. 166, p. 347-361 7. Jan. 2021. Springer Nature. Acesso em: 7/1/2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04889-9>>

>.

LINGER, B. R. et al. Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. **RNA**, v. 10, n. 1, p. 128-38, Jan 2004. ISSN 1355-8382 (Print)

1355-8382 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681591>>.

LI W, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics**. 2006;22(13):1658-1659. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>>.

LIU, H.; YAO, X. Molecular Basis of the Interaction for an Essential Subunit PA-PB1 in Influenza Virus RNA Polymerase: Insights from Molecular Dynamics Simulation and Free Energy Calculation. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 1, p. 75-85, 2010/02/01 2010. ISSN 1543-8384. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/mp900131p>>.

LIU L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. **Protein Cell**. 2018;9(1):15-32. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0408-4>>.

LOCONSOLE, D. et al. Seroprevalence of Dengue Virus, West Nile Virus, Chikungunya Virus, and Zika Virus in International Travelers Attending a Travel and Migration Center in 2015-2017, Southern Italy. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 18, n. 6, p. 331-334, Jun 2018. ISSN 1557-7759 (Electronic) 1530-3667 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29683399>>.

LOEWY, A. et al. The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. **J Virol**, v. 69, n. 1, p. 469-75, Jan 1995. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983743>>.

LOHNING, A. E. et al. A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. **Curr Top Med Chem**, v. 17, n. 18, p. 2023-2040, 2017. ISSN 1873-4294 (Electronic) 1568-0266 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28137238>>.

LONBERG N. Human antibodies from transgenic animals. **Nat Biotechnol**. 2005;23(9):1117-1125. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nbt1135>>.

LOUNIBOS, L. P.; KRAMER, L. D. Invasiveness of Aedes aegypti and Aedes albopictus and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. **J Infect Dis**, v. 214, n. suppl 5, p. S453-S458, Dec 15 2016. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920173>>.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, p. e0005698, Jun 2017. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662031>>.

LU, S. M.; HODGES, R. S. A de Novo Designed Template for Generating Conformation-specific Antibodies That Recognize α -Helices in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 26, p. 23515-23524, June 28, 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/277/26/23515.abstract>>.

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 33-57, Jan 1955. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373835>>.

LUSA, S.; GAROFF, H.; LILJESTROM, P. Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 843-6, Dec 1991. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1962454>>.

MAGALHAES, T.; BRAGA, C.; CORDEIRO, M. T.; et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V. 11, n. 11, p. e0006055. 1. Nov. 2017. Public Library of Science. Acesso em: 1/11/2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055>>.

MACKERELL, A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **J Phys Chem B**, v. 102, n. 18, p. 3586-616, Apr 30 1998. ISSN 1520-6106 (Print)

1520-5207 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24889800>>.

MAHENDRADAS, P.; AVADHANI, K.; SHETTY, R. Chikungunya and the eye: a review. **J Ophthalmic Inflamm Infect**, v. 3, n. 1, p. 35, Feb 11 2013. ISSN 1869-5760 (Print) 1869-5760 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514031>>.

MARGOLIS, D. M.; KOUP, R. A.; FERRARI, G. HIV antibodies for treatment of HIV infection. **Immunol Rev**, v. 275, n. 1, p. 313-323, Jan 2017. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28133794>>.

MARZE, N. A. et al. Modeling of long proteins and water-mediated interfaces with RosettaDock in CAPRI rounds 28-35. **Proteins**, v. 85, n. 3, p. 479-486, 2017. ISSN 1097-0134 0887-3585. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667482>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5710743/>>.

MATHEW, A. J. et al. Chikungunya Infection: a Global Public Health Menace. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 17, n. 2, p. 13, Feb 2017. ISSN 1534-6315 (Electronic) 1529-7322 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233156>>.

MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, n. 5612, p. 585-590, 1977/06/01 1977. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/267585a0>>.

MCINTOSH, B. M.; JUPP, P. G. Attempt to transmit Chikungunya virus with six species of mosquito. **J Med Entomol**, v. 7, n. 5, p. 615-8, Nov 1970. ISSN 0022-2585 (Print) 0022-2585 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5501226>>.

MCPHERSON, R. L. et al. ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 7, p. 1666-1671, Feb 14 2017. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28143925>>.

MEILER, J.; BAKER, D. ROSETTA LIGAND: protein-small molecule docking with full side-chain flexibility. **Proteins**, v. 65, n. 3, p. 538-48, Nov 15 2006. ISSN 1097-0134 (Electronic) 0887-3585 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16972285>>.

MELANCON, P.; GAROFF, H. Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. **J Virol**, v. 61, n. 5, p. 1301-9, May 1987. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553612>>.

MÉNDEZ, R. et al. Assessment of blind prediction of protein-protein interactions: Current status of docking methods. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, n. 1, p. 51-67, 2003. ISSN 0887-3585. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.10393>>.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S16-S30, 2011/07/01/ 2011. ISSN 0022-2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201111000759>>.

MORO, M. L. et al. Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. **J Infect**, v. 65, n. 2, p. 165-72, Aug 2012. ISSN 1532-2742 (Electronic) 0163-4453 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522292>>.

MORRISON, M. A. et al. Targeting the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes through expression of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein stimulates cellular motility. **Journal of virology**, v. 85, n. 20, p. 10487-10498, 2011. ISSN 1098-5514 0022-538X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835799>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3187478/>>.

MOURYA, D. T.; YADAV, P. Vector biology of dengue & chikungunya viruses. **Indian J Med Res**, v. 124, n. 5, p. 475-80, Nov 2006. ISSN 0971-5916 (Print) 0971-5916 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17213513>>.

NASCIMENTO, E. J. M.; BONAPARTE, M. I.; LUO, P.; et al. Use of a Blockade-of-Binding ELISA and Microneutralization Assay to Evaluate Zika Virus Serostatus in Dengue-Endemic Areas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 101, n.3, p. 708-715. 1. Sep. 2019. American Society Of Tropical Medicine And Hygiene. Acesso em: 1/9/2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0270>>.

NAVARATNARAJAH, C. K.; OEZGUEN, N.; RUPP, L.; et al. The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. **Nature Structural & Molecular Biology**. V. 18, p. 128-134. 1038/nsmb.1967. 9. Jan. 2011. Springer Nature. Acesso em: 9/1/2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nsmb.1967>>.

NIMJEE, S. M.; RUSCONI, C. P.; SULLENGER, B. A. Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. **Annual Review of Medicine**, v. 56, n. 1, p. 555-583, 2005. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.56.062904.144915>>.

NOUGAIREDE, A. et al. Random codon re-encoding induces stable reduction of replicative fitness of Chikungunya virus in primate and mosquito cells. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 2, p. e1003172, Feb 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23436995>>.

NOZARI, A.; BEREZOVSKI, M. V. Aptamers for CD Antigens: From Cell Profiling to Activity Modulation. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 6, p. 29-44, 2017. ISSN 2162-2531. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325295>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5363458/>>.

OGUCHI, Y.; TAKEDA, K.; WATANABE, S.; et al. Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. **Journal of Biological Chemistry**. V. 283, n. 37, p. 25414-20. 9. Jul. 2008. Elsevier. Acesso em: 9/7/2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M804736200>>.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **J Comput Chem**, v. 25, n. 13, p. 1656-76, Oct 2004. ISSN 0192-8651 (Print)

0192-8651 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15264259>>.

OWEN, K. E.; KUHN, R. J. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 2757-2763, 1996. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/jvi/70/5/2757.full.pdf>>.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91-102, 2017. ISSN 1867-2450 1867-2469. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28510083>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5425816/>>.

PAL, P. et al. Development of a highly protective combination monoclonal antibody therapy against Chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003312, 2013. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637602>>.

PANNING, M. et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 416-22, Mar 2008. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325256>>.

PARASHAR, D. et al. Administration of E2 and NS1 siRNAs inhibits chikungunya virus replication in vitro and protects mice infected with the virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2405, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040429>>.

PARK, H. S. et al. Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 535-8, Jan 27 2006. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439663>>.

PASTORINO, B. et al. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. **J Virol Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 65-71, Mar 2005. ISSN 0166-0934 (Print) 0166-0934 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664052>>.

PAUL, B. J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatol Ther**, v. 5, n. 2, p. 317-326, Dec 2018. ISSN 2198-6576 (Print) 2198-6576 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30047016>>.

PFEFFER, M. et al. Specific Detection of Chikungunya Virus Using a RT-PCR/Nested PCR Combination. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 1, p. 49-54, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0450.2002.00535.x>>.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-77, Sep 2007. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698645>>.

RAMAKRISHNAN, C. et al. Structure-function relationship of Chikungunya nsP2 protease: A comparative study with papain. **Chem Biol Drug Des**, v. 89, n. 5, p. 772-782, May 2017. ISSN 1747-0285 (Electronic) 1747-0277 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054451>>.

RAMAN, S. et al. Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. **Proteins**, v. 77 Suppl 9, n. 09, p. 89-99, 2009. ISSN 1097-0134 0887-3585. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701941>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3688471/>>.

RAMFUL, D. et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 9, p. 811-5, Sep 2007. ISSN 0891-3668 (Print) 0891-3668 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721376>>.

RAMSEY, J.; MUKHOPADHYAY, S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 8, Aug 18 2017. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28820485>>.

RASTELLI, G. et al. Fast and accurate prediction of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 797-810, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21372>>.

RATHORE, A. P. et al. Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. **Antiviral Res**, v. 103, p. 7-16, Mar 2014. ISSN 1872-9096 (Electronic) 0166-3542 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388965>>.

RAVINDRAN, V.; ALIAS, G. Efficacy of combination DMARD therapy vs. hydroxychloroquine monotherapy in chronic persistent chikungunya arthritis: a 24-week randomized controlled open label study. **Clin Rheumatol**, v. 36, n. 6, p. 1335-1340, Jun 2017. ISSN 1434-9949 (Electronic) 0770-3198 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27699657>>.

REZZA, G.; WEAVER, S. C. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 1, p. e0006919, Jan 2019. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30653504>>.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373834>>.

ROHL, C. A. et al. Modeling structurally variable regions in homologous proteins with Rosetta. **Proteins**, v. 55, n. 3, p. 656-77, May 15 2004. ISSN 1097-0134 (Electronic) 0887-3585 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15103629>>.

ROHL, C. A. et al. Protein Structure Prediction Using Rosetta. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.383, 2004. p.66-93. ISBN 0076-6879.

RUDNICK SI, ADAMS GP. Affinity and Avidity in Antibody-Based Tumor Targeting. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009;24(2):155–161. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0627>>.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol*, v. 96, n. 9, p. 2483-500, Sep 2015. ISSN 1465-2099 (Electronic) 0022-1317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26219641>>.

SAHOO, B., CHOWDARY, T. K. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2-E1 dissociation during viral entry. *Bioscience reports.* v. 39, n. 6, BSR20191077. 28 Jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/BSR20191077>>.

SALMASO, V. et al. Combining self- and cross-docking as benchmark tools: the performance of DockBench in the D3R Grand Challenge 2. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 32, n. 1, p. 251-264, January 01 2018. ISSN 1573-4951. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10822-017-0051-4>>.

SALSBURY, F. R., JR. Molecular dynamics simulation of protein dynamics and their relevance to drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*, v. 10, n. 6, p. 738-44, Dec 2010. ISSN 1471-4973 (Electronic) 1471-4892 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971684>>.

SAMMOND, D. W. et al. Computational design of the sequence and structure of a protein-binding peptide. *J Am Chem Soc*, v. 133, n. 12, p. 4190-2, Mar 30 2011. ISSN 1520-5126 (Electronic) 0002-7863 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388199>>.

SANTINI, S.; DERREUMAUX, P. Helix H1 of the prion protein is rather stable against environmental perturbations: molecular dynamics of mutation and deletion variants of PrP(90–231). *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 61, n. 7, p. 951-960, April 01 2004. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3455-3>>.

SANZ, M. A. et al. Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J Biol Chem*, v. 278, n. 3, p. 2051-7, Jan 17 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424249>>.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23556021>>.

SCHMID, N. et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, v. 40, n. 7, p. 843, April 30 2011. ISSN 1432-1017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>>.

SCHUELER-FURMAN, O. et al. Progress in modeling of protein structures and interactions. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 638-42, Oct 28 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254179>>.

SCHULER, L. D.; DAURA, X.; VAN GUNSTEREN, W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1205-1218, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.1078>>.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 491-500, Jul 2010. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20551973>>.

SCOTT, A. M.; WOLCHOK, J. D.; OLD, L. J. Antibody therapy of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 278-87, Mar 22 2012. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437872>>.

SHARMA, R. et al. Inhibition of chikungunya virus by picolinic acid targets viral capsid protein. **Virology**, v. 498, p. 265-276, Nov 2016. ISSN 1096-0341 (Electronic) 0042-6822 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27614702>>.

SIEGEL, J. B. et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. **Science**, v. 329, n. 5989, p. 309-13, Jul 16 2010. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647463>>.

SILVA, D.-A.; CORREIA, B. E.; PROCKO, E. Motif-Driven Design of Protein-Protein Interfaces. In: STODDARD, B. L. (Ed.). **Computational Design of Ligand Binding Proteins**. New York, NY: Springer New York, 2016. p.285-304. ISBN 978-1-4939-3569-7.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J Clin Invest**, v. 127, n. 3, p. 737-749, Mar 1 2017. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28248203>>.

SIMON, F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Med Mal Infect**, v. 45, n. 7, p. 243-63, Jul 2015. ISSN 1769-6690 (Electronic) 0399-077X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119684>>.

SINGH, I.; HELENIUS, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. **J Virol**, v. 66, n. 12, p. 7049-58, Dec 1992. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1433506>>.

SINGH, A.; KUMAR, A.; UVERSKY, V. N.; GIRI, R. Understanding the interactability of chikungunya virus proteins via molecular recognition feature analysis. **RSC Advances**. V. 8, p. 27239-27303. 1. Jan. 2018. The Royal Society. Acesso em: 1/1/2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8RA04760J>>.

SIRCAR, A. et al. A generalized approach to sampling backbone conformations with RosettaDock for CAPRI rounds 13–19. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 15, p. 3115-3123, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.22765>>.

SIRCAR, A.; GRAY, J. J. SnugDock: paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 1, p. e1000644-e1000644, 2010. ISSN 1553-7358 1553-734X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098500>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2800046/>>.

SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 3, n. 3, p. e389-e389, 2009. ISSN 1935-2735 1935-2727. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19274071>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2647734/>>.

SIVASUBRAMANIAN, A. et al. Structural model of the mAb 806-EGFR complex using computational docking followed by computational and experimental mutagenesis. **Structure**, v. 14, n. 3, p. 401-14, Mar 2006. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16531225>>.

SIVASUBRAMANIAN, A.; MAYNARD, J. A.; GRAY, J. J. Modeling the structure of mAb 14B7 bound to the anthrax protective antigen. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. 218-230, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prot.21595>>.

SMITH, C. A.; KORTEEMME, T. Backrub-Like Backbone Simulation Recapitulates Natural Protein Conformational Variability and Improves Mutant Side-Chain Prediction. **Journal of Molecular Biology**, v. 380, n. 4, p. 742-756, 2008/07/18/ 2008. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283608005779>>.

SNYDER, A. J.; MUKHOPADHYAY, S. The alphavirus E3 glycoprotein functions in a clade-specific manner. **J Virol**, v. 86, n. 24, p. 13609-20, Dec 2012. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23035234>>.

SNYDER, J. E. et al. Functional characterization of the alphavirus TF protein. **J Virol**, v. 87, n. 15, p. 8511-23, Aug 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720714>>.

SOKOŁOSKI, K. J. et al. Identification of interactions between Sindbis virus capsid protein and cytoplasmic vRNA as novel virulence determinants. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006473-e1006473, 2017. ISSN 1553-7374 1553-7366. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662211>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5507600/>>.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-97, Oct 25 2009. ISSN 1096-0341 (Electronic)

0042-6822 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732931>>.

SONG, K.-M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 612-631, 2012. ISSN 1424-8220. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368488>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3279232/>>.

SORENSEN, J. M., & HEAD-GORDON, T. (2000). Matching simulation and experiment: a new simplified model for simulating protein folding. **Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology**, 7(3-4), 469-481. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/106652700750050899>>.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of a re-emerging chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, p. e89, Jun 2007. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604450>>.

SPIESS, C.; ZHAI, Q.; CARTER, P. J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. **Molecular Immunology**. V.67, p. 95-106. 27. Jan. 2015. Elsevier. Acesso em: 27/1/2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>>.

STETEFELD, J.; JENNY, M.; SCHULTHESS, T.; et al. The laminin-binding domain of agrin is structurally related to N-TIMP-1. **Nature Structural & Molecular Biology**. V. 8, n. 8, p. 705-9. 1. Aug. 2001. Springer Nature. Acesso em: 1/8/2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/90422>>.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994. ISSN 0146-0749 (Print) 0146-0749 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968923>>.

SUBUDHI, B. B. et al. Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. **Viruses**, v. 10, n. 5, May 3 2018. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29751486>>.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 345-345, 2018. ISSN 2235-2988. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30364124>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC6191487/>>.

TAYLOR, A. et al. Effects of an In-Frame Deletion of the 6k Gene Locus from the Genome of Ross River Virus. **J Virol**, v. 90, n. 8, p. 4150-4159, Apr 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865723>>.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res**, v. 99, n. 3, p. 345-70, Sep 2013. ISSN 1872-9096 (Electronic) 0166-3542 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23811281>>.

THOMAS, S. et al. Functional dissection of the alphavirus capsid protease: sequence requirements for activity. **Virol J**, v. 7, p. 327, Nov 18 2010. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087473>>.

TINBERG, C. E. et al. Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity. **Nature**, v. 501, n. 7466, p. 212-216, Sep 12 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24005320>>.

TIRONI, I. G. et al. A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 13, p. 5451-5459, 1995. Disponível em: <<https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.469273>>.

TLATLI, R. et al. Grafting of functional motifs onto protein scaffolds identified by PDB screening – an efficient route to design optimizable protein binders. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 1, p. 139-159, 2013. Disponível em: <<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.12056>>.

TORRES, J. R. et al. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. **Int J Infect Dis**, v. 51, p. 85-88, Oct 2016. ISSN 1878-3511 (Electronic) 1201-9712 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27619845>>.

TOSATO G, COHEN JI. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. **Curr Protoc Immunol**. 2007;7.22.1–7.22.4. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471142735.im0722s76>>.

TRIPET, B. et al. Template-based coiled-coil antigenic neutralizing antibodies to the SARS-coronavirus. **J Struct Biol**, v. 155, n. 2, p. 176-94, Aug 2006. ISSN 1047-8477 (Print) 1047-8477 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697221>>.

TRIPATHI, P., SHINE, E. E., et al. ClbSIs a Cyclopropane Hydrolase That Confers Colibactin Resistance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 49, p. 17719–17722, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jacs.7b09971>>.

UCHIME, O.; FIELDS, W.; KIELIAN, M. The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. **J Virol**, v. 87, n. 18, p. 10255-62, Sep 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864626>>.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. Chikungunya virus fusion properties elucidated by single-particle and bulk approaches. **J Gen Virol**, v. 96, n. 8, p. 2122-2132, Aug 2015. ISSN 1465-2099 (Electronic) 0022-1317 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872739>>.

VARASTEHE, A.; SANKIAN, M. Aptamers: new arrows to target dendritic cells AU - Ganji, A. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2016/01/02 2016. ISSN 1061-186X. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1041962>>.

VASILJEVA, L. et al. Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. **J Biol Chem**, v. 276, n. 33, p. 30786-93, Aug 17 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410598>>.

VAZEILLE, M. et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1168, Nov 14 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000540>>.

VIANA, I. F. T. et al. De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. **RSC Advances**, v. 3, n. 29, p. 11790-11800, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA41562G>>.

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709-12, Dec 2 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124458>>.

VYAS, S. et al. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. **Nature communications**, v. 5, p. 4426-4426, 2014. ISSN 2041-1723. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043379>
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4123609/>>.

WANG, C.; BRADLEY, P.; BAKER, D. Protein-Protein Docking with Backbone Flexibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, n. 2, p. 503-519, 2007/10/19/ 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283607010030>>.

WANG, C.; SCHUELER-FURMAN, O.; BAKER, D. Improved side-chain modeling for protein-protein docking. **Protein Sci**, v. 14, n. 5, p. 1328-39, May 2005. ISSN 0961-8368 (Print) 0961-8368 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802647>>.

WANG, J. et al. Exploring Transition Pathway and Free-Energy Profile of Large-Scale Protein Conformational Change by Combining Normal Mode Analysis and Umbrella Sampling Molecular Dynamics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 1, p. 134-143, 2014/01/09 2014. ISSN 1520-6106. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp4105129>>.

WANG, M. et al. Local and global anatomy of antibody-protein antigen recognition. **J Mol Recognit**, v. 31, n. 5, p. e2693, May 2018. ISSN 1099-1352 (Electronic) 0952-3499 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218757>>.

WARSAWSKI, S.; KATZ, A. B.; LIPSH, R.; et al. Optimizing antibody affinity and stability by the automated design of the variable light-heavy chain interfaces. **PLoS Computational Biology**, 1. Aug. 2019. Public Library of Science. Acesso em: 1/8/2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007207>>.

XU, C. W.; LUO, Z. Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers. **Oncogene**, v. 21, p. 5753, 08/13/online 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205680>>.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **J Infect Dis**, v. 214, n. suppl 5, p. S441-S445, Dec 15 2016. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920170>>.

YERGOLKAR, P. N. et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 10, p. 1580-3, Oct 2006. ISSN 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17176577>>.

YU, Y. J.; WATTS, R. J. Developing Therapeutic Antibodies for Neurodegenerative Disease. **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 3, p. 459-472, July 01 2013. ISSN 1878-7479. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13311-013-0187-4>>.

ZHAO, J.; NUSSINOV, R.; MA, B. Mechanisms of recognition of amyloid- β (A β) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 44, p. 18325-18343, 2017. ISSN 1083-351X 0021-9258. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28924036>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5672054/>>.

ZHOU Y, GOENAGA A-L, HARMS BD, et al. Impact of Intrinsic Affinity on Functional Binding and Biological Activity of EGFR Antibodies. **Mol Cancer Ther**. 2012;11(7):1467-1476. Disponível em: < [https://doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-1038](https://doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-1038)>.

APÊNDICE A- FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela 1A – Estruturas resultantes das etapas de desenho de interface

Descrição	$\Delta\Delta G$	Cut-off de RMSD	Resíduos (Transplantados)
1ezk_0001_0001.pdb	-1.92942	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
CETTZD-2	-3.63462	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
2bdd_0001_0001.pdb	-3.97456	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
2c6u_0001_0001.pdb	-0.036264	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
2o0p_0001_0001.pdb	-2.00787	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
2o0q_0001_0001.pdb	-2.19799	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3a7l_0001_0001.pdb	-1.61847	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3ce7_0001_0001.pdb	-1.0802	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3d79_0001_0001.pdb	-0.256852	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3hgb_0001_0001.pdb	-1.98748	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3k10_0001_0001.pdb	-5.95506	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser

3o5g_0001_0001.pdb	-2.14085	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
3o5j_0001_0001.pdb	-1.56111	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
4bxp_0001_0001.pdb	-7.46931	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
4bxq_0001_0001.pdb	-7.79472	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
4g08_0001_0001.pdb	-0.626428	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
4poy_0001_0001.pdb	-2.19159	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
5umr_0001_0001.pdb	-2.20779	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
6anr_0001_0001.pdb	-1.04349	1.5Å	Asp, Thr, Asn, Asn, Ser
1f32_0001_0001.pdb	2.05849	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
CETTZD-2	-1.17971	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1jon_0001_0001.pdb	2.01263	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1pxu_0001_0001.pdb	0.352425	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1tp0_0001_0001.pdb	3.39797	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1twe_0001_0001.pdb	1.92675	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1twm_0001_0001.pdb	1.98152	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
1wou_0001_0001.pdb	0.849562	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr

2hzt_0001_0001.pdb	-3.13236	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
2i1b_0001_0001.pdb	0.737168	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
CETTZD-3	-1.76895	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
3iv4_0001_0001.pdb	-0.820996	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
3kb5_0001_0001.pdb	-0.529192	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
3myi_0001_0001.pdb	0.0682102	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
3tsv_0001_0001.pdb	-0.453941	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
4ghq_0001_0001.pdb	3.15086	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
4n6l_0001_0001.pdb	1.74735	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
4tr3_0001_0001.pdb	-0.049078	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
CETTZD-4	-1.83194	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
CETTZD-5	-1.37944	0.9Å	Asp, Asn, Asn, Thr
2hzt_0001_0001.pdb	-3.13236	0.8Å	Asp, Asn, Asn, Thr
4tr3_0001_0001.pdb	-0.136167	0.8Å	Asp, Asn, Asn, Thr
4tr4_0001_0001.pdb	-0.393577	0.8Å	Asp, Asn, Asn, Thr
5btz_0001_0001.pdb	0.73369	0.8Å	Asp, Asn, Asn, Thr
5m1f_0001_0001.pdb	2.6277	0.8Å	Asp, Asn, Asn, Thr

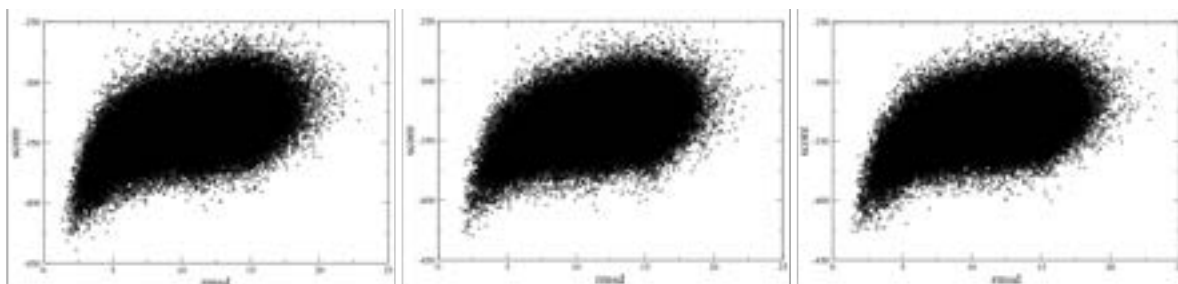
Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: Os desenhos de interface foram iniciados com o ponto de corte para o RMSD recomendado pelo os autores de protocolo deste de metodologia com detalhes colocado acima no texto, no entanto à medida que a etapas de desenho não gerava arquivos de saída, o RMSD permitido foi sendo modificado. Essa adaptação do protocolo de Silva e colaboradores, não trouxe prejuízo para o projeto, já que as estruturas passaram por etapas de otimização posteriores que acomodaram os resíduos transplantados e potencializaram as ligações. Desta

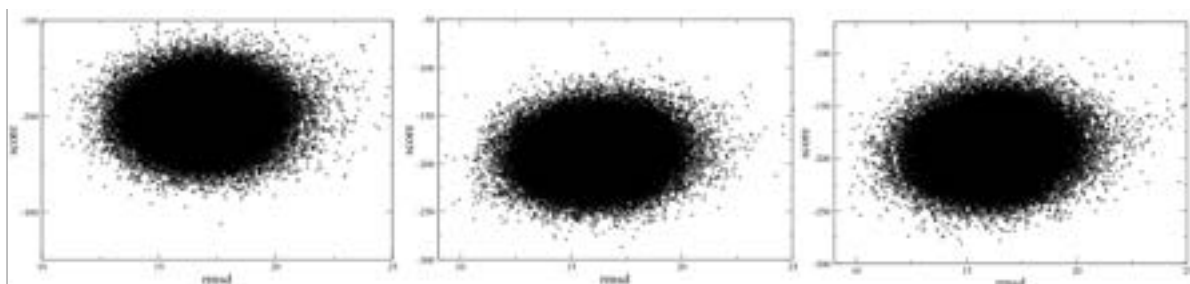
maneira todas as estruturas em vermelho foram selecionadas para as etapas seguintes aplicadas neste trabalho. As proteínas destacadas em verde apresentavam estruturas complexas o que poderia dificultar o enovelamento quando produzidas em sistema procarioto. Além disso, alguns desses desenhos tinham energia de ligação positiva que era critério de exclusão.

Figura 1A - Predição de enovelamento dos aptâmeros produzidos

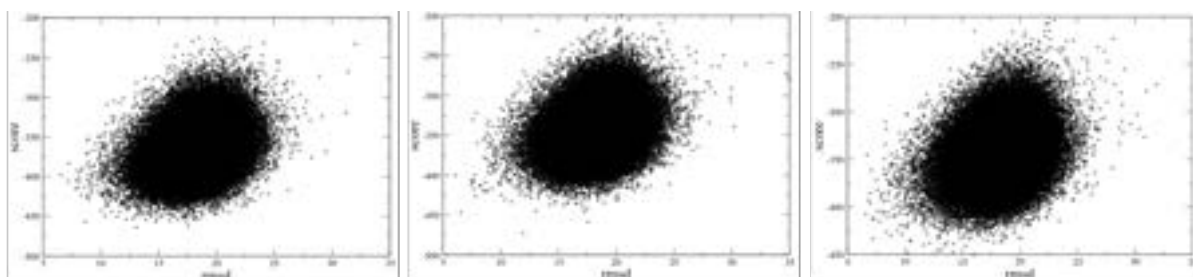
CETZDT-2



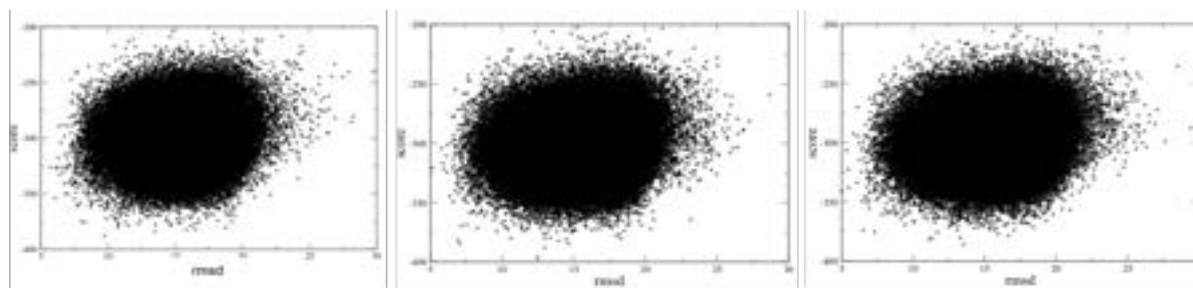
CETZDT-1

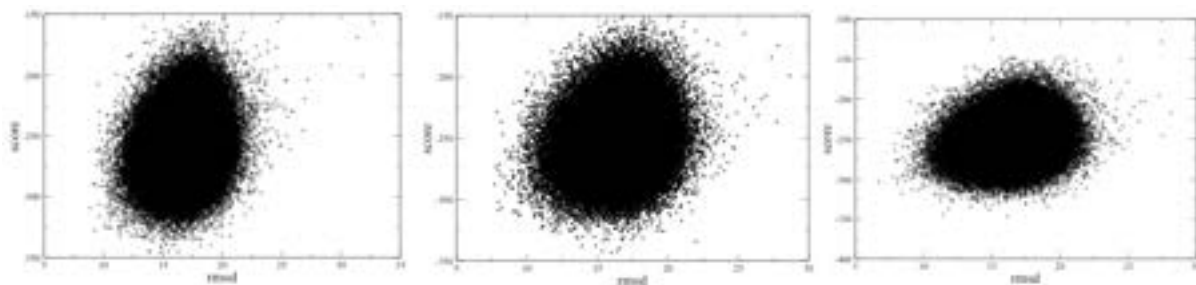


CETZDT-3



CETZDT-4



CETZDT-5

Fonte: Elaborado pelo o autor

Legenda: A- formação do funil de enovelamento para estrutura da proteína nativa (1TZV), para aptâmero (CETTZD-2) e aptâmero com mutações revertidas. As demais estruturas não formaram funil de enovelamento nem mesmo para a estrutura da proteína nativa (1JB3, 2ZPD, 4YME e 5H9k). Fonte: O autor.

Tabela 2 A- Métricas de interface para os aptâmeros resultantes do carreador 5UMR

PARAMÊTROS	CETZDT-6 (1)	CETZDT-6 (2)	CETZDT-6 (3)	CETZDT-6 (4)
Sc	0.463366	0.481598	0.621477	0.447372
dG_cross	-21.6333	-9.63563	-22.0603	-21.4212
dG_cross/dSASAx 100	-2.52604	-1.13807	-2.5866	-2.49225
dSASA_hphobic	425.8	465.419	508.894	423.24
dSASA_polar	430.613	381.242	343.976	436.272
dSASA_interface	856.413	846.661	852.87	859.513
hbonds_interface	7	2	2	7
I_sc	-16.687	-11.474	-17.378	-16.996
$\Delta\Delta G$	-16.589	-17.470	-13.245	-16.546

Fonte: Elaborado pelo o autor

Tabela 3 A- Métricas de interface para os aptâmeros resultantes do carreador 6ANR

PARAMÊTROS	CETZDT-7 (1)	CETZDT-7 (2)	CETZDT-7 (3)	CETZDT-7 (4)
Sc	0.610963	0.5585	0.475552	0.559928
dG_cross	-21.1237	-18.7217	-19.345	-15.1612
dG_cross/dSASAx 100	-2.3675	-2.96356	-2.13713	-1.97283
dSASA_hphobic	403.884	184.846	311.591	375.728
dSASA_polar	488.356	446.884	593.593	392.773
dSASA_interface	892.24	631.729	905.184	768.501
hbonds_interface	7	7	8	4
I_sc	-19.921	-17.103	-17.125	-13.030
$\Delta\Delta G$	-11.305	-14.047	-11.180	-14.527

Fonte: Elaborado pelo o autor

APÊNDICE B - INPUT PARA O ROSETTA

- Desenho dos aptâmeros

```

<ROSETTASCRIPTS>
<TASKOPERATIONS>
  <ProteinInterfaceDesignname=pido repack_chain1=1 repack_chain2=1
design_chain1=0 design_chain2=1 interface_distance_cutoff=8.0/>
  <OperateOnCertainResiduesname="hotspot_repack">
    <RestrictToRepackingRLT/>
    <ResiduePDBInfoHasLabelproperty="HOTSPOT"/>
  </OperateOnCertainResidues>
</TASKOPERATIONS>
<SCOREFXNS>
</SCOREFXNS>
<FILTERS>
  <Ddname=ddgconfidence=0/>
  <BuriedUnsatHbondsname=unsatconfidence=0/>
  <ShapeComplementarityname=Scconfidence=0/>
</FILTERS>
<MOVERS>
  <MotifGraftname="motif_grafting" context_structure="E2B.pdb"
motif_structure="residantibody.pdb" RMSD_tolerance="0.5"
NC_points_RMSD_tolerance="0.5" clash_score_cutoff="5" clash_test_residue="GLY"
hotspots="1,1,1,1" combinatorial_fragment_size_delta="0:0,0:0,0:0,0:0"
full_motif_bb_alignment="0" graft_only_hotspots_by_replacement="1"
revert_graft_to_native_sequence="1"/>
  <build_Ala_posename=ala_pose partner1=0 partner2=1 interface_cutoff_distance=8.0
task_operations=hotspot_repack/>
  <Prepackname=ppkjump_number=0/>
  <PackRotamersMovername=design task_operations=hotspot_repack,pido/>
  <MinMovername=rb_minbb=0 chi=1 jump=1/>
</MOVERS>
<PROTOCOLS>
  <Addmover_name=motif_grafting/>
  <Addmover_name=ala_pose/>
  <Addmover_name=ppk/>
  <Addmover_name=design/>
  <Addmover_name=rb_min/>
  <Addmover_name=design/>
  <Addfilter_name=unsat/>
  <Addfilter_name=ddg/>
  <Addfilter_name=Sc/>
</PROTOCOLS>
</ROSETTASCRIPTS>

```

- **Script para análise de interface**
- **Script para mutagênese computacional**

```

<ROSETTASCRIPTS>
<SCOREFXNS>
  <ScoreFunctionname="Score" weights="Ref2015"/>
</SCOREFXNS>
<TASKOPERATIONS>
  <ReadResfilename="Mutate" filename="listfile" />
  <ExtraRotamersGenericname="ExtraRotamers" ex1=1 ex1aro=1 ex2=1 ex2aro=1 />
</TASKOPERATIONS>
<MOVERS>
  <MinMovername="minmover" scorefxn="Score" chi="1" bb="1" jump="ALL"
cartesian=0 type=lbfgs_armijotolerance="0.001" max_iter="1000"/>
  <ddGname="ddgmover" scorefxn="Score" chain_num="2"
task_operations="Mutate,ExtraRotamers"/>
  <InterfaceAnalyzerMovername="interface" jump="1" scorefxn="score" interface_sc="1"
/>
</MOVERS>

<FILTERS>
  <DdGScanname="alasca" task_operations="Mutate,ExtraRotamers"
repeats="10" scorefxn="Score" report_diffs=1 write2pdb="1" ddG_mover="ddgmover"
confidence=0/>
  <BuriedUnsatHbondsname="Unsat" confidence=0/>
</FILTERS>

  <MOVERS>
  <ReportToDBname="features" batch_description=exampledatabase_name="scores.db3">
    <ScoreTypeFeatures/>
    <StructureScoresFeaturescorefxn="Score"/>
  </ReportToDB>
</MOVERS>
<APPLY_TO_POSE>
</APPLY_TO_POSE>
  <PROTOCOLS>
    <Add mover="minmover" />
    <Add mover="ddgmover" />
    <Add mover="interface" />
    <Addmover_name="features"/>
    <Addfilter="alasca"/>
    <Addfilter="Unsat"/>
  </PROTOCOLS>
</OUTPUT />
</ROSETTASCRIPTS>

```

- **Parâmetros para o docking molecular**

```

-partners A B
-dockpert 3 8
-docking:sc min
-nstruct 100.000
-ex1
-ex2aro
-in:le:scomplex 0001.pdb

```

-constraints:cstlecstle

- **Script para o *docking* molecular**

```

<ROSETTASCRIPTS>
<SCOREFXNS>
<ScoreFunctionname="Score_Function" weights="Ref2015" />
</SCOREFXNS>
<TASKOPERATIONS>
<ProteinInterfaceDesignname="InterfaceDesign" repack_chain1="1" repack_chain2="1"
design_chain1="0" design_chain2="1" interface_distance_cutoff="8.0" />
<ExtraRotamersGenericname="Rotamers" ex1="1" ex2="1" ex1aro="1" ex2aro="1" />
  <ReadResfilename="selec_mutations" filename="resfile.dat" />
  <OperateOnCertainResiduesname="hotspot_repack">
<RestrictToRepackingRLT/>
<ResiduePDBInfoHasLabelproperty="HOTSPOT"/>
</OperateOnCertainResidues>
</TASKOPERATIONS>
<FILTERS>
<Ddgname="ddg" confidence="0.0" />
<BuriedUnsatHbondsname="unsat" confidence="0.0"/>
<ShapeComplementarityname="Sc" confidence="0.0"/>
</FILTERS>
<MOVERS>
  <Prepackname="Prepack" scorefxn="Score_Function" jump_number="0"
task_operations="Rotamers" min_bb="0" />
  <DockingProtocolname="Dock" partners="A_B" dock_min="1"
docking_score_high="Score_Function" low_res_protocol_only="0" docking_local_refine="1"
task_operations="Rotamers" />
  <PackRotamersMovername="Design_Motif" scorefxn="Score_Function"
task_operations="hotspot_repack,Rotamers,selec_mutations" />
  <PackRotamersMovername="Design" scorefxn="Score_Function"
task_operations="InterfaceDesign,hotspot_repack,Rotamers" />
  <MinMovername="Minimization" chi="1" bb="1" jump="0" tolerance="0.0001"
max_iter="2000" scorefxn="Score_Function" />
  <Backrubname="Backrub" />
</MOVERS>
<PROTOCOLS>
<Add mover="Backrub" />
<Add mover="Prepack" />
<Add mover="Dock" />
<Add mover="Design" />
<Add mover="Design_Motif" />
<Add mover="Minimization" />
<Addfilter="ddg" />
<Addfilter="unsat"/>
<Addfilter="Sc"/>
</PROTOCOLS>
<OUTPUT scorefxn="Score_Function" />
</ROSETTASCRIPTS>

```

**ANEXO A - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS NO
PERÍODO DO DOUTORADO**

1. LOEFFLER, FELIX F.; VIANA, ISABELLE F. T.; FISCHER, NICO; COELHO, DANILO F.; SILVA, CAROLINA S.; **PURIFICAÇÃO, ANTÔNIO F.**; ARAÚJO, CATARINA M. C. S.; LEITE, BRUNO H. S.; DURÃES-CARVALHO, RICARDO; MAGALHÃES, TEREZA; MORAIS, CLARICE N. L.; CORDEIRO, MARLI T.; LINS, ROBERTO D.; MARQUES, ERNESTO T. A.; JAENISCH, THOMAS. Identification of a Zika NS2B epitope as a biomarker for severe clinical phenotypes. *RSC Medicinal Chemistry*, v. n/a, p. p. 10.1039/D1MD, 2021.
2. SONON, PAULIN; BRITO FERREIRA, MARIA LÚCIA; SANTOS ALMEIDA, RENATA; SALOUM DEGHAIDE, NEIFI HASSAN; HENRIQUE WILLCOX, GLAUCO; GUIMARÃES, ELIZABETH LIMA; **DA PURIFICAÇÃO JÚNIOR, ANTÔNIO FERNANDO**; CORDEIRO, MARLI TENÓRIO; ANTUNES DE BRITO, CARLOS ALEXANDRE; DE ALBUQUERQUE, MARIA DE FÁTIMA MILITÃO; LINS, ROBERTO D; DONADI, EDUARDO A; LUCENA-SILVA, NORMA. Differential Frequencies of HLA-DRB1, DQA1, and DQB1 Alleles and Haplotypes Are Observed in the Arbovirus-Related Neurological Syndromes. *J INFECT DIS*, v. 224, p. 517-525, 2020.
3. DE ARAÚJO, LÍVIA CAROLINE ALEXANDRE; **DA PURIFICAÇÃO-JÚNIOR, ANTÔNIO FERNANDO**; DA SILVA, SIVONEIDE MARIA; LOPES, ANA CATARINA SOUZA; VERAS, DYANA LEAL; ALVES, LUIZ CARLOS; DOS SANTOS, FÁBIO BRAYNER; NAPOLEÃO, THIAGO HENRIQUE; DOS SANTOS CORREIA, MARIA TEREZA; DA SILVA, MÁRCIA VANUSA; OLIVA, MARIA LUIZA VILELA; DE OLIVEIRA, MARIA BETÂNIA MELO. In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, v. 169, p. 669-677, 2019.
4. **ANTÔNIO, FERNANDO DA PURIFICAÇÃO JUNIOR**; LÍVIA, CAROLINE ALEXANDRE DE ARAUJO; ANA, CATARINA DE SOUZA LOPES; MARCELA, DE ARAUJO SOBRAL; GLAUCIA, MANOELLA DE SOUZA LIMA; MARCIA, VANUSA DA SILVA; MARIA, TEREZA DOS SANTOS CORREIA; MARIA, BETANIA MELO DE OLIVEIRA. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. *AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH*, v. 11, p. 1142-1149, 2017

**ANEXO B - PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA TESE
PUBLICADO**

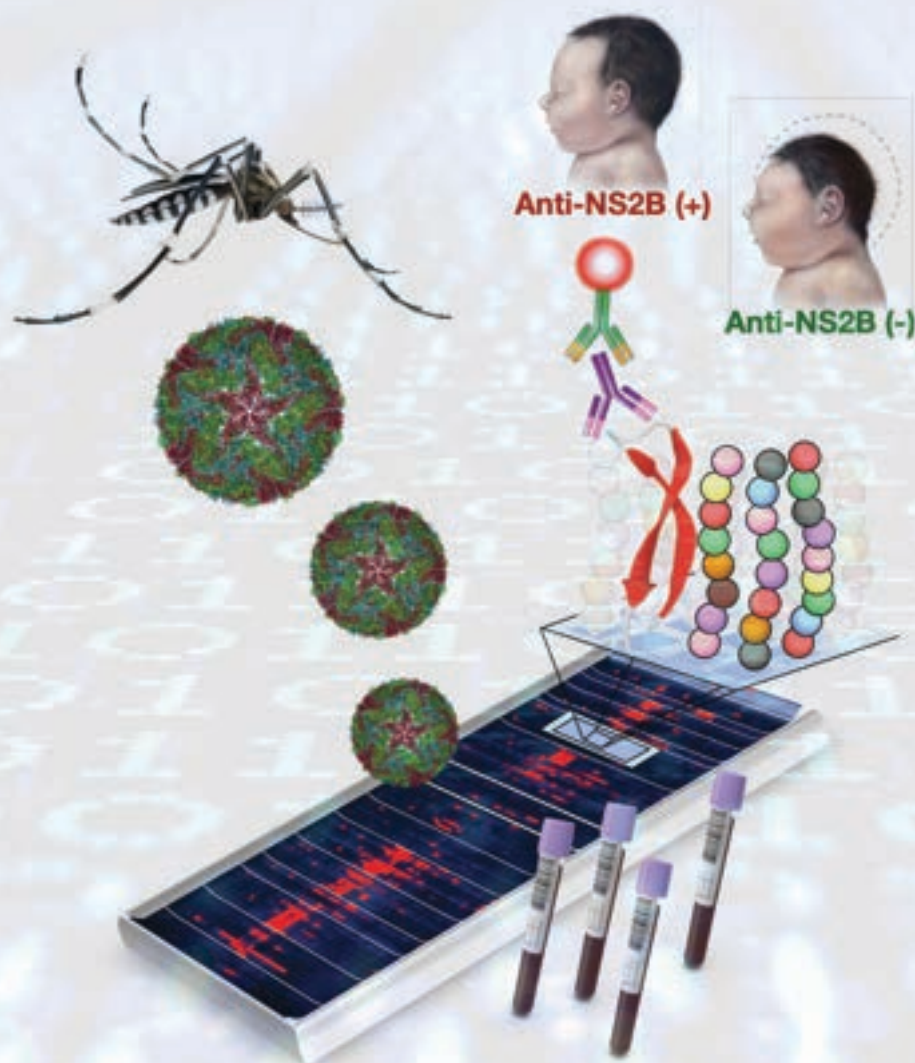
Antonio Fernando da Purificação Júnior, Elisa Almeida Neves Azevedo, Roberto Dias Lins Neto, Isabelle Freire Tabosa Viana. Capítulo 12: CHIKUNGUNYA: DA EPIDEMIOLOGIA AO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS, do livro Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. DOI: 10.47174/lap2020.ed.00000105

ANEXO C - PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA TESE E EM PROCESSO DE SUBMISSÃO

Antonio Fernando da Purificação Júnior, Matheus Vitor Ferreira Ferraz, Marjorie C. L.C. Freire, Isabelle Freire Viana, and Roberto Dias Lins. Design of a synthetic protein targeting Chikungunya Virus E2B domain epitope towards acute phase diagnostics and therapy. RSC Medicinal Chemistry

RSC Medicinal Chemistry








rsc.li/medchem



ISSN 2632-8682

Cite this: *RSC Med. Chem.*, 2021, 12, 1525

Identification of a Zika NS2B epitope as a biomarker for severe clinical phenotypes†

Felix F. Loeffler, ^{‡a} Isabelle F. T. Viana, ^{‡b} Nico Fischer,^c Danilo F. Coêlho, ^{bd} Carolina S. Silva, ^e Antônio F. Purificação Jr.,^b Catarina M. C. S. Araújo,^b Bruno H. S. Leite,^b Ricardo Durães-Carvalho, ^f Tereza Magalhães,^b Clarice N. L. Morais,^b Marli T. Cordeiro,^b Roberto D. Lins, ^{§b} Ernesto T. A. Marques ^{§bg} and Thomas Jaenisch^{§*ch}

The identification of specific biomarkers for Zika infection and its clinical complications is fundamental to mitigate the infection spread, which has been associated with a broad range of neurological sequelae. We present the characterization of antibody responses in serum samples from individuals infected with Zika, presenting non-severe (classical) and severe (neurological disease) phenotypes, with high-density peptide arrays comprising the Zika NS1 and NS2B proteins. The data pinpoints one strongly IgG-targeted NS2B epitope in non-severe infections, which is absent in Zika patients, where infection progressed to the severe phenotype. This differential IgG profile between the studied groups was confirmed by multivariate data analysis. Molecular dynamics simulations and circular dichroism have shown that the peptide in solution presents itself in a sub-optimal conformation for antibody recognition, which led us to computationally engineer an artificial protein able to stabilize the NS2B epitope structure. The engineered protein was used to interrogate paired samples from mothers and their babies presenting Zika-associated microcephaly and confirmed the absence of NS2B IgG response in those samples. These findings suggest that the assessment of antibody responses to the herein identified NS2B epitope is a strong candidate biomarker for the diagnosis and prognosis of Zika-associated neurological disease.

Received 11th April 2021,
Accepted 17th June 2021

DOI: 10.1039/d1md00124h

rsc.li/medchem

Introduction

Zika virus (ZIKV) emerged in the Americas, causing an unprecedented epidemic of microcephaly in babies born to mothers infected during pregnancy, and neurological disease in adults following acute infection. Some uncertainty still remains regarding the time of introduction into the Americas; however, the virus likely entered Brazil in 2013,¹ with the first

cases of microcephaly reported in 2015. The temporal correlation between ZIKV introduction in Brazil and the microcephaly epidemic led the Brazilian Government to hypothesize the presence of a causal association.^{2,3} Shortly after (1 February 2016), the World Health Organization (WHO) declared a ‘Public Health Emergency of International Concern’ for the clusters of microcephaly and other neurological disorders, which was only lifted in November 2016.⁴

^a Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Biomolecular Systems, Potsdam, Germany

^b Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil

^c Section Clinical Tropical Medicine, Department of Infectious Diseases, Heidelberg University Hospital, Germany. E-mail: thomas.jaenisch@urz.uni-heidelberg.de

^d Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^f Laboratory of Virology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^g Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

^h German Centre for Infection Research (DZIF), Heidelberg Site, Heidelberg, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: Associated content include: Table S1. Origin and characterization of the samples used in the peptide array. Table S2. Group stratification of the samples used in the MST assays. Table S3. Epidemiological, serology and diagnostic information of the severe ZIKV samples used in the peptide array. Table S4. Laboratorial characterization of the paired serum samples from mothers who delivered babies with microcephaly and their progeny. Fig. S1. Sample set used in the peptide array, resulting in the identification of the NS2B peptide. Fig. S2. Antibody binding affinity measurements to the NS2B peptide by MST. Fig. S3. Superposition of the folded peptide to its native counterpart as in PDB ID 5H6V. Fig. S4. Chromatographic purification and SDS-PAGE of the NS2B-grafted protein. Fig. S5. ROC curve analysis of the NS2B-grafted protein. See DOI: 10.1039/d1md00124h

‡ These authors contributed equally to this work.

§ These authors also contributed equally to this work.

The causal association between congenital ZIKV infection and microcephaly (now referred to as congenital Zika syndrome [CZS] due to its broad range of clinical manifestations) was accepted by WHO in 2016,^{5,6} and evidence continued to accumulate in the following years.⁷ In addition to that, explosive outbreaks in large populations in Latin America revealed other severe neurological sequelae of ZIKV infection in children and adults, including Guillain-Barré syndrome: an immune-mediated demyelinating motor and sensory peripheral neuropathy leading to paralysis.⁸ The ability of ZIKV to cause neurological disease is not unique among flaviviruses.⁹ Several candidate neurovirulence mechanisms have been postulated, among them the glycosylation of the envelope protein,¹⁰ the presence of neuronal receptors (such as AXL) only recognized by ZIKV, and the mutation S139N in the precursor membrane protein of ZIKV, which enhances neurovirulence possibly by creating a new receptor for progenitor cells.^{8,11} To date, however, the viral determinants of ZIKV neurovirulence and the immune components involved have not been fully unraveled.

Prior infection with dengue virus (DENV) has been suggested to be associated with more severe manifestations in ZIKV infections.¹² In countries like Brazil, more than 90% of the adult population has been previously exposed to DENV.¹³ ZIKV and DENV are both members of the *Flaviviridae* family and exhibit considerable cross-reactivity in serological tests, which proves the close phylogenetic and antigenic relationship between these viruses.^{14–16} High anti-DENV titers have been reported to be linked with protection from Zika,¹⁷ whereas sub-neutralizing levels of anti-DENV have been shown to enhance ZIKV infection *in vitro*.^{12,18,19}

The overlapping clinical syndromes and geographical distribution make differential diagnosis a major challenge, especially in situations where the causative viral agent cannot directly be detected and diagnosis is based on indirect serological tests. Highly specific serological tests, capable of discriminating between different flaviviruses and therefore providing accurate prognosis of severe disease, are so far not available. Several serological test platform candidates are currently under development and validation;^{20–24} however, an accurate diagnostic and prognostic marker for ZIKV infection and its severe neurological manifestations has yet to be demonstrated.²⁵

We aimed at characterizing important ZIKV-specific epitopes by analyzing serum samples taken from patients with different clinical outcomes after ZIKV infection in Recife, Northeast Brazil, the epicenter of the ZIKV outbreak in the Americas. With this objective, we explored a novel high-density peptide array technology to search the whole proteome of ZIKV for serological biomarkers of infection. Several platforms based on peptide arrays have been developed and applied for infectious disease research.^{26,27} While most reports qualify the arrays using the detection of linear epitopes binding well-characterized monoclonal antibodies, recently, we and others have used this technology to demonstrate the readout of antibody profiles against

malaria in different patient sera,²⁸ as well as in Lyme disease patients, in the identification of ZIKV epitopes²⁹ and for general vaccine studies.^{29–31} Using our novel solid material-based combinatorial synthesis method,^{32,33} the whole peptidome of ZIKV was produced on a unique single glass slide as overlapping 15-mer peptides.

Due to the complexity and multivariate nature of the data obtained with this new peptide array technology, multivariate analysis techniques rise as alternatives to explore the dataset and to recognize consistently patterned structures that correlate groups of individuals with different clinical outcomes and specific peptide sequences. In this scenario, exploratory and classification techniques were employed to screen our peptide array against ZIKV clinical samples and identify one epitope sequence as a potential biomarker for ZIKV infection and its neurological manifestation with statistical reliability. Following peptide identification, the peptide's structural and thermodynamic stability were assessed by molecular dynamics simulations and confirmed by circular dichroism analysis. To improve the performance of the identified epitope as an immunological marker, we computationally designed a new protein that mimics the natural structure of the peptide. The potential use of this protein as a prognostic marker for ZIKV infections with neurological complications was then confirmed.

Results and discussion

Identification of an immunoreactive peptide within the ZIKV NS2B protein by high-density peptide array and multivariate analysis

The customized peptide array containing 1878 15-mer peptides covering the whole proteome of the ZIKV was first used to screen acute and convalescent ZIKV samples, stratified by the presence or absence of DENV background (Tables S1 and S2 and Fig. S1†), to determine the overall IgG-binding properties towards specific peptides. The samples were categorized into eight groups consisting of i) acute Zika patients without dengue infection history ($n = 14$), ii) acute Zika patients with dengue infection history ($n = 17$), iii) acute Zika patients with low antibody titers against dengue ($n = 3$, this group presents negative results for Dengue PRNT and Dengue IgG capture ELISA, and was included due to the difficulty to define the comparison group of 'convalescent Zika patients without dengue infection history' since Dengue seroprevalence in Recife can be above 90% (ref. 13 and 34)), iv) convalescent Zika patients without dengue infection history ($n = 14$), v) convalescent Zika patients with dengue infection history ($n = 17$), vi) convalescent Zika patients with low antibody titers against dengue ($n = 3$), vii) Zika infections with neurological symptoms (NeuroZIKV) without dengue infection history ($n = 11$), and viii) Zika infections with neurological symptoms (NeuroZIKV) with dengue infection history ($n = 24$). Important to note that all of the NeuroZIKV serum samples used in the study have exhibited ZIKV IgG positive results in previous tests (IgG ELISA and PRNT).



Fig. 1 Sample classification used in the peptide array, resulting in the identification of the NS2B peptide. One hundred and twenty well-characterized serum samples collected from individuals aged 9 to 57 years old were divided into 8 groups, according to sample stratification through molecular and serological tests. Comparison groups included: 1. ZIKV+ acute samples with and without previous DENV infection (coloured in red); 2. ZIKV+ convalescent samples with and without previous DENV infection (coloured in blue); 3. ZIKV+ acute and convalescent samples with low anti-DENV antibody titers (coloured in magenta); 4. NeuroZIKV samples with and without previous DENV infection (coloured in green). GBS stands for Guillain-Barré syndrome.

Serum samples from individuals not exposed to ZIKV or DENV were used as assay control group ($n = 8$). Sample classification is shown in Fig. 1.

The median fluorescence intensity data obtained for each group showed specific IgG responses from patients with confirmed ZIKV infection in convalescent *versus* acute samples towards several peptides of the NS1 and NS2B proteins (for clarity purposes, only the data from NS1 and NS2 proteins is shown in Fig. 2).

A second peptide array, composed of 401 15-mer peptides only covering the amino acid sequences of NS1, NS2A and NS2B proteins, was used to confirm these findings. The fluorescence intensity data of both arrays is shown in Fig. 2A. Individual analysis of the median for each NS2B peptide revealed four strongly immunoreactive amino acid sequences, termed P1 (GDITWEKDAEVTGNS), P2 (GDITWEKDAEITGNS), P3 (TWEKDAEVTGNSPRL) and P4 (TWEKDAEITGNSPRL) (Fig. 2B). The corresponding peptides are adjacent; consequently, their sequences are overlapping. Combining the two sequences led to the identification of a major NS2B epitope (GDITWEKDAEV(I)TGNSPRLDVA) located at the ZIKV poly-proteome position (1425–1445). Fig. 2B shows differences among the median values of different groups of patients from a qualitative standpoint.

Our data show that strong IgG antibody response was elicited against the identified epitope in non-severe ZIKV cases and suggests that the antibody response against NS2B is absent in Zika infections with neurological symptoms (NeuroZIKV) in individuals not previously exposed to DENV. To strengthen this observation, principal component analysis (PCA) was initially performed to assess the IgG response in

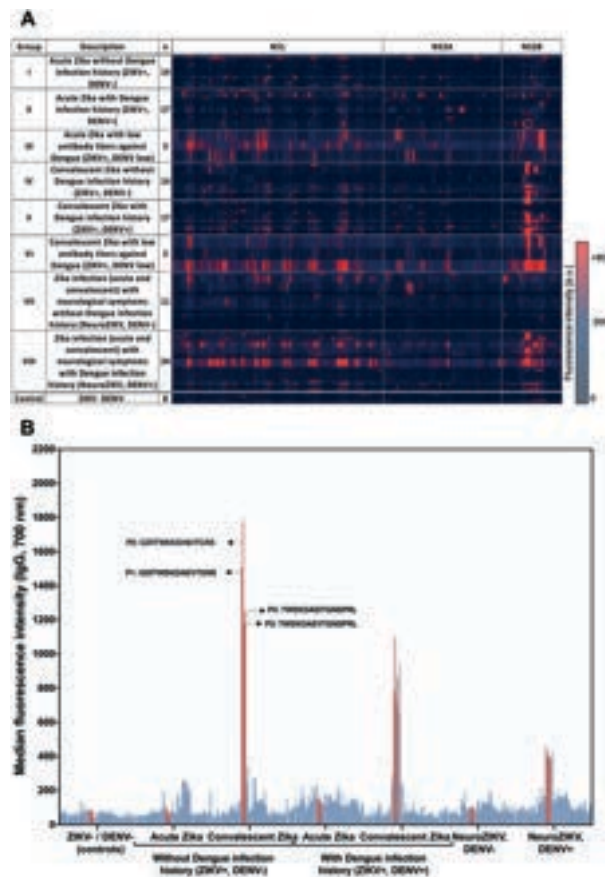


Fig. 2 Peptide array screening and identification of putative ZIKV NS2B peptides. (A) Peptide array screening showing the selection of 401 peptides covering the ZIKV NS1 and NS2B proteins. The IgM and IgG antibody profiles were determined for a control group ($n = 8$) and for a set of acute and convalescent serum samples from 103 individuals according to the following groups: i) acute Zika patients without dengue infection history ($n = 14$), ii) acute Zika patients with dengue infection history ($n = 17$), iii) acute Zika patients with low antibody titers against dengue ($n = 3$), iv) convalescent Zika patients without dengue infection history ($n = 14$), v) convalescent Zika patients with dengue infection history ($n = 17$), vi) convalescent Zika patients with low antibody titers against dengue ($n = 3$), vii) Zika infections with neurological manifestations (NeuroZIKV) without dengue infection history ($n = 11$), viii) NeuroZIKV infections with dengue infection history ($n = 24$). The IgM and IgG antibody response profiles are combined in the figure. (B) Identification of putative ZIKV NS2B epitopes. Immunoreactivity of the ZIKV NS2B peptides was individually assessed against the serum samples groups described in Fig. 2A. Bars represent the median fluorescence intensity for individual peptides. The four peptides showing the highest fluorescence signals in the array are highlighted in red.

the NS2B peptide array dataset. PCA is an unsupervised technique based on dataset's variance that can be employed as a pattern recognition tool (for further detail on PCA theory see associated content). The PCA analysis highlighted similarities and differences between NeuroZIKV and non-severe ZIKV cases, as well as identified the importance of each peptide signal related to these differences.

The scores plot (shown in Fig. 3A) shows the relationship among objects analyzed (patients), in such way that the

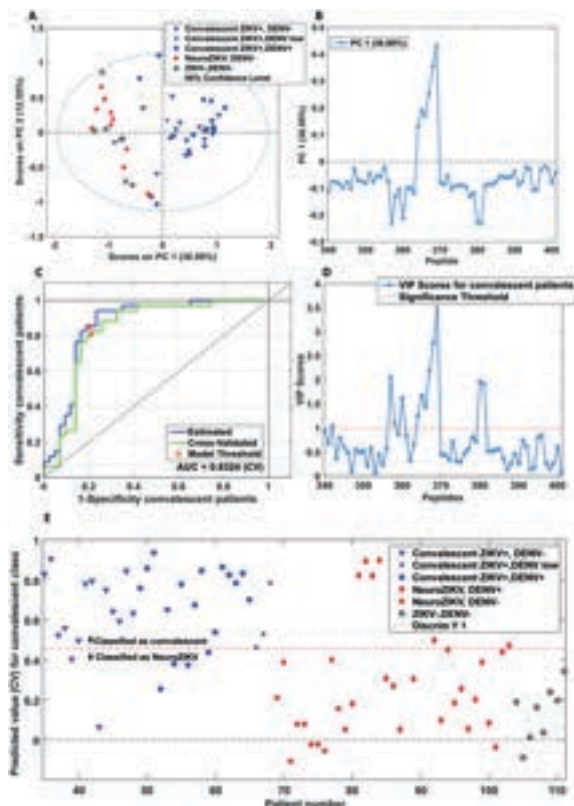


Fig. 3 Summary of the statistical data analysis. (A) Scores and (B) loadings plots of 2-component PCA model including control group, convalescent ZIKV+ (DENV⁻, DENV⁺ and DEN low) and NeuroZIKV, DENV⁻ patients; and PLS-DA results for the 1-latent variable global model, including (C) ROC curve, (D) VIP scores plot for PLS-DA model and (E) predicted values of samples.

closer two patients are, more similarities are observed in terms of signal response against the antibody. The 2 first principal components (PCs) obtained from a 2-component PCA model are depicted in Fig. 3A and B. In Fig. 3A the scores scatter plot is shown for the control group (ZIKV⁻DENV⁻), convalescent Zika without Dengue infection history (ZIKV⁺, DENV⁻ (group IV)), convalescent Zika with dengue infection history (ZIKV⁺, DENV⁺ (group V)), convalescent Zika with low antibody titers against dengue (ZIKV⁺, DENV low (group VI)) and Zika infection (acute and convalescent) with neurological symptoms without dengue infection history (NeuroZIKV, DENV⁻ (group VII)) patients. It is possible to observe that the majority of the samples in the NeuroZIKV, DENV⁻ and the control group has negative score values for PC1, whereas non-severe ZIKV samples have positive score values of PC1. The loadings plot, depicted in Fig. 3B, shows how each peptide array contributes for the differences observed in the scores plot. Positive loading values indicates higher intensity responses for patients with positive scores and lower intensities for patients with negative scores. In PC1, the difference accounts for 37% of total data variance and is mainly related to the following sequence peptides with positive values of PC1 loading

plot (Fig. 3B): GDITWEKDAEVTGNS, GDITWEKDAEITGNS, TWEKDAEVTGNSPRL, TWEKDAEITGNSPRL, KDAEVTGNSPRLDVA and KDAEITGNSPRLDVA, in which the first four are the peptides described in Fig. 2B. All these peptides have in common the amino acid sequence KDAEV(I)TGNS.

According to the loadings and scores plots of PCA model, the abovementioned peptides (positive loading values in PC1, Fig. 3B) are positively correlated to non-severe ZIKV patients (positive scores in PC1, Fig. 3A blue symbols) and negatively correlated to NeuroZIKV, DENV⁻ patients (negative scores in PC1, Fig. 3A red and grey symbols). Therefore, it is possible to state that non-severe ZIKV samples have higher fluorescence signal intensity for those peptides when compared to NeuroZIKV, DENV⁻ samples. Moreover, no significant difference among non-severe ZIKV patients (groups IV–VI) or between NeuroZIKV, DENV⁻ patients and the control group (Fig. 3A red and grey symbols) were observed. It is important to note that there is no difference between the NeuroZIKV, DENV⁻ and the control group, therefore the NeuroZIKV, DENV⁻ signal response is only background noise. Although PC2 accounts for 12% of total data variance, its score scatter plot does not show distinctive features.

Our results from the PCA model indicate that the previously mentioned peptides are potential candidates to discriminate NeuroZIKV patients in the clinical outcomes. To test statistical difference among the groups in a multivariate way, the fluorescence signals were employed as classification inputs to build partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) models. In contrast with PCA, PLS-DA is a supervised technique focused in classification and aims to maximize the covariance between the groups of patients and its IgG response profiles (for further detail on PLS-DA theory see associated content). In this case, the model is built in a way that a decision function, shown as a threshold on scores plot of PLS-DA (red line Fig. 3E), is set to discriminate patients belonging to different groups and which peptides are more important in that discrimination.

Four different PLS-DA models were built: (i) a global model to test the ability of the epitope of interest to discriminate all NeuroZIKV patients (groups VII and VIII) plus the control group from all non-severe ZIKV patients (groups IV–VI); (ii) a model to discriminate NeuroZIKV, DENV⁻ (group VII) from non-severe ZIKV patients (groups IV–VI); (iii) a model to discriminate NeuroZIKV (groups VII and VIII) from non-severe ZIKV, DENV⁻ (group IV) patients; and (iv) a model to discriminate NeuroZIKV patients according to their DENV background (group VII *versus* VIII).

The global model was built to investigate if the differences on IgG signal response for the given epitope will suffice to discriminate non-severe (groups IV–VI) from NeuroZIKV patients (groups VII and VIII), regardless their DENV background. The PLS-DA model shown in Fig. 3C provided a value for the area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) curve equal to 0.83 with sensitivity and specificity values for NeuroZIKV class of

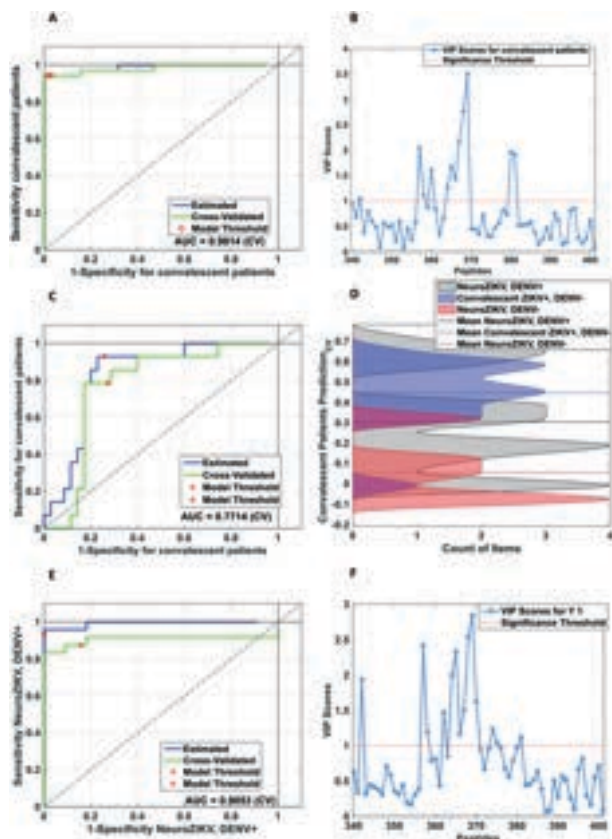


Fig. 4 Summary of the additional PLS-DA models. (A) ROC curve and (B) VIP scores plot of PLS-DA to discriminate NeuroZIKV, DENV⁻ from non-severe ZIKV patients (group VII vs. groups IV–VI); (C) ROC curve and (D) distribution classification histogram of patients on validation step for PLS-DA model to discriminate non-severe ZIKV, DENV⁻ (group IV) from NeuroZIKV (groups VII, VIII) patients; (E) ROC curve and (F) VIP scores plot of PLS-DA to discriminate NeuroZIKV, DENV⁻ from NeuroZIKV, DENV⁺ patients (group VII vs. group VIII).

79% and 85%, respectively. The variable importance in projection (VIP) scores plot is an important parameter to evaluate which peptides are more important to diagnosis prediction (Fig. 3D) and must have values above the significance threshold. The peptides at data matrix positions 364–367 containing the sequence KDAEV(I)TGNS are the ones above the discriminant threshold and, therefore the most important variables to discriminate the two groups of patients. This result corroborates that the mentioned peptides are more likely to be an epitope from NS2B protein that can be used as a potential biomarker for NeuroZIKV infection.

Fig. 3E shows the predicted scores for each patient, in which those who shows values above 0.45 (defined as the threshold by maximizing model sensitivity and specificity) will be classified as convalescent patients. It is worth mentioning that thirteen (9 NeuroZIKV DENV⁺ and 4 non-severe ZIKV⁺ DENV⁺) out of fifteen misclassified samples belong to patients with previous DENV infection (Fig. 3E). This result suggests that antibodies from DENV previous infections may cross-react with the identified epitope.

To evaluate the influence of NeuroZIKV, DENV⁺ patients in the classification model performance, a 1-latent variable PLS-DA model was built to classify patients as either non-severe or control/NeuroZIKV, DENV⁻, without including NeuroZIKV, DENV⁺ patients. The obtained ROC curve (Fig. 4A) provided an AUC value of approximately 0.98 at 95% confidence level. This improved classification model showed higher sensitivity and specificity values of 89% and 94%, respectively, for NeuroZIKV class. Evaluating the VIP scores plot for the classification model (Fig. 4B), it is clear that the peptides containing the KDAEV(I)TGNS sequence appear again as above the significance threshold. This result shows that the identified epitope from NS2B protein can be used as a biomarker for the identification of ZIKV patients who have developed severe neurological symptoms.

Interestingly, Fig. 2B shows that low IgG antibody response against the identified epitope was observed in NeuroZIKV patients that have been previously exposed to DENV. However, this response is apparently higher when compared to the control and NeuroZIKV groups without previous DENV infection. This finding suggests that DENV infection may elicit IgG response against the NS2B epitope. To further investigate this, an additional PLS-DA model was built (Fig. 4C and D) including only non-severe ZIKV, DENV⁻ and all NeuroZIKV (groups VII and VIII) patients.

The ROC curve provided an AUC of 0.77 and model sensitivity and specificity for NeuroZIKV class were 71% and 78%, respectively, reflecting a model conflict to find a proper discrimination function. During model optimization step the patients' membership is predicted as a value that range from 0 to 1, with a threshold of 0.33 (defined by maximizing sensitivity and specificity). This means that patients that were predicted with a value higher than 0.33 belong to convalescent class, while values lower than that correspond patients not assigned to convalescent class. It is possible to observe that NeuroZIKV DENV⁺ patients (grey curve) are predicted along the whole range, while non-severe ZIKV, DENV⁻ patients (blue curve) are systematically above the threshold and NeuroZIKV DENV⁻ patients below the threshold. The robustness of error associated to the PLS-DA models developed are presented on ESI[†] Tables S5–S8. This result shows a large overlap of the three distributions, particularly NeuroZIKV DENV⁺ over the other two, which are partially separated from each other. This means that NeuroZIKV patients that were previously exposed to DENV also show significant fluorescence signal and cannot be unequivocally discriminated from non-severe ZIKV⁺, DENV⁻ patients, in the current dataset. On the other hand, a model built considering only NeuroZIKV patients shows that NeuroZIKV DENV⁺ are statistically different from NeuroZIKV DENV⁻ cases, and the latter has significantly lower responses against the abovementioned NS2B epitopes (Fig. 4E and F). Those findings suggest that neurological manifestations of ZIKV infection are associated with reduced antibody response towards the identified NS2B epitope, except when DENV antibodies are present. Corroborating with this finding,

microscale thermophoresis (MST) experiments have shown that the serum antibody half-maximal binding parameter (EC_{50}) from the NeuroZIKV samples was remarkably low (EC_{50} values *ca.* 10^{-3} Molar), which were comparable to the background noise observed in the negative control samples (ESI† Fig. S1A and B).

Molecular basis of the interaction between the identified NS2B epitope and ZIKV/DENV antibodies

Sequence comparison between the identified NS2B epitope and other flaviviruses showed that this region in the NS2B ZIKV protein presents fundamental differences in surface charge (Fig. 5A). ZIKV exhibits a positively charged residue (K) in a position where all other flaviviruses exhibit a negatively charged residue (D or E) and an N instead of A, V, or S. In fact, differential charge distribution on the surface of ZIKV and DENV NS1 proteins has previously been documented and suggested as a candidate mechanism to be explored in the query for viral discrimination.²⁹ Experimental measurements of biomolecular association have shown that

hydrogen bonds involving individual charged groups can contribute with up to 4 kcal mol⁻¹. This value is considerably lower in uncharged interactions with around 0.5 to 1.5 kcal mol⁻¹. Residues of opposite charge in the ZIKV and DENV epitopes should therefore be central in the discrimination. Interestingly, if charge was assumed to be the main driving force behind discrimination between ZIKV and DENV proteins and related immune response, the expected values for energy association would translate in roughly one order of magnitude binding constant. Microscale thermophoresis (MST) experiments were conducted and have determined the difference in half-maximal binding parameter (EC_{50}) between IgG antibodies in human serum and the identified epitope (ESI† Fig. S1C and D) was precisely that as determined computationally. However, the measured affinity is more likely to be an apparent affinity (defined here as half-maximum binding parameter given the lack of a 1:1 ratio IgG-peptide) as a total serum polyclonal IgG were included in the experiment. Moreover, despite the punctual charge difference, the overall similarity between ZIKV and DENV NS2B epitope is *ca.* 62%. Since antibodies against this region appear to be elicited in both DENV and ZIKV non-severe infections, cross-reactivity with non-specific DENV antibodies could be expected, as evidenced in the above PLS-DA models.

It must be kept in mind that antibody responses from a peptide may be suboptimal, as the conformation of peptides may not necessarily reflect of that sequence in the native protein. Peptide flexibility is well known to compromise binding strength and enhance cross-reactivity, which could potentially explain the signals from NeuroZIKV patients previously infected by DENV. In fact, using a less sensitive technique, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), than the peptide array, we have attempted to screen a larger number ($N = 42$) of serum samples from patients with ZIKV-associated neurological disease using the NS2B peptide to support the finding that IgG antibody response towards the identified epitope is not found in those individuals. However, despite assay optimization, the signal responses were as low as the background noise, which precluded further testing (data not shown for conciseness).

To understand the molecular-level features underlying the interactions between the identified NS2B epitope and the corresponding ZIKV antibodies, we performed sequence and structural analyses of the peptide, the latter by means of molecular dynamics simulations. From a structural point of view, a partial structure of ZIKV NS2B is found in complex with NS3 (Fig. 5A), in which the N-terminal region (residues 49–67) of NS2B forms a β -strand packed within the N-terminal region of NS3.^{35–38} Although the C-terminal part of NS2B (residues 68–96) also forms a β -hairpin, NMR results have indicated that the C-terminal region shows significant structural diversity, being highly flexible and often disordered.^{36,37} Mishra *et al.* have found that the lack of the residues K63, D64 drastically decreases the immunogenicity of the peptide.³⁹ Based on the high flexibility of the C-terminal region and on the finding of Mishra *et al.*, the

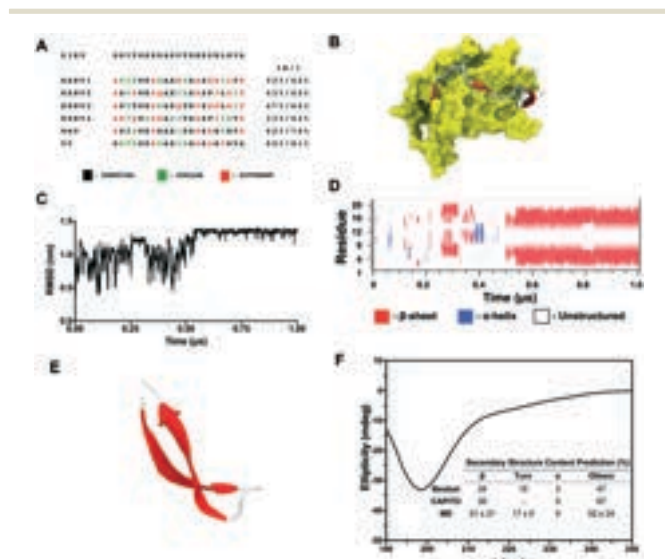


Fig. 5 Sequence and structural analyses of the identified NS2B peptide. (A) Sequence comparison of the 21-mer peptide based on the ZIKV NS2B epitope with the most frequently occurring strains of DENV, WNV, and YFV (residues are color-coded to highlight identity, chemical similarity, and differences. 'ID' stands for identity; a '+' indicates similarity degree). (B) Structure representation of ZIKV NS2B bound to NS3 based on PDB ID 5H6V.³⁵ The latter is shown as a yellow surface. NS2B is shown as cartoon and sticks, where β -strand regions are shown as red arrows, unstructured regions by a white tube and atoms in sticks color-coded as cyan for carbon, red for oxygen and blue for nitrogen. (C) Root-mean-square deviation of the NS2B-based peptide as a function of simulation time. The same region in PDB ID 5H6V³⁵ was used as a reference. (D) Secondary structure content of the peptide as a function of simulation time. (E) Representative structure of the folded peptide in cartoon (β strands are shown in red and unstructured regions in white). (F) Far-UV circular dichroism (CD) spectra of the NS2B peptide in acetate buffer collected at 25 °C. Predicted secondary structure content based on experimental data is shown in the graph.

N-terminal portion of the peptide appears to be a promising site for antibody recognition.

Antigenic peptides exist in solution in a variety of conformations, and only conformations that are structurally similar to the one in the native protein will bind to the antibody.⁴⁰ To characterize the structural dynamics and conformational preferences of the 21-mer peptide based on NS2B address (comprising the N-terminal residues 57-GDITWEKDAEVTGNSPRLDVA-77 in the NS2B protein), a 1- μ s molecular dynamics simulation was performed in solution. Structural stability was assessed by the positional root-mean-square deviation (RMSD) of all backbone atoms, as a function of simulation time (Fig. 5B). The native crystal structure (PDB 5H6V³⁵) was used as a reference structure. The peptide remains disordered and unstructured in the first half of simulation time, as evidenced by a large variation on RMSD values and the time-dependent profile of secondary structures (DSSP, Fig. 5C). The RMSD converges to a value of approx. 1.28 nm after 0.6 μ s, indicating that the peptide has assumed a preferred conformation. The molecule assumes a flexible conformation around a β -hairpin motif, where two β -strands are separated by a short loop (Fig. 5C and D). The antigen-antibody recognition mechanism also requires shape complementarity;⁴¹ therefore, highly flexible peptides are unable to efficiently bind to their respective antibodies.⁴² A stable, close to its native-like conformation would allow the NS2B-based peptide to be recognized by the antibodies. The folded structure of the 21-mer peptide in solution, as evidenced by the simulation, shows that only parts of the N-terminal residues of the peptide are in a similar conformation as in its native counterpart (Fig. S2[†]), which can lower the ability of the peptide to bind to the antibody.

To further investigate the secondary structure content of the peptide, we have acquired the experimental circular dichroism (CD) spectrum (Fig. 5E). The CD graph shows a strong negative band near 200 nm, characteristic of disordered polypeptides.⁴³ Moreover, to obtain a detailed structure information from the CD spectrum, we predicted the secondary structure components of the peptide using two different algorithms: BeStSel⁴⁴ and CAPITO.⁴⁵ Both algorithms predicted that the peptide's secondary structure is composed by *ca.* 30% of β -sheet and *ca.* 70% of unstructured motifs (Turn + Others) (Fig. 5E, inside table). This prediction is in agreement to the MD data, especially regarding β -sheet content (Fig. 5E, inside table). A peptide in solution is characterized by an ensemble of conformers with different contents of secondary structure and the experimental CD spectrum represents an average of the contributions from different conformers.⁴⁶ Although the MD simulation suggests that the peptide may adopt a preferred β -hairpin conformation, the variation in its secondary content along the trajectory shows a significant level of conformational disorder. These results, along with the fact that the peptide exhibits a CD spectrum typical of disordered proteins, would imply that the unfolded, rather than the folded, conformers determine the shape of the CD spectra.⁴³ Together, the

findings from MD and CD analyses support that the peptide in solution adopts a non-native like conformation, leading to a suboptimal affinity by specific ZIKV antibodies and explaining why the signal responses were not significantly different from background noise in the ELISA assays and the inability of the peptide array to fully discriminate NeuroZIKV patients with previous DENV infections from NeuroZIKV/DENV-.

Engineering an antigen carrying the NS2B epitope and absence of anti-NS2B IgG antibodies in mother-babies paired samples

Aiming to overcome the lack of sensitivity and specificity of the NS2B peptide due to its high flexibility, we have performed the computational engineering of a synthetic, soluble and stable protein containing the target epitope. The new protein was designed to allow the exposure of the epitope in its native conformation, allowing its recognition by specific antibodies.

Based on Mishra *et al.*³⁹ and our findings, we chose to use the residues 62-EKDAEVTGNSPRL-74 of the NS2B protein as the epitope core. The structural motif of the NS2B epitope

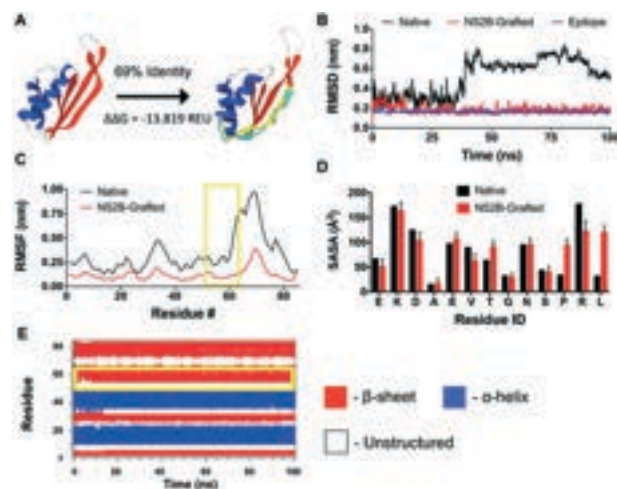


Fig. 6 Structural characterization *in silico* of the engineered protein carrying the identified NS2B peptide. (A) Native structure of the scaffold protein (left) and structure of the NS2B-grafted protein after design/molecular dynamics (right), where the epitope region is shown in yellow and the native conformation of the epitope in NS2B is superimposed to it and displayed in cyan. The percentage indicates the sequence identity between the designed protein and the native scaffold. $\Delta\Delta G$ stands for the respective change of free energy of folding after the design protocol in Rosetta units (REU). (B) RMSD analysis for the backbone atoms for the native scaffold (black), for the NS2B-grafted designed protein (red) and comparison of the epitope with its native structure (blue). (C) Flexibility analysis using the RMSF values for the backbone atoms of the native scaffold (black) and NS2B-grafted (red). The region where the epitope was grafted is highlighted in yellow. (D) Solvent accessibility surface (SASA) indicating the exposure per residue of the epitope in its native structure (black) and in the designed protein (red). (E) Time-dependent secondary structure map indicating the maintenance of structural motifs during the MD simulation.

was aligned to the structure of 1250 proteins, yielding one structure with low RMSD and high exposure of the epitope. The scaffold used was the Mja10b protein (PDB ID: 1NH9),⁴⁷ a DNA-binding protein from the hyperthermophilic organism *Methanocaldococcus jannaschii*. In order to ensure absence of cross-reactivity in the following immunoassays, a BLASTp alignment of the engineered protein was performed against the entire ZIKV polyproteome showing no identity or even similarity to other regions than the carried-out epitope (data not shown for conciseness). The epitope was grafted onto the 3rd β -sheet (Fig. 6A, highlighted in yellow) and after the redesign of the chimeric protein (NS2B-grafted) the identity relative to native Mjab10 was 69%. An improvement of $\Delta\Delta G = -13\,819$ REU (Rosetta energy units) in the free energy of NS2B-grafted relative to the native one was also achieved, suggesting that the designed protein is a thermodynamically more stable structure. Subsequently, the structural stability of the designed protein was evaluated by means of a 100 ns MD simulation. The native scaffold was also evaluated for comparison purposes. The RMSD for the backbone atoms of both NS2B-grafted and native scaffold proteins relative to their respective initial structures were calculated over the entire trajectory (Fig. 5B). While the native scaffold showed high RMSD values after 40 ns of simulation time (Fig. 6B, black curve), the NS2B-grafted protein showed values around 0.2 nm throughout the trajectory (Fig. 6B, red curve). This result suggests that the NS2B-grafted is structurally more stable, due to the favorable interactions designed during the modeling stage. The conformational stability of the epitope was also evaluated by comparing the epitope backbone in the chimera (Fig. 6B, blue curve) with its native structure (Fig. 5A). The RMSD of the epitope backbone converges to an average value of 0.17 nm, suggesting a native-like conformation. This similarity can be seen when the native motif is aligned to the epitope in the NS2B-grafted (Fig. 6A, cyan structure). The mean quadratic fluctuation (RMSF) of the backbone atoms was also evaluated over the entire trajectory (Fig. 6C). For NS2B-grafted protein the RMSF values remained low (under 0.3 nm), including the region where the epitope was allocated (Fig. 6C, highlighted in yellow). The regions with greatest atomic fluctuations observed correspond to regions of loops and turns, which are expected to be intrinsically disordered. The low average values of RMSD and RMSF are indicative that the presence of the epitope does not destabilize the scaffold and the designed NS2B-grafted maintains its native-like structure. The solvent-accessible surface area (SASA) for the epitope residues was also calculated during the trajectory and compared with the exposure in the native structure (Fig. 6D). Our data suggests that the epitope is exposed, similarly to its native structure, and available for antibody recognition. Moreover, this finding includes residues K63 and D64 found by Mishra *et al.* to be critical for antigen-antibody binding.³⁹ In agreement with the RMSD and RMSF data, the DSSP for the NS2B-grafted protein indicates that all secondary structures were well

maintained throughout the simulation (Fig. 5E), including the epitope region (Fig. 5E, highlighted in yellow).

Following the computational engineering and *in vitro* production of a protein closely mimicking the natural structure of the NS2B epitope (ESI† Fig. S3–S5), presence of IgG towards the NS2B epitope was assessed in a subset of 21 paired samples from mothers who delivered babies with ZIKV-associated microcephaly and their children through ELISA. Sensitivity and specificity at all possible cut-off points were determined through receiver operating characteristics (ROC) analysis (ESI† Fig. S6) and the area under the curve was determined (AUC = 1.0, p value = 0.0002). The robustness of error of the NS2B-grafted protein ELISA and sample classification is shown on ESI† Tables S9 and S10. In agreement with the computational analysis, the NS2B-grafted protein exhibited enhanced immunoreactivity when compared to the NS2B peptide from the peptide array and ELISA (latter not shown for conciseness) and allowed a clear distinction between negative and positive control samples (Fig. 7A). Corroborating our findings, the anti-NS2B IgG antibody profile can be used to distinguish non-severe from severe (NeuroZIKV) infections, while the analysis of the paired samples confirmed that this IgG response is absent in the serum from mothers who delivered babies with ZIKV-associated microcephaly and their progeny (Fig. 7B). On the other hand, the role of the absence of such antibodies in the development of neurological outcomes is beyond the scope of this work, and therefore remains as an open question.

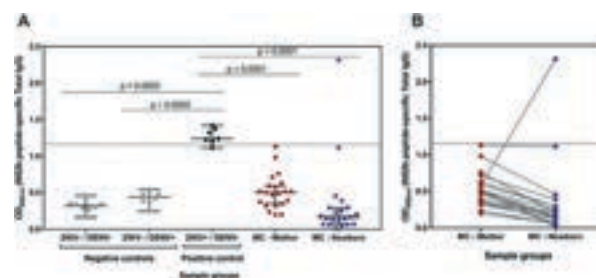


Fig. 7 Detection of total IgG antibodies against the NS2B epitope engineered in the NS2B-grafted protein in paired samples from mothers and babies with ZIKV-associated microcephaly through ELISA. (A) Scatter plot representation of NS2B-specific IgG antibodies detection in serum samples from ZIKV naïve (ZIKV-/DENV- ($n = 8$) and ZIKV-/DENV+ ($n = 8$), negative controls) individuals, ZIKV+/DENV- individuals ($n = 7$, positive controls) and mothers who delivered babies with ZIKV-associated microcephaly and their progeny ($n = 21$ pairs). The results are shown as mean values over all measurements and corresponding standard error of the mean (S.E.M.). Dots represent individual measurements. A dashed line indicates the median of the positive control group for comparison purposes. The p -values of two-tailed Mann-Whitney test are indicated above each group comparison. (B) Comparison of the detection of anti-NS2B-IgG in mother–children paired samples. Each sample was tested in duplicate and the mean values are shown. A dashed line indicates the assay cut-off as calculated from a ROC curve (Fig. S6†). Gray lines connect paired samples. MC stands for ‘Microcephaly’.

Experimental

Patient population

Sixty-eight (68) cryopreserved serum samples were collected from individuals with acute febrile illness enrolled in a prospective cohort study from May 2015 to May 2017 established in Recife, Brazil as part of the ‘International Research Consortium on Dengue Risk Assessment, Management, and Surveillance’ – IDAMS (ethics committee protocol number: 15580013.5.1001.5534).^{48–50} The age of the individuals from whom serum samples were collected ranged from 9 to 57 years. Sample collection was performed on the first day of recruitment (day 1 – acute sample), corresponding to the period within the first 72 hours of the febrile phase, and during the convalescent phase (days 10–30 after recruitment – convalescent sample). Furthermore, 35 NeuroZIKV patients enrolled in the prospective cohort study ‘Immunopathology of Dengue infection: viral and host genetic determinants associated to Dengue pathology’ – PRONEX (ethics committee protocol number: 0009.0.095.000-11) were identified around day 1–14 after the onset of neurological symptoms. Nine of the selected samples were collected after this period, between day 60 and 180 after the onset of neurological symptoms. All samples were classified as convalescent samples, according to clinical and serological data. Moreover, 23 cryopreserved serum samples were obtained from subjects enrolled in the clinical cohort ‘Prospective study for identification of clinical signs, virological and immunological factors that are predictive of severe Dengue’ – severe dengue (ethics committee protocol number: 28309414.9.3001.5201) established in the Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Recife, Brazil. Additionally, 21 paired samples from mothers who delivered babies with microcephaly and their progeny were obtained from subjects enrolled in the cohort study ‘Neurological manifestations associated to Zika virus’ (ethics committee protocol number: 51106115.8.0000.5190) established in the Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Recife, Brazil. We also included naïve serum samples collected from European donors who had never travelled to tropical areas or who had visited Brazil for the first time. The characteristics of the patients are shown in ESI† Tables S1 and S2, while detailed information for each individual NeuroZIKV sample is described on the ESI† Table S3. Detailed description of the paired samples from mothers who delivered babies with ZIKV-associated microcephaly and their progeny is provided on ESI† Table S4.

Ethics statement

The human serum samples for this research were collected within the context of the following research projects at FIOCRUZ Recife: ‘International Research Consortium on Dengue Risk Assessment, Management, and Surveillance’ – IDAMS, ‘Immunopathology of Dengue infection: viral and host genetic determinants associated to Dengue pathology’ –

PRONEX, ‘Prospective study for identification of clinical signs, virological and immunological factors that are predictive of severe Dengue’ and ‘Neurological manifestations associated to Zika virus’. All experiments were performed in accordance with the Guidelines of Helsinki Declaration, and Experiments were approved by the ethics committee at FIOCRUZ Recife under the protocol numbers 15580013.5.1001.5534, 0009.0.095.000-11, 28309414.9.3001.5201, and 51106115.8.0000.5190, respectively. Informed consents were obtained from human participants of all the studies mentioned above.

Diagnostic testing of participants

All serum samples were tested following the procedures described above. Samples that, according to the molecular, serological and PRNT tests, were positive only for ZIKV were classified as ZIKV+/DENV–, while samples negative for all ZIKV tests and positive for at least one DENV serotype were classified as ZIKV–/DENV+. Samples that were negative for all tested viruses were classified as ZIKV–/DENV–. All patients were either DENV-confirmed or ZIKV-confirmed, or both. For molecular viral diagnosis, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) for DENV and ZIKV was performed following modified previously reported protocols.^{16,51} As for serology, samples were assayed for anti-DENV IgM and IgG (Panbio Dengue Capture ELISA) and anti-ZIKV IgM (MAC-ELISA, Centers for Disease Control and Prevention [CDC])⁵² through ELISA. Additionally, all samples were re-tested by indirect DENV ELISA and plaque reduction neutralization test (PRNT) for ZIKV as well as for each of the four DENV serotypes (DENV1–4) to rule out the possibility of undetected previous DENV exposure. Within the context of Northeast Brazil, most adults had previously been exposed to DENV, with seroprevalence rates ranging between 74.3% and 91.1%, also depending on socio-economic strata.¹³ According to the assay results, each sample was classified as: (1) ZIKV+/DENV– if positive for ZIKV qRT-PCR and negative for DENV qRT-PCR in the acute phase and/or positive for anti-ZIKV IgM with titers >2 times those for anti-DENV IgM in the convalescent phase in the MAC-ELISA, and negative for anti-DENV IgG in the acute phase in the Panbio assay; (2) ZIKV–/DENV– if negative for DENV and ZIKV qRT-PCRs in the acute phase, negative for anti-DENV and anti-ZIKV IgM in the acute phase in MAC-ELISA, and negative for anti-DENV IgG in both acute and convalescent phases in the Panbio assay.⁵⁰ The Panbio Dengue IgG Indirect ELISA was only performed for the adults and control subgroups. The assessment of virus-specific neutralizing antibodies was performed by PRNT.⁵⁰ Briefly, PRNT assays were performed in Vero cells with locally isolated DENV1–4 and ZIKV strains. PRNT positivity was calculated based on a 50% reduction in plaque counts (PRNT₅₀). Samples were considered positive when neutralizing antibody levels were ≥1:100 for ZIKV and ≥1:20 against at least one DENV serotype. Specific antibody titers for ZIKV and DENV were estimated using a four-parameter

non-linear regression model. Acute and convalescent samples were assessed in parallel, and a convalescent/acute titer ratio >4 indicated acute infection. Important to note that all of the NeuroZIKV samples used in this study has presented anti-ZIKV IgG positive results through ZIKV IgG ELISA and ZIKV PRNT.

Peptide array technology

Whole proteomes of 15 different ZIKV strains were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database and translated into overlapping 15-mer peptides (with a peptide–peptide overlap of 12 for DENV and 14 for ZIKV). The accession codes for the ZIKV proteomes from the NCBI were: ZikaUgandaStrainMR766-NIID, ZikaUgandaStrainMR766, ZikaChinaStrainVE_Ganxian, ZikaPhilStrainCPC-0740, ZikaThaiStrainSV0127-14, ZikaChinaStrainZJ03, ZikaHaitiStrain1225/2014, ZikaBrazilStrainSPH2015, ZikaBrazilStrainNatalRGN, ZikaDomRepStrainPD2, ZikaDomRepStrainPD1, ZikaChinaStrainGD01, ZikaBrazilStrainZKV2015, ZikaBrazilStrainSSABR1, and ZikaPuertoRicoStrainPRVABC59. The peptide sequences were aligned, duplicates deleted, and produced as high-density peptide arrays. In addition to that, a c-myc peptide (EQKLISEEDL) and a peptide derived from poliovirus (KEVPALTAVETGAT, reacts with serum due to comprehensive vaccination) were included as controls.

The arrays were generated in a laser-printer-based approach by PEPperPRINT GmbH (Heidelberg, Germany). Twenty different amino acid particle types were selectively deposited as spots on a glass slide coated with a poly(ethylene glycol) methacrylate/poly(methyl methacrylate) graft copolymer functionalized with a β Ala-Asp- β Ala linker, with each particle type embedding a different amino acid. When a layer of all twenty different particle types was completed, the particles were melted at 90 °C, releasing the amino acids containing Fmoc-amino acid pentafluorophenyl esters that coupled to reactive groups on the functionalized glass slide. Following Merrifield's principle of orthogonal peptide synthesis, excess material was washed away, and the particle-deposition process was repeated.³² In the end, each spot on the glass slide featured a different peptide with a freely chosen sequence.

Immunostaining of peptide arrays

Peptide microarrays were placed in incubation trays (PEPperPRINT GmbH; Heidelberg, Germany) and blocked for 30 minutes at room temperature under orbital shaking (140 rotations per minute [rpm]) with blocking buffer MB-070 (Rockland). Human sera were then diluted to 1:1000 in assay buffer (10% Rockland blocking buffer in phosphate-buffered saline (PBS), 0.05% Tween 20, pH 7.4) and incubated for 16 hours at 4 °C under orbital shaking (140 rpm). Peptide microarrays were washed three times with PBS supplemented with 0.05% Tween 20 (PBS-T), followed by incubation with the detection antibodies, goat anti-human IgG Fc specific

DyLight 680 conjugated and goat anti-human IgM antibody DyLight 800 conjugated, diluted to 1:2500 and 1:5000, respectively in assay buffer (PBS-T with 10% Rockland blocking buffer), along with a 1:150 dilution of the control antibody (anti-c-myc antibody, PEPperPRINT, Germany), for one hour at room temperature under orbital shaking (140 rpm). No specific antibodies were added to interact with the poliovirus peptide control spots, since poliovirus vaccination in Brazil has been established across the country. The peptide microarrays were washed three times with PBS-T and rinsed with deionized water. After drying in a stream of air, fluorescence images were acquired using an Odyssey Imaging System (LICOR) at 700 and 800 nm, with a resolution of 21 μ m and a scanning sensitivity of 7. Image analysis and quantification were performed with the PepSlide Analyzer software (Sicasys Software GmbH; Heidelberg, Germany). Background fluorescence was determined as the fluorescence measured when only the secondary antibodies anti-IgG DyLight 680 (1:2500) and anti-IgM DyLight 800 (1:5000) were added.

Statistical analysis

In the present work, multivariate analysis models were built to verify statistical differences among fluorescence intensities of patient groups. Before building multivariate models, pre-processing techniques were employed to correct unwanted variation inherent to the measurement. The data set was pre-processed using normalization to the maximum value of each patient for all variables (peptide fluorescence signals), baseline correction (Automatic Whittaker Filter with asymmetry of 0.001 and lambda of 100) and mean center. Multivariate data analyses were carried out with the IgG ZIKV data set in two forms. Initially, the exploratory analysis technique principal component analysis (PCA)⁵³ was employed to visualize data variance in a space of reduced dimensionality. Afterwards, a classification technique based on partial least squares discriminant analysis (PLS-DA)⁵⁴ was performed and the variable importance in projection (VIP scores) plots were employed to evaluate the most important NS2b peptides to discriminate between patients according their clinical outcomes. Due the small number of samples available and to include maximum variability to the model, leave-one-out cross-validation method was employed to validate and determine model complexity based on the true positive rate (or sensitivity (Sn)) and the true negative rate (or specificity (Sp)). All statistical analyses were performed in PLS_Toolbox 8.6 (Eigenvector Research Inc., USA) in MATLAB environment.

Engineering an antigen containing the ns2b epitope

The native motif of the NS2B epitope was retrieved from the crystallographic structure deposited in the Protein Data Bank (PDB ID: 5H6V).³⁵ The epitope was transplanted, *in silico*, to a carrier protein (scaffold), in order to maximize its exposure on its native conformation. This procedure was performed

using the MotifGraft tool⁵⁵ present in the Rosetta v3.10 software.^{56,57} First, a library of scaffold proteins, composed by 1250 crystallographic structures, was assembled according to criteria described by Silva *et al.*⁵⁵ Then, the NS2B motif was structurally aligned to all proteins in the library aiming to determine which is the best carrier and region for transplantation. To accept an alignment, the root mean-square deviation (RMSD) between the backbone of the epitope and the scaffold protein should be lower or equal to 2.5 Å. The epitope side-chains are transplanted to the scaffold protein if the alignment criterion is met. After transplantation, the carrier protein is redesigned within a 10 Å radius around the epitope intending to increase favorable interactions and ensure the folding of the new protein. In order to allow only mutations that will result in a total stabilizing effect, a position-specific substitution matrix (PSSM) was used,⁵⁸ according to instructions described by Goldenzweig *et al.*⁵⁹ PSSM represents the logarithmic probability of looking any of the 20 possible amino acids in each position. Mutations for the most frequently observed amino acids generally increase protein stability (the consensus effect), whereas mutations never previously identified in natural diversity tend to decrease stability.^{59–62} During the redesign process, combinatorial sequence optimization is carried out, with four iterations of sequence design, each one followed by side-chain and backbone minimization. At the end, the lowest energy structure is obtained according to the REF2015 energy function of the Rosetta.⁶³

Computational characterization of structural and thermodynamic properties of the identified NS2B peptide and the designed NS2B-grafted antigen

Initial coordinates for the NS2B-based peptide were taken from the crystal structure of the NS2B–NS3 complex (PDB ID 5H6V) and centered into a cubic box of dimensions 8.0 × 8.0 × 8.0 nm. For the modeled antigen carrying the NS2B epitope, the coordinates were taken from the lowest energy decoy from Rosetta design protocol and centered in a box of dimensions 12 × 12 × 12 nm. All simulations were carried out by explicitly solvating the biomolecules using the SPC water model.⁶⁴ Periodic boundary conditions were used in the *x*, *y* and *z* directions. Molecular dynamics simulation was carried out using the NPT ensemble, and all atomistic simulations were performed for 1 μs using the GROMOS 53A6 force field.⁶⁵ The LINCS method was used to constrain all bonds.⁶⁶ Solute and solvent temperatures were separately coupled to a thermostat using the velocity rescaling scheme⁶⁷ with a reference temperature of 310 K and a relaxation time of 0.2 ps. Pressure was kept constant at 1.013 bar by isotropic coordinate scaling using the Berendsen barostat⁶⁸ with a relaxation time of 0.2 ps and compressibility (κ_T) of 4.5×10^{-5} per bar. A short-range cut-off radius of 1.4 nm was used for all non-bonded interactions. Long-range electrostatic interactions were taken into account using the reaction field

method⁶⁹ with $\epsilon = 66$ beyond the cut-off radius of 1.4 nm. Counter ions were added to ensure a neutral system net charge and a salt concentration of 0.150 mM. The systems were first energy-optimised using 5000 steps of the steepest descent algorithm. Integration was carried out using an integration time step of 2 fs based on the leapfrog algorithm.⁷⁰ System thermalization was carried out in NVT ensemble for 100 ps, followed by a pressure equilibration in an NPT ensemble for 500 ps. All equilibration steps were performed with position constraints for all atoms. All simulations and analyses were performed using the GROMACS 4.6.5 simulation package.⁷¹ The most representative conformer of each simulated biomolecule was selected by structural clustering analysis. The clusters were obtained using the GROMOS method⁷² implemented in the *g_cluster* GROMACS tool. A cut-off of 0.2 nm was used for calculating the root-mean-square deviations (RMSD) of superimposed backbone and β -carbon atoms. For the peptide only the last 550 ns period of the trajectory was used for clustering, whereas for the modeled antigen containing the NS2B epitope the last 75 ns was used. Visual analyses were carried out using the Visual Molecular Dynamics (VMD) software version 1.8.7.⁷³

Circular dichroism

The NS2B peptide was diluted in acetate buffer (0.5 mg mL⁻¹) to the concentration of 60 μM. Circular dichroism data were collected on an Olis DSM17 Spectrometer. Scans were recorded in a 0.1 cm path length. Circular dichroism scans were carried out from 260 to 190 nm with 5 seconds averaging times, 1 nm step size, and 2 nm bandwidth at 25 °C. Spectra were corrected for a buffer blank and baseline molar ellipticity at 260 nm. Scan data were smoothed by the Stavitsky–Golay method.

Detection of anti-NS2B IgG antibodies through ELISA

The DNA sequence coding for the engineered NS2B-grafted protein was optimized for enhanced expression in prokaryotic systems, cloned into the pET14b (Novagen) expression vector and produced as a 6His-N-terminally tagged protein. The recombinant protein was purified by automated affinity chromatography followed by a size exclusion chromatography. High binding, half area 96-well polystyrene plates (Costar; Lowell, MA, USA) were coated overnight at 4 °C with 1 μg mL⁻¹ of the recombinant protein diluted in 0.2 M carbonate/bicarbonate buffer (Pierce, IL, USA). Plates were blocked with skimmed milk (Bio-Rad) at 5% (w/v) in PBS-T buffer [1× PBS with 0.05% (v/v) Tween 20] for 15 minutes at room temperature. Serum samples were diluted (1:50) in assay buffer [5% (w/v) skimmed milk in PBS-T] and added to plates. All samples were incubated for 2 hours at room temperature. Plates were washed five times with PBS-T, followed by incubation with the horseradish peroxidase (HRP)-linked antibody against total IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:30 000 dilution) diluted in assay buffer

for 1 hour at room temperature. After a second wash step, the reaction was developed by the addition of tetramethylbenzidine TMB-KPL substrate (Pierce, IL, USA) for 30 minutes at room temperature, followed by 1N HCl. Optical densities at a wavelength of 450 nm (OD_{450nm}) were read using a microplate spectrophotometer (BioTek; Winooski, VT, USA). A subset of ZIKV positive and *Flavivirus* naïve sera were used as positive and negative controls, respectively. The controls were run in each plate and used to determine the reproducibility of the assay.

Conclusions

We screened well-characterized serum samples from ZIKV-infected individuals in the Northeastern region of Brazil using high-density peptide arrays displaying the whole proteome of ZIKV. One linear epitope (composed of four adjacent and partially overlapping peptide sequences) from the ZIKV NS2B protein was identified as a ZIKV-specific sequence. We found that ZIKV infections elicited high-affinity IgG antibody response against the identified epitope especially in non-severe ZIKV cases, although previous DENV infections may elicit cross-reactive IgG response against the identified epitope, when presented as a peptide.

Furthermore, our data analysis has shown that a decreased antibody response to this epitope was associated with severe neurological manifestations after ZIKV infection (NeuroZIKV) compared with uncomplicated ZIKV infections. Interestingly, unlike what was observed in the uncomplicated ZIKV cases, where the IgG antibody response did not show any significant difference regardless of DENV background, the NeuroZIKV samples from patients previously infected with Dengue (NeuroZIKV/DENV+) showed higher IgG antibody responses against NS2B when compared to NeuroZIKV/DENV- samples. Nevertheless, even though our data indicates that DENV infection also induces cross-reactive IgG antibodies against the NS2B epitope, the global classification model highlighted the important contribution of peptides containing the amino acid sequence KDAEV(I) TGNS. Therefore, the IgG antibody response towards this sequence itself is capable to discriminate between the non-severe ZIKV and NeuroZIKV infection, regardless of their DENV history, with sensitivity and specificity rates of 79% and 85%, respectively. This finding might suggest that antibody response towards the identified epitope plays a protective role in the development of ZIKV-associated neurological phenotype and might indicate that future vaccine approaches would benefit from adding this sequence in the antigen formulation. Additional studies are also required to assess if the absence of IgG response during other *Flavivirus* infections (*e.g.*, Dengue and West Nile viruses) would be linked to the development of severe phenotypes.

Our computational and CD analysis for the NS2B peptide in solution indicate that conformational flexibility as the limiting factor for an unambiguously discrimination of

NeuroZIKV patients, as this leads to a lower affinity by specific ZIKV antibodies as well as cross-reaction with non-specific DENV antibodies. Nevertheless, based on the native peptide motif, we designed a synthetic protein that mimics the natural structure of the NS2B epitope. Using this new NS2B-based antigen in an ELISA assay, we have shown that synthetic protein containing the NS2B epitope can be used as a molecular marker for discrimination between severe and non-severe ZIKV clinical phenotypes.

Author contributions

TJ, ETAM, RDL, IFTV and FFL designed the study. FFL and NF performed the peptide microarrays. DFC performed protein engineering and MD simulations. CSS and RDC performed detailed statistical analysis in the entire data set. IFTV and AFP produced the engineered protein and performed the CD measurements. IFTV, CMCSA and BHSL performed the MST and ELISA experiments. MTC, TM and CNLM provided the serum samples. IFTV, RDL and DFC wrote the manuscript with the input from all authors.

Conflicts of interest

A patent application for the epitope has been filed by TJ, NF, FFL, TM, and ETA. A patent application for the engineered protein carrying the identified NS2B epitope has been filed by RDL, DFC and IFTV. Otherwise, the authors have declared that they have no competing interests.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the German Research Foundation (DFG) *via* the Heidelberg Karlsruhe Research Partnership (HEiKA to TJ and FFL), the European Commission (IDAMS FP7 281803, ZIKAlliance H2020 734548), the German Centre for Infection Research (DZIF), Heidelberg Site, CuraZika Foundation, FACEPE, NUQAAPPE, CAPES, CNPq, INCT-FCx, FAPESP (2019/01255-9) and the German Federal Ministry of Education and Research (NanoMatFutur grant 13XP5050A). Computer allocation was partly granted by the Brazilian National Scientific Computing Center (LNCC). The company PEPPERPRINT based in Heidelberg supported the design and printing of the peptide microarrays. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Notes and references

- 1 N. R. Faria, R. Azevedo, M. U. G. Kraemer, R. Souza, M. S. Cunha, S. C. Hill, J. Theze, M. B. Bonsall, T. A. Bowden, I. Rissanen, I. M. Rocco, J. S. Nogueira, A. Y. Maeda, F. Vasami, F. L. L. Macedo, A. Suzuki, S. G. Rodrigues, A. C. R. Cruz, B. T. Nunes, D. B. A. Medeiros, D. S. G. Rodrigues, A. L. N. Queiroz, E. V. P. da Silva, D. F. Henriques, E. S. T. da Rosa, C. S. de Oliveira, L. C. Martins, H. B. Vasconcelos, L. M. N. Casseb, D. B. Simith, J. P. Messina, L. Abade, J. Lourenco,

- L. C. J. Alcantara, M. M. de Lima, M. Giovanetti, S. I. Hay, R. S. de Oliveira, P. D. S. Lemos, L. F. de Oliveira, C. P. S. de Lima, S. P. da Silva, J. M. de Vasconcelos, L. Franco, J. F. Cardoso, J. Vianez-Junior, D. Mir, G. Bello, E. Delatorre, K. Khan, M. Creatore, G. E. Coelho, W. K. de Oliveira, R. Tesh, O. G. Pybus, M. R. T. Nunes and P. F. C. Vasconcelos, *Science*, 2016, **352**, 345.
- 2 C. Brito, *Acta Med. Port.*, 2015, **28**, 679.
 - 3 L. Schuler-Faccini, E. M. Ribeiro, I. M. Feitosa, D. D. Horovitz, D. P. Cavalcanti, A. Pessoa, M. J. Doriqui, J. I. Neri, J. M. Neto, H. Y. Wanderley, M. Cernach, A. S. El-Husny, M. V. Pone, C. L. Serao, M. T. Sanseverino and F. Brazilian Medical Genetics Society-Zika Embryopathy Task, *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2016, **65**, 59.
 - 4 D. L. Heymann, A. Hodgson, A. A. Sall, D. O. Freedman, J. E. Staples, F. Althabe, K. Baruah, G. Mahmud, N. Kandun, P. F. Vasconcelos, S. Bino and K. U. Menon, *Lancet*, 2016, **387**, 719.
 - 5 WHO, *Zika Causality Statement*, <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/causality/en/>, (accessed 26.03.2019, 2019).
 - 6 F. Krauer, M. Riesen, L. Reveiz, O. T. Oladapo, R. Martinez-Vega, T. V. Porgo, A. Haeffliger, N. J. Broutet, N. Low and WHO Zika Causality Working Group, *PLOS Med.*, 2017, **14**, e1002203.
 - 7 T. V. B. de Araújo, R. A. de Alencar Ximenes, D. de Barros Miranda-Filho, W. V. Souza, U. R. Montarroyos, A. P. L. de Melo, S. Valongueiro, M. de F. P. M. de Albuquerque, C. Braga, S. P. B. Filho, M. T. Cordeiro, E. Vazquez, D. di Cavalcanti Souza Cruz, C. M. P. Henriques, L. C. A. Bezerra, P. M. da Silva Castanha, R. Dhalia, E. T. A. Marques-Júnior, C. M. T. Martelli and L. C. Rodrigues, *Lancet Infect. Dis.*, 2017, **18**, 328.
 - 8 E. Dirlikov, J. V. Torres, R. B. Martines, S. Reagan-Steiner, G. V. Perez, A. Rivera, C. Major, D. Matos, J. Munoz-Jordan, W. J. Shieh, S. R. Zaki and T. M. Sharp, *Emerging Infect. Dis.*, 2018, **24**, 114.
 - 9 K. Dinnon, E. Gallichotte, E. Fritch, V. Menachery and R. Baric, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2019, **13**, e0007212.
 - 10 C. R. Fontes-Garfias, C. Shan, H. Luo, A. E. Muruato, D. B. A. Medeiros, E. Mays, X. Xie, J. Zou, C. M. Roundy, M. Wakamiya, S. L. Rossi, T. Wang, S. C. Weaver and P. Y. Shi, *Cell Rep.*, 2017, **21**, 1180.
 - 11 L. Yuan, X. Y. Huang, Z. Y. Liu, F. Zhang, X. L. Zhu, J. Y. Yu, X. Ji, Y. P. Xu, G. Li, C. Li, H. J. Wang, Y. Q. Deng, M. Wu, M. L. Cheng, Q. Ye, D. Y. Xie, X. F. Li, X. Wang, W. Shi, B. Hu, P. Y. Shi, Z. Xu and C. F. Qin, *Science*, 2017, **358**, 933.
 - 12 P. M. S. Castanha, E. J. M. Nascimento, C. Braga, M. T. Cordeiro, O. V. de Carvalho, L. R. de Mendonca, E. A. N. Azevedo, R. F. O. Franca, R. Dhalia and E. T. A. Marques, *J. Infect. Dis.*, 2017, **215**, 781.
 - 13 C. Braga, C. F. Luna, C. M. Martelli, W. V. de Souza, M. T. Cordeiro, N. Alexander, F. de Albuquerque Mde, J. C. Junior and E. T. Marques, *Acta Trop.*, 2010, **113**, 234.
 - 14 M. R. Duffy, T. H. Chen, W. T. Hancock, A. M. Powers, J. L. Kool, R. S. Lanciotti, M. Pretrick, M. Marfel, S. Holzbauer, C. Dubray, L. Guillaumot, A. Griggs, M. Bel, A. J. Lambert, J. Laven, O. Kosoy, A. Panella, B. J. Biggerstaff, M. Fischer and E. B. Hayes, *N. Engl. J. Med.*, 2009, **360**, 2536.
 - 15 R. Buathong, L. Hermann, B. Thaisomboonsuk, W. Rutvisuttinunt, C. Klungthong, P. Chinnawirotpisan, W. Manasatienkij, A. Nisalak, S. Fernandez, I. K. Yoon, P. Akrasewi and T. Plipat, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2015, **93**, 380.
 - 16 R. S. Lanciotti, O. L. Kosoy, J. J. Laven, J. O. Velez, A. J. Lambert, A. J. Johnson, S. M. Stanfield and M. R. Duffy, *Emerging Infect. Dis.*, 2008, **14**, 1232.
 - 17 I. Rodriguez-Barraquer, F. Costa, E. J. M. Nascimento, N. J. Nery, P. M. S. Castanha, G. A. Sacramento, J. Cruz, M. Carvalho, D. De Olivera, J. E. Hagan, H. Adhikarla, E. A. Wunder, Jr., D. F. Coelho, S. R. Azar, S. L. Rossi, N. Vasilakis, S. C. Weaver, G. S. Ribeiro, A. Balmaseda, E. Harris, M. L. Nogueira, M. G. Reis, E. T. A. Marques, D. A. T. Cummings and A. I. Ko, *Science*, 2019, **363**, 607.
 - 18 W. Dejnirattisai, P. Supasa, W. Wongwiwat, A. Rouvinski, G. Barba-Spaeth, T. Duangchinda, A. Sakuntabhai, V. M. Cao-Lormeau, P. Malasit, F. A. Rey, J. Mongkolsapaya and G. R. Screaton, *Nat. Immunol.*, 2016, **17**, 1102.
 - 19 L. Priyamvada, K. M. Quicke, W. H. Hudson, N. Onlamoon, J. Sewatanon, S. Edupuganti, K. Pattanapanyasat, K. Chokephaibulkit, M. J. Mulligan, P. C. Wilson, R. Ahmed, M. S. Suthar and J. Wrammert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2016, **113**, 7852.
 - 20 J. A. Muller, M. Harms, A. Schubert, B. Mayer, S. Jansen, J. P. Herbeuval, D. Michel, T. Mertens, O. Vapalahti, J. Schmidt-Chanasit and J. Munch, *Med. Microbiol. Immunol.*, 2017, **206**, 175.
 - 21 A. Sharma and S. K. Lal, *Front. Microbiol.*, 2017, **8**, 110.
 - 22 A. Sakudo, A. Viswan, H. Chou, T. Sasaki, K. Ikuta and M. Nagatsu, *Mol. Med. Rep.*, 2016, **14**, 697.
 - 23 M. Sanchez-Purra, M. Carre-Camps, H. de Puig, I. Bosch, L. Gehrke and K. Hamad-Schifferli, *ACS Infect. Dis.*, 2017, **3**, 767.
 - 24 D. Focosi, F. Maggi and M. Pistello, *Clin. Infect. Dis.*, 2016, **63**, 227.
 - 25 A. Chua, I. Prat, C. M. Nuebling, D. Wood and F. Moussy, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2017, **11**, e0005269.
 - 26 F. Breitling, A. Nesterov, V. Stadler, T. Felgenhauer and F. R. Bischoff, *Mol. Biosyst.*, 2009, **5**, 224.
 - 27 C. Katz, L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger, T. Rito, S. G. D. Rudiger and A. Friedler, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2131.
 - 28 F. F. Loeffler, J. Pfeil and K. Heiss, *Methods Mol. Biol.*, 2016, **1403**, 569.
 - 29 M. C. L. C. Freire, L. Pol-Fachin, D. F. Coêlho, I. F. T. Viana, T. Magalhães, M. T. Cordeiro, N. Fischer, F. F. Loeffler, T. Jaenisch, R. F. Franca, E. T. A. Marques and R. D. Lins, *ACS Omega*, 2017, **2**, 3913.
 - 30 L. K. Weber, A. Palermo, J. Kugler, O. Armant, A. Isse, S. Rentschler, T. Jaenisch, J. Hubbuch, S. Dubel, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling and F. F. Loeffler, *J. Immunol. Methods*, 2017, **443**, 45.

- 31 L. K. Weber, A. Isse, S. Rentschler, R. E. Kneusel, A. Palermo, J. Hubbuch, A. Nesterov-Mueller, F. Breitling and F. F. Loeffler, *Eng. Life Sci.*, 2017, **17**, 1078.
- 32 V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Guttler, M. Groning, K. Konig, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff and F. Breitling, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 7132.
- 33 F. F. Loeffler, T. C. Foertsch, R. Popov, D. S. Mattes, M. Schlageter, M. Sedlmayr, B. Ridder, F. X. Dang, C. von Bojnicic-Kninski, L. K. Weber, A. Fischer, J. Greifenstein, V. Bykovskaya, I. Buliev, F. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. Meier, S. Brase, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling and A. Nesterov-Mueller, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 11844.
- 34 P. M. Castanha, M. T. Cordeiro, C. M. Martelli, W. V. Souza, E. T. Marques, Jr. and C. Braga, *Epidemiol. Infect.*, 2013, **141**, 1080.
- 35 Y. Li, Z. Zhang, W. W. Phoo, Y. R. Loh, W. Wang, S. Liu, M. W. Chen, A. W. Hung, T. H. Keller, D. Luo and C. Kang, *Structure*, 2017, **25**, 1242.
- 36 A. Roy, L. Lim, S. Srivastava, Y. Lu and J. Song, *PLoS One*, 2017, **12**, e0180632.
- 37 Z. Zhang, Y. Li, Y. R. Loh, W. W. Phoo, A. W. Hung, C. Kang and D. Luo, *Science*, 2016, **354**, 1597.
- 38 W. W. Phoo, Y. Li, Z. Zhang, M. Y. Lee, Y. R. Loh, Y. B. Tan, E. Y. Ng, J. Lescar, C. Kang and D. Luo, *Nat. Commun.*, 2016, **7**, 13410.
- 39 N. Mishra, A. Caciula, A. Price, R. Thakkar, J. Ng, L. V. Chauhan, K. Jain, X. Che, D. A. Espinosa, M. Montoya Cruz, A. Balmaseda, E. H. Sullivan, J. J. Patel, R. G. Jarman, J. L. Rakeman, C. T. Egan, C. Reusken, M. P. G. Koopmans, E. Harris, R. Tokarz, T. Briese and W. I. Lipkin, *MBio*, 2018, **9**(2), e00095-18.
- 40 D. H. Sachs, A. N. Schechter, A. Eastlake and C. B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1972, **69**, 3790.
- 41 A. Datta-Mannan, A. Thangaraju, D. Leung, Y. Tang, D. R. Witcher, J. Lu and V. J. Wroblewski, *mAbs*, 2015, **7**, 483.
- 42 I. F. T. Viana, T. A. Soares, L. F. O. Lima, E. T. A. Marques, M. A. Krieger, R. Dhalia and R. D. Lins, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 11790.
- 43 V. Uversky and S. Longhi, *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation*, Wiley, 2011.
- 44 A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers and J. Kardos, *Nucleic Acids Res.*, 2018, **46**, W315.
- 45 C. Wiedemann, P. Bellstedt and M. Görlach, *Bioinformatics*, 2013, **29**, 1750.
- 46 A. Glättli, X. Daura, D. Seebach and W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12972.
- 47 G. Wang, R. Guo, M. Bartlam, H. Yang, H. Xue, Y. Liu, L. Huang and Z. Rao, *Protein Sci.*, 2003, **12**, 2815.
- 48 T. Jaenisch, A. Sakuntabhai and A. Wilder-Smith, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2013, **7**, e2320.
- 49 T. Jaenisch, D. T. Tam, N. T. Kieu, T. Van Ngoc, N. T. Nam, N. Van Kinh, S. Yacoub, N. Chanpheaktra, V. Kumar, L. L. See, J. Sathar, E. P. Sandoval, G. M. Alfaro, I. S. Laksono, Y. Mahendradhata, M. Sarker, F. Ahmed, A. Caprara, B. S. Benevides, E. T. Marques, T. Magalhaes, P. Brasil, M. Netto, A. Tami, S. E. Bethencourt, M. Guzman, C. Simmons, N. T. Quyen, L. Merson, N. T. Dung, D. Beck, M. Wirths, M. Wolbers, P. K. Lam, K. Rosenberger and B. Wills, *BMC Infect. Dis.*, 2016, **16**, 120.
- 50 T. Magalhaes, C. Braga, M. T. Cordeiro, A. L. S. Oliveira, P. M. S. Castanha, A. P. R. Maciel, N. M. L. Amancio, P. N. Gouveia, V. J. Peixoto-da-Silva, Jr., T. F. L. Peixoto, H. Britto, P. V. Lima, A. R. S. Lima, K. D. Rosenberger, T. Jaenisch and E. T. A. Marques, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2017, **11**, e0006055.
- 51 R. S. Lanciotti, O. L. Kosoy, J. J. Laven, A. J. Panella, J. O. Velez, A. J. Lambert and G. L. Campbell, *Emerging Infect. Dis.*, 2007, **13**, 764.
- 52 M. T. Cordeiro, C. A. Brito, L. J. Pena, P. M. Castanha, L. H. Gil, K. G. Lopes, R. Dhalia, J. A. Meneses, A. C. Ishigami, L. M. Mello, L. X. Alencar, K. M. Guarines, L. C. Rodrigues and E. T. Marques, *J. Infect. Dis.*, 2016, **214**, 1897.
- 53 R. Bro and A. K. Smilde, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 2812.
- 54 R. G. Brereton and G. R. Lloyd, *J. Chemom.*, 2014, **28**, 213.
- 55 D.-A. Silva, B. E. Correia and E. Procko, in *Computational Design of Ligand Binding Proteins*, ed. B. L. Stoddard, Springer New York, New York, NY, 2016, p. 285.
- 56 A. Leaver-Fay, M. Tyka, S. M. Lewis, O. F. Lange, J. Thompson, R. Jacak, K. W. Kaufman, P. D. Renfrew, C. A. Smith, W. Sheffler, I. W. Davis, S. Cooper, A. Treuille, D. J. Mandell, F. Richter, Y.-E. A. Ban, S. J. Fleishman, J. E. Corn, D. E. Kim, S. Lyskov, M. Berrondo, S. Mentzer, Z. Popović, J. J. Havranek, J. Karanicolas, R. Das, J. Meiler, T. Kortemme, J. J. Gray, B. Kuhlman, D. Baker and P. Bradley, in *Meth. Enzymol.*, ed. M. L. Johnson and L. Brand, Academic Press, 2011, vol. 487, p. 545.
- 57 S. J. Fleishman, A. Leaver-Fay, J. E. Corn, E.-M. Strauch, S. D. Khare, N. Koga, J. Ashworth, P. Murphy, F. Richter, G. Lemmon, J. Meiler and D. Baker, *PLoS One*, 2011, **6**, e20161.
- 58 S. F. Altschul, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. A. Schäffer and Y.-K. Yu, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **37**, 815.
- 59 A. Goldenzweig, M. Goldsmith, S. E. Hill, O. Gertman, P. Laurino, Y. Ashani, O. Dym, T. Unger, S. Albeck, J. Prilusky, R. L. Lieberman, A. Aharoni, I. Silman, J. L. Sussman, D. S. Tawfik and S. J. Fleishman, *Mol. Cell*, 2016, **63**, 337.
- 60 B. Steipe, B. Schiller, A. Pluckthun and S. Steinbacher, *J. Mol. Biol.*, 1994, **240**, 188.
- 61 T. J. Magliery, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2015, **33**, 161.
- 62 L. G. Nivon, S. Bjelic, C. King and D. Baker, *Proteins*, 2014, **82**, 858.
- 63 R. F. Alford, A. Leaver-Fay, J. R. Jeliakov, M. J. O'Meara, F. P. DiMaio, H. Park, M. V. Shapovalov, P. D. Renfrew, V. K. Mulligan, K. Kappel, J. W. Labonte, M. S. Pacella, R. Bonneau, P. Bradley, R. L. Dunbrack, R. Das, D. Baker, B. Kuhlman, T. Kortemme and J. J. Gray, *J. Chem. Theory Comput.*, 2017, **13**, 3031.

- 64 H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren and J. Hermans, in *Intermolecular Forces*, ed. B. Pullman, Springer Netherlands, 1981, ch. 21, vol. 14, p. 331.
- 65 C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark and W. F. Van Gunsteren, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1656.
- 66 B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen and J. G. E. M. Fraaije, *J. Comput. Chem.*, 1997, **18**, 1463.
- 67 G. Bussi, D. Donadio and M. Parrinello, *J. Chem. Phys.*, 2007, **126**, 014101.
- 68 H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola and J. R. Haak, *J. Chem. Phys.*, 1984, **81**, 3684.
- 69 I. G. Tironi, R. Sperb, P. E. Smith and W. F. van Gunsteren, *J. Chem. Phys.*, 1995, **102**, 5451.
- 70 R. W. Hockney, in *Methods in Computational Physics*, ed. B. Alder, S. Fernbach and M. Rotenberg, Academic Press, New York/London, 1970.
- 71 B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4**, 435.
- 72 X. Daura, B. Oliva, E. Querol, F. X. Aviles and O. Tapia, *Proteins*, 1996, **25**, 89.
- 73 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33.

Differential Frequencies of *HLA-DRB1*, *DQA1*, and *DQB1* Alleles and Haplotypes Are Observed in the Arbovirus-Related Neurological Syndromes

Paulin Sonon,^{1,9} Maria Lúcia Brito Ferreira,² Renata Santos Almeida,¹ Neifi Hassan Saloum Deghaide,³ Glauco Henrique Willcox,⁴ Elizabeth Lima Guimarães,⁴ Antônio Fernando da Purificação Júnior,⁵ Marli Tenório Cordeiro,⁵ Carlos Alexandre Antunes de Brito,⁶ Maria de Fátima Militão de Albuquerque,⁷ Roberto D. Lins,⁵ Eduardo A. Donadi,³ and Norma Lucena-Silva¹

¹Immunology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil, ²Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra, Recife, Pernambuco, Brazil, ³Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil, ⁴Laboratório HLA Diagnóstico, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁵Virology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁶Internal Medicine Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, and ⁷Public Health Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

Background. We took advantage of the 2015–2016 Brazilian arbovirus outbreak (Zika [ZIKV]/dengue/chikungunya viruses) associated with neurological complications to type *HLA-DRB1/DQA1/DQB1* variants in patients exhibiting neurological complications and in bone marrow donors from the same endemic geographical region.

Methods. *DRB1/DQA1/DQB1* loci were typed using sequence-specific oligonucleotides. In silico studies were performed using X-ray resolved dimer constructions.

Results. The *DQA1*01*, *DQA1*05*, *DQB1*02*, or *DQB1*06* genotypes/haplotypes and *DQA1/DQB1* haplotypes that encode the putative *DQA1/DQB1* dimers were overrepresented in the whole group of patients and in patients exhibiting peripheral neurological spectrum disorders (PSD) or encephalitis spectrum disorders (ESD). The *DRB1*04*, *DRB1*13*, and *DQA1*03* allele groups protected against arbovirus neurological manifestation, being underrepresented in whole group of patients and ESD and PSD groups. Genetic and in silico studies revealed that *DQA1/DQB1* dimers (1) were primarily associated with susceptibility to arbovirus infections; (2) can bind to a broad range of ZIKV peptides (235 of 1878 peptides, primarily prM and NS2A); and (3) exhibited hydrophilic and highly positively charged grooves when compared to the *DRA1/DRB1* cleft. The protective dimer (*DRA1/DRB1*04*) bound a limited number of ZIKV peptides (40 of 1878 peptides, primarily prM).

Conclusion. Protective haplotypes may recognize arbovirus peptides more specifically than susceptible haplotypes.

Keywords. *HLA-DRB1*; *HLA-DQA1*; *HLA-DQB1*; ZIKV; DENV; CHIKV; Brazil.

Arbovirus infections are primarily transmitted by mosquito-borne viruses. In Brazil, the *Aedes aegypti* mosquito is responsible for the transmission of dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) viruses [1]. In 2015–2016, a unique outbreak encompassing ZIKV, CHIKV, and the endemic DENV caused severe neurological complications primarily observed in infants producing an encephaly [2, 3], and among adults causing several types of neurological disorders, particularly peripheral neurological spectrum disorders (PSD) and encephalitis spectrum disorders (ESD) [3, 4].

Arbovirus gene variability may contribute to mosquito virus adaptation, enhancing infectivity, pathogenicity, fitness, and host transmissibility. In particular, residue exchange in structural or nonstructural (NS) viral proteins [5], including mutations of the NS1 (ZIKV, DENV) and envelope E-1/E-2 (CHIKV) proteins, contribute to virus adaptation to the vectors, facilitating rapid transmission [6]. In addition, a subgenomic flaviviral RNA fragment of DENV-2, which is important for viral replication, may accumulate in the mosquito salivary gland, enhancing virus transmission to the host [7].

Single nucleotide variations in human genes responsible for innate immunity have been associated with susceptibility to or severity of arboviral infections. For instance, mutations at *IFNA* [8], *TLR* (Toll-like receptors) [9], and other genes important for immune response [5] have been associated with severe arbovirus infections. Regarding adaptive immunity, histocompatibility genes are remarkably variable, encoding molecules that play a major role in virus peptide presentation as well as in virus elimination. HLA class I and II genes have been evaluated in dengue and chikungunya infections [10–13] but have not been evaluated in Zika infection.

Received 3 September 2020; editorial decision 8 December 2020; accepted 11 December 2020; published online December 15, 2020.

Correspondence: Norma Lucena-Silva, PhD, MD, Immunogenetic Laboratory, Immunology Department, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Moraes rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50670420, Recife, PE, Brazil (nlucena@cpcqam.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases® 2021;224:517–25

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiaa764

The heterodimers encoded by HLA class II genes (*DPA1/B1*, *DQA1/B1*, and *DRA1/B1*) are primarily involved in antigen presentation to CD4 T cells and exhibit folded α and β chains that form the peptide binding groove. In contrast to the *DRA1* chain that presents negligible residue variation, the other HLA class II α and β chains are highly variable, primarily at the peptide binding groove, as an adaptation to recognize pathogen-derived antigens to be presented to T-cell receptors. *HLA-DQA1* alleles have been associated with susceptibility to flavivirus infections in Greek and Brazilian patients [12, 14]. The *HLA-DQB1*03:02* and *DQB1*02:02* genotypes are associated with dengue hemorrhagic fever and dengue fever, respectively [11]. *HLA-A*31* and *HLA-DRB1*08* allele groups conferred risk to dengue shock syndrome during the secondary infection, while patients with the *HLA-A*24* and *HLA-DRB1*12* allele groups are susceptible to dengue hemorrhagic fever during the primary dengue infection [15].

We took advantage of the 2015–2016 arbovirus outbreak that occurred in the northeastern state of Pernambuco to (1) follow up patients exhibiting neurological complications for at least 2 years; (2) type *HLA-DQA1/DQB1/DRB1* allele groups, genotypes, and haplotypes; and (3) study in silico the interaction of arbovirus peptides with the putative *DQA1/DQB1* and *DRA1/DRB1* dimers formed by some of the differentially observed *DRA1/DRB1* and *DQA1/DQB1* haplotypes.

METHODS

Patients and Controls

Patients ($n = 90$, 43 men) with average age 45.75 years (SD ± 16.90), presenting with neurological symptoms during the arbovirus outbreak, were recruited at Hospital da Restauração of Recife, State of Pernambuco, Brazil. Patient sera or plasma and cerebrospinal fluid were used for etiological infection diagnosis using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; immunoglobulin M and immunoglobulin G), plaque reduction neutralization test, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) for ZIKV, CHIKV, and DENV [16, 17].

At the time of diagnosis, patients exhibited laboratory evidence for flavivirus (ZIKV or DENV) infections (13 patients), or togavirus (CHIKV) infection (23 patients), or flavivirus plus togavirus infections (28 patients). In the remaining 26 patients it was not possible to discriminate ZIKV from DENV infection due to the well-known serologic cross-reactivity between flaviviruses (ZIKV and DENV); however, they exhibited similar neurological manifestation as seen in confirmed ZIKV-infected patients. All patients were also categorized according to the major neurological syndrome into ESD (29 patients) and PSD (46 patients). Few cases (15 patients) exhibited other neurological complications, that is optic neuritis, peripheral facial paralysis, and brain stroke. These patients were included in the analysis of the association between HLA class II alleles with the arbovirus-induced neurological complications; however, they

were excluded when we investigated the allele frequencies between the major clinical presentation forms (ESD/PSD). In parallel, we studied 200 healthy bone marrow donors (112 men) with average age 35.74 years (SD ± 7.75) from the same geographical and endemic area as the patients (Table 1).

The project protocol was approved by the ethics committee of the Hospital da Restauração (protocol No. CAAE63883517.4.3001.5198), and all the participants signed the informed consent forms.

DNA Extraction and HLA-II-DRB1/DQA1/DQB1 Typing

Genomic DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells using the DNAzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen), following the supplier's instructions. The *HLA-DRB1/DQA1/DQB1* loci were typed using sequence-specific oligonucleotides (LABType SSO kit, One Lambda) and named in accordance with the National Marrow Donor Program code (<https://hml.nmdp.org/MacUI/>).

Statistical Analysis

Genetic Association Studies

Allele, genotype, haplotype frequencies, and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were performed using ARLEQUIN version 3.5.2 software [18]. HWE was tested by the exact test of Guo and Thompson [19]. Haplotypes were inferred with the same ARLEQUIN software using the expectation-maximization algorithm. The univariate analyses were performed by 2×2 contingency tables (binary variables), using R software (R version 3.4.2) [20]. The strength of the association was evaluated by the odds ratio (OR and 95% confidence interval [CI]), and *P* values were obtained using the 2-tailed Fisher exact test.

Association analyses were performed using only variants that exhibited a frequency $> 1\%$ (Supplementary Table 1A–1D). The following analyses were performed: (1) whole group of arbovirus infected patients versus controls, (2) ESD plus PSD patients versus control, (3) ESD syndrome versus controls, and (4) PSD syndrome versus controls. To limit the false positivity and enhance the accuracy of the results, we adopted a *P* value significance threshold of .005 [21] for univariate analysis followed by the Bonferroni correction (*P_c*). We included in multivariable analysis only univariate associations (Supplementary Tables 2 and 3) that reached the stringent $P \leq .005$ and/or $P_c \leq .05$ threshold. The multivariable analyses were done using the multiple logistic regression model, including the dichotomous dependent variables (infected/controls, ESD plus PSD/controls, ESD/controls, or PSD/controls) and the independent variables (*HLA-DR/DQ* variants), adjusted for age and sex (covariables; Supplementary Table 4). The model was determined by using the step procedure and the choice of the final model was made on the basis of the lowest Akaike information criterion [22]. Multivariate adjusted *P* values $\leq .05$ were considered significant.

Binding Affinity of Virus Peptides to HLA-II Dimers

Because ZIKV is the prototype arbovirus associated with neurological complications, we used the complete ZIKV polyprotein, divided into 15-residue peptides (same size as the native peptides in the experimentally devised structures) with an overlap of 12 residues between adjacent peptides, for in silico studies. Variations among the 15 ZIKV virus strains were also considered, according to sequences deposited at National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The binding free energy ($\Delta\Delta G$) of the coupled peptide into the resolved native X-ray crystallographic structure (PDB ID: 5KSV; 5NI9) [23, 24] was compared to the values obtained for the virus peptides when coupled (replacing the native γ -chain) into the α - and β -beta chains of HLA-II dimers. Once the structure of each 15-mer peptide was computed, the binding free energy was compared to the value of the native peptide. The $\Delta\Delta G$ was calculated using Rosetta version 3.10.2 software [25, 26]. Geometry optimizations were performed using the Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno algorithm, complying with the Armijo-Goldstein condition and the binding free energy was computed using the atomistic energy function REF2015 [27]. Sampling of the peptide backbone was enhanced by the backrub protocol. REF2015 has been parameterized against high-resolution structural data and its energy unit was expressed in kcal/mol [27, 28]. Electrostatic potential surfaces were calculated using the adaptive Poisson-Boltzmann solver [29] and plotted onto the HLA van der Waals surface, as rendered by visual molecular dynamics [30]. To estimate the cross-reactivity among virus peptides and HLA dimers, peptide homology between DENV1-4, CHIKV, and ZIKV was evaluated applying BLASTp [31], and using polyproteins retrieved from UNIPROT [32].

RESULTS

HLA-DRB1/DQA1/DQB1 Alleles, Genotypes, and Haplotypes

Besides comparing the frequencies of the *DRB1/DQA1/DQB1* alleles, genotypes, and haplotypes between patients and controls, we also evaluated some of the putative dimers formed by HLA class II haplotypes that exhibited differential frequencies between patients and controls. To perform dimer analyses, we considered (1) only *DRB1* allele groups for the *DRA1/DRB1* haplotypes because the *DRA1* locus has a negligible polymorphism, and (2) both *cis* and *trans* combinations for *DQA1/DQB1* haplotypes. The terms *DRA1/DRB1* and *DQA1/DQB1* haplotypes refer to genetic studies and the putative molecules encoded by these haplotypes are *DRA1/DRB1* and *DQA1/DQB1* dimers. For genetic analyses, only *cis* haplotypes (*cis* dimers) were computed. The *HLA-DRB1/DQA1/DQB1* loci fit the HWE for patients and controls, exhibiting *P* values > .05 (Supplementary Table 1A).

Several comparisons were performed exhibiting significant *P* values; however, in the results section, only comparisons that

Table 1. Demographic and Phenotypic Features of Control Population and Patients Infected by Arbovirus in the 2015–2016 Epidemics in the Brazilian Northeastern State of Pernambuco

Demographic and Phenotypic Features	Patients, No. (%) ^a	Controls, No. (%)
Total participants	90 (31.03)	200 (68.97)
Sex		
Female	47 (16.21)	88 (30.34)
Male	43 (14.83)	112 (38.62)
Age		
< Median, No.	43	97
Median, γ (No.)	46 (2)	34 (11)
> Median, No.	43	92
Patient phenotypes		
Infected by flavivirus, ZIKV or DENV	39 (43.33)	...
Infected by togavirus, CHIKV	23 (25.56)	...
Infected by togavirus + flavivirus	28 (31.11)	...
Syndromes caused by arbovirus ^b		
ESD	29 (32.22)	...
PSD	46 (51.11)	...
OND ^c	15 (16.67)	...

Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; DENV, dengue virus; ESD, encephalitis spectrum disorders; OND, other neurological disorders; PSD, peripheral spectrum disorders; ZIKV, Zika virus.

^aPatients infected by arboviruses ZIKV, DENV, and/or CHIKV.

^bESD: cerebellitis, encephalitis, meningoencephalitis, rhombencephalitis, myelitis, and myeloradiculitis; and PSD: polyneuropathy, polyradiculoneuropathy, radiculoneuropathy, and Guillain-Barré syndrome.

^cA few patients were also diagnosed with OND, including optic neuritis, peripheral facial paralysis, and brain stroke.

reached significance of $P \leq .005$ for univariate analysis and $P \leq .05$ for multivariable analysis adjusted for sex and age are shown (Table 2 and Table 3).

HLA-DRB1/DQA1/DQB1 Variants Are Associated With Susceptibility/Protection to Arbovirus Neurological Complications

Compared to controls, the *DRB1*04* allele group or the *DRB1*04* dimer was overrepresented in controls compared to whole group of patients (univariate analysis $P = .0003$; multivariable $P = .044$; Table 2), while the *DRB1*03/DQA1*01/DQB1*02* extended haplotype was overrepresented in the whole group of patients (univariate analysis $P = .0002$; multivariable $P = .011$; Table 2).

Considering the stratified ESD plus PSD or ESD or PSD patient groups in comparison to controls: (1) the *DQA1*03* allele group exhibited higher frequency in controls than in both the ESD plus PSD patient group (univariate analysis $P = .001$; multivariable $P = .033$; Table 3) and the ESD patient group (univariate analysis $P = .004$; multivariable $P = .044$; Table 3); (2) the *DRB1*03/DQA1*01/DQB1*02* extended haplotype was overrepresented in the ESD plus PSD patient group (univariate analysis $P = .0002$; multivariable $P = .005$; Table 3); and (3) the *DRB1*03* allele group or dimer (univariate analysis $P = .0005$;

Table 2. Multivariate Analyses for Comparisons of HLA-DRB1, DQA1, and DOB1 Alleles, Genotypes, Dimers, and Extended Haplotypes, Exhibiting P Value ≤ .005 in Univariate Analysis Between the Whole Group of Patients With Arbovirus (ZIKV, DENV, and CHIKV) Infections Versus Controls

Variables	Univariate (Unadjusted)					Multivariate (Adjusted)				
	Patient, %	Control, %	OR	95% CI	P	OR	95% CI	Z Value	Model Dispersion Coefficient ^a	P
DRB1*04 allele/dimer	15.70	36.50	0.33	.16–.63	.0003	0.49	.23–.96	-2.010	1.06	.044
DRB1*15 allele/dimer	36.00	18.50	2.47	1.35–4.49	.002	1.66	.88–3.11	1.570	1.06	.116
DRB1*04/DRB1*13	0.00	9.00	0.00	.00–.46	.001	0.00	0–1 × 10 ⁻²⁰	-0.018	1.06	.986
DRB1*03/DOA1*01/DOB1*02	11.10	1.00	12.26	2.53–117.64	.0002	8.51	1.91–60.75	2.540	1.06	.011

Significant multivariate P values adjusted by sex and age are shown in bold.

Abbreviations: CHIKV, chikungunya virus; CI, confidence interval; DENV, dengue virus; OR, odds ratio; ZIKV, Zika virus.

^aModel dispersion is the summary(model.final\$deviance/summary(model.final)\$df.residual ratio. The model is dispersed when this ratio exceeds 1.5.

Table 3. Multivariate Analyses for Comparisons of HLA-DRB1, DQA1, and DOB1 Alleles, Genotypes, Dimers, and Extended Haplotypes, Exhibiting P Value ≤ .005 in Univariate Analysis Between Patients Presenting With ESD Plus PSD, Only ESD, and Only PSD Versus Controls

Variables	Univariate (Unadjusted)					Multivariate (Adjusted)				
	ESD + PSD, ESD, or PSD, %	Control, %	OR	95% CI	P	OR	95% CI	Z Value	Model Dispersion Coefficient ^a	P
Patients presenting with ESD plus PSD										
DQA1*03	20.00	41.50	0.35	.17–.68	.001	0.48	.24–.92	-2.129	1.03	.033
DRB1*04/DRB1*13	0.00	9.00	0.00	.00–.57	.005	0.00	0–3 × 10 ⁻¹⁹	-0.017	1.03	.986
DRB1*03/DOA1*01/DOB1*02	12.00	1.00	13.35	2.67–130.25	.0002	10.30	2.38–72.23	2.809	1.03	.005
Patients presenting with only ESD										
DQA1*03	13.80	41.50	0.23	.06–.69	.004	0.30	.08–.89	-2.016	0.69	.044
DQA1*01/DOB1*06	41.40	17.00	3.42	1.36–8.43	.005	2.17	.88–5.30	1.709	0.69	.087
Patients presenting with only PSD										
DRB1*03 allele/dimer	28.30	8.00	4.49	1.81–11.05	.0005	3.34	1.27–8.69	2.473	0.81	.013
DRB1*13 allele/dimer	10.90	33.00	0.25	.07–.67	.002	0.25	.08–.67	-2.566	0.81	.010
DQA1*01/DOA1*05	34.80	12.50	3.71	1.65–8.24	.0007	3.56	1.48–8.53	2.863	0.81	.004

Significant multivariate P values adjusted by sex and age are shown in bold.

Abbreviations: CI, confidence interval; ESD, neurological encephalitis spectrum; OR, odds ratio; PSD, peripheral spectrum disorders.

^aModel dispersion is summary(model.final\$deviance / summary(model.final)\$df.residual ratio. The model is dispersed when this ratio exceeds 1.5.

multivariable $P = .013$; Table 3) and the DQA1*01/DQA1*05 genotype (univariate analysis $P = .0007$; multivariable $P = .004$; Table 3) were found in higher frequency in PSD patients. In addition, the DRB1*13 allele group or dimer was overrepresented in controls compared to PSD patients (univariate analysis $P = .002$; multivariable $P = .010$; Table 3).

Binding Affinity of Arbovirus-Derived Peptides to DRA1/DRB1 and DQA1/DQB1 Dimers

Considering that (1) some protein structures of the DRA1/DRB1 and DQA1/DQB1 dimers coupled with 15-residue peptides have been resolved by X-ray crystallography [23, 24], (2) some dimers are available for in silico studies [23, 33], and (3) ZIKV is the major agent associated with neurological manifestations, we used a library of ZIKV polyproteome peptides to evaluate their interaction with dimers. We selected available dimer constructions associated with protection (DRA1/DRB1*04) or susceptibility (DQA1*05/DQB1*02) to arbovirus-related neurological complications. Both dimers were evaluated for their binding affinities for 1878 15-mer peptides covering the entire of ZIKV polyprotein of the 15 strains. Binding free energy ($\Delta\Delta G$) values for the native structures of the DQA1*05/DQB1*02 and DRA1/DRB1*04:01 complexes were -69 and -54 kcal/mol, respectively. Accordingly, peptides that presented

binding free energy values lower than the values for the native peptides would have higher affinity and, therefore, were able to bind to HLA dimers. The DQA1*05/DQB1*02 dimer can bind with high affinity to a remarkable number of hypothetical ZIKV peptides. A total of 235 15-mer ZIKV polyprotein-derived peptides could be presented by the DQA1*05/DQB1*02 dimer (Supplementary Table 5), whereas only 40 peptides were bound to DRA1/DRB1*04:01 dimer with higher affinity than the native counterpart (Supplementary Table 6). The distribution of the high-affinity peptides across the ZIKV proteins that can bind to the dimers is shown in Figure 1A. To assess statistical relevance regarding the ZIKV proteins presented by HLA dimers, protein length should be considered. The relative coverage (percentage of ZIKV 15-mer peptides that can bind to a dimer with higher affinity than the dimer's native peptide) of the high-affinity peptides on each ZIKV protein for both HLA molecules is presented in Figure 1B. Notably, among peptides exhibiting highest affinities to bind to the DQA1*05/DQB1*02 dimer, the ZIKV proteins prM and NS2A were highly represented, whereas no peptide from NS2B protein was able to bind to the DRA1/DRB1*04:01 dimer (Figure 1A and 1B). There was little overlap between the peptides that bind to each HLA dimer (Supplementary Tables 5 and 6). The discrepancy in the ZIKV peptide repertoire that can bind to each HLA can be

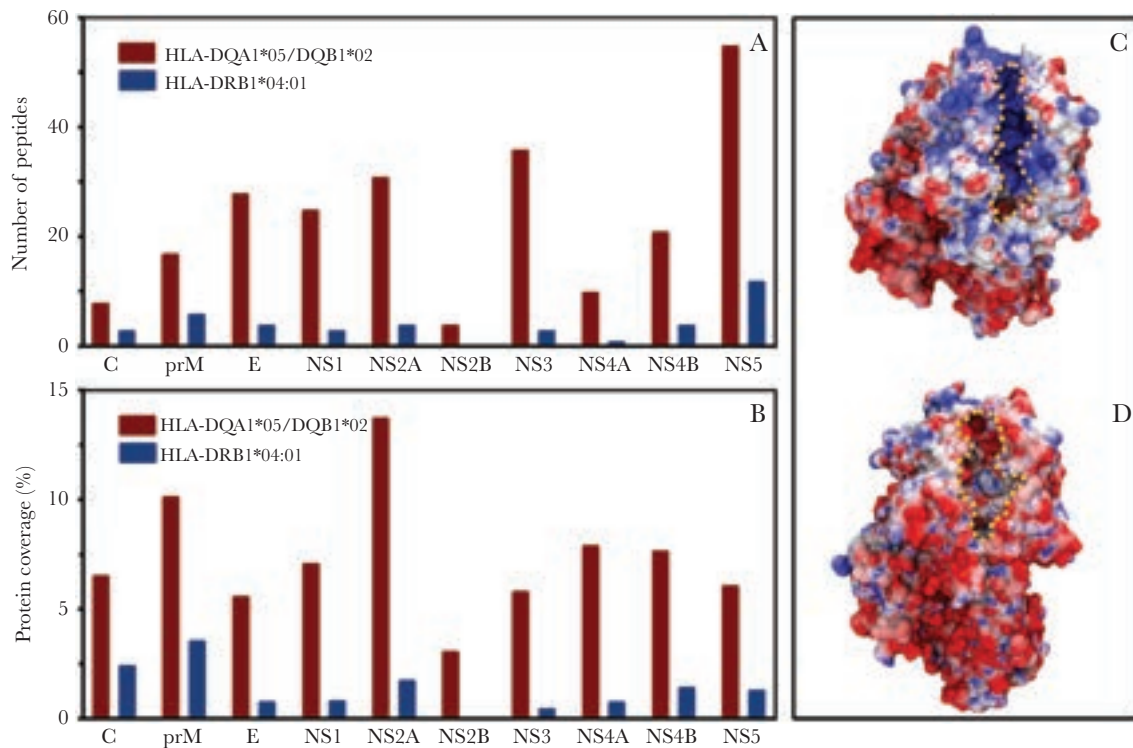


Figure 1. Distribution of 15-mer peptides derived from the Zika virus polyprotein capable of binding with high affinity to HLA-DQA1*05/DQB1*02 and HLA-DRA1/DRB1*04:01 dimers and HLA electrostatic surface potential. *A*, Number of peptides from each protein. *B*, Protein coverage, defined as the ratio of the number of peptides over the length of each protein. *C* and *D*, Electrostatic potential (from -6 to $+6$ kJ/mol/e) plotted onto the van der Waals surface of the DQA1*05/DQB1*02 dimer (*C*) and DRA1/DRB1*04:01 dimer (*D*). Negatively charged areas are represented in red, positively charged areas are represented in blue, and neutral areas are represented in white; peptide binding clefts are highlighted by a dotted yellow line.

understood by inspecting the differences in charge surface of each binding site. Plotting of the electrostatic potential onto the protein van der Waals surface revealed that DQA1*05/DQB1*02 dimer has a highly positively charged groove (Figure 1C), while HLA/DRB1*04:01 dimer displays a more amphipathic and yet less hydrophilic site (Figure 1D). In addition, 24, 27, 5, and 38 ZIKV peptides predicted to bind to the DQA1*05/DQB1*02 dimer were homologous to DENV1–4 peptides, respectively (Supplementary Tables 7). Interestingly, only a few ZIKV peptides, which were similar to each other and homologous to DENV1 (6 peptides), DENV2 (6 peptides), and DENV4 (8 peptides), were predicted to bind to DQA1/DRB1*04 dimer (Supplementary Tables 8).

DISCUSSION

HLA-I molecules have a pivotal role in viral infection control [34]; however, the class II presentation of viral peptides to T-cell CD4⁺ is the first step of the adaptive immunity that may impact on viral disease outcome [35], and HLA-II gene variants are expected to modulate host immune response against viruses, depending on residue features of the binding groove. Mutations in HLA-II genes have been associated with susceptibility/protection for many arbovirus infections, including DENV, West Nile virus, and other flaviviruses [11, 12, 14, 15, 36]. We evaluated the association between HLA-II alleles, genotypes, haplotypes, and their encoded dimers on the susceptibility to arbovirus-related neurological complications.

Although *DRB1* alleles (*DRB1*15* and *DRB1*03* considered as alleles and haplotypes) were associated with susceptibility to arbovirus infections (Supplementary Tables 2 and 3), the most striking associations were observed with *DQA1*05* (genotype and haplotype), *DQA1*01* (genotype and haplotype), *DQB1*02* (genotype and haplotype), and *DQB1*06* (genotype and haplotype), which were overrepresented in arbovirus-infected patients, considered as the whole group and as major neurological syndromes (ESD and PSD). Accordingly, the haplotypes that encoded the *DQA1*01/DQB1*02* and *DQA1*01/DQB1*06* dimers showed strong associations with susceptibility to arbovirus infections and ESD or PSD. Notably, a strong linkage disequilibrium (LD) has been reported for *DRB1* and *DQB1* alleles, and in the Brazilian population the *DRB1*15* allele group is primarily in LD with the *DQB1*06* group, whereas the *DRB1*03* group is primarily associated with the *DQB1*02*, *03*, and *04* groups [37, 38]. In addition to *DRB1*15*, the *DRB1*11* group, which exhibited a frequency closely similar to controls, also exhibit strong LD with *DQB1*06* alleles. Therefore, LD between *DRB1/DQB1* alleles may also contribute to the increased frequency of *DQB1*06* alleles, and the participation of *DRB1* alleles (particularly *DRB1*15* and *DRB1*03*) may be due to a hitchhiking LD with *DQB1* alleles. Besides *DRB1/DQB1* LD, some *DRB1/DQA1/DQB1* extended haplotypes were also associated with susceptibility to arbovirus neurological infections.

The increased frequency of the haplotypes *DRB1*03/DQA1*01/DQB1*02* and *DRB1*15/DQA1*05/DQB1*06* (Supplementary Tables 2 and 3) may yield several *cis* dimers (*DQA1*01/DQB1*02* and *DQA1*05/DQB1*06*). In parallel, several *trans* dimers may also be formed, including several combinations of *DQA1*01* and *DQA1*05* at one haplotype with *DQB1*02* and *DQB*06* at the other haplotype. To further understand the role of *DQA1/DQB1* dimers we performed an *in silico* study to evaluate the peptide profile that can be presented by such dimers, and we illustrated these studies by coupling ZIKV peptides to dimers. Surprisingly, a single dimer (*DQA1*05/DQB1*02*) presented hundreds of virus peptides. Considering that a great number of *cis* and *trans* *DQA1/DQB1* dimers can be generated by the susceptibility haplotypes, the number of virus peptides to be presented to T cells may drastically increase. If, on the one hand, the increased number of peptides may result in a diverse immune response against virus peptides, but on the other hand, the association of several haplotypes with susceptibility to arbovirus may indicate that peptides may be redundant and/or cross-reacting, impairing the effective immune response against the virus.

In contrast to susceptibility alleles, the most striking association with protection was conferred by the *DRB1*04* allele group, which was underrepresented in the whole group of patients. The *in silico* studies showed that only dozens of Zika virus peptides were presented by the *DQA1/DRB1*04* dimer, contrasting to hundreds of peptides that can be presented by *DQA1/DQB1* dimers. The reduced number of virus peptides may indicate that a more robust and more specific immune response may be mounted by *DRB1* molecules.

The chemical nature of the clefts formed by *DQA1*05/DQB1*02* or *DRB1/DRB1*04* are quite distinct. While the former is mainly hydrophilic and positively charged (Figure 1C), the latter is less hydrophilic and exhibits an amphipathic character (Figure 1D). In addition, little overlap is seen for the repertoire of ZIKV peptides that can bind to each dimer. As shown in Figure 1, the *DQA1*05/DQB1*02* dimer is highly promiscuous to ZIKV hypothetical peptides. Among those, it is reported that prM and NS2A proteins share a role in the modulation of virion assembly [39], and prM has been associated with neurovirulence [39]. In contrast, HLA-*DRB1*04* is more specific (binds to fewer peptides) and prM was the most represented protein (Figure 1B). Notably, immune response against prM is likely to be essential for protection because DNA-based Zika vaccines that did not code for prM did not achieve appropriate level of protection [40].

Peptide promiscuity among HLA class I and II molecules is a widely discussed subject; however, molecules that present larger number of peptides promote immune response against a broad range of pathogens [41, 42], but may not be able to respond to new virulent pathogens [41]. In contrast, particular dimers may provide protection against highly virulent pathogens, such

as human immunodeficiency virus [43], hepatitis C virus [44, 45], and *Leishmania* species [42]. These observations are consistent with our findings, in which some DQA1/DQB1 dimers (for instance, DQA1*05/DQB1*02) act as generalist molecules, while others (DRA1/DRB1*04) act as specialist molecules towards ZIKV peptides. It has also been proposed that pathogen diversity drives the evolution of promiscuous HLA-II alleles in regions of high pathogen diversity [46]. Indeed, a higher prevalence of the 4 DENV serotypes in the northeastern region of Brazil [47] may account for the higher number of ESD and PSD cases compared to other regions in the country. Interestingly, our results show that ZIKV NS2A protein is highly covered by the DQA1*05/DQB1*02 dimer, and the cross-reactivity between ZIKV and DENV T-cell responses [48, 49] may account for the difficulty in discriminating between these infections.

One of the limitations of this exploratory report is the size of our cohort (90 patients). Few studies have addressed the association of HLA-DR-DQ genes with arbovirus infections, particularly focusing on dengue [11, 12, 50] and chikungunya [10, 13], encompassing sample sizes ranging from 39 to 110 patients; however, no studies have been conducted to evaluate the effect of these genes in neurological complications. In the present study, all 90 cases analyzed exhibited neurological complication of arbovirus disorders, diagnosed in a defined time in a restricted geographical area of Brazil, possibly presenting with the same virus strains. Despite the sample size, in this series we detected several HLA-II associations that (1) reached the stringent P values ($P \leq .005$ and/or Bonferroni corrected $P_c \leq .05$) threshold fixed for univariate analyses, (2) reached the stringent the P value .05 threshold for the multivariable analysis following correction for sex and age, and (3) exhibited a biological relevance in *in silico* studies, explaining at least in part the increased frequency of neurological complications following the arbovirus outbreak that occurred in the state of Pernambuco, Brazil. Another limitation was the controls. The ideal control group would be healthy individuals who presented positive serology or previous history of dengue, chikungunya, and Zika infections; however, the patients exhibited these infections in several combinations, impairing the availability of controls with the same viral serologic profile but without neurological manifestations. To circumvent these limitations, we chose healthy bone marrow donors because (1) they are from the same geographical and endemic region as the patients, (2) they represent the allele frequency of the studied population, and (3) the frequency deviation from that of the patients gives a clue to the differential alleles implicated in disease pathogenesis, satisfying the objectives of the study.

In conclusion, the ensemble of genetic and *in silico* studies indicate that *DQA1* and *DQB1* alleles primarily considered as haplotypes are associated with susceptibility to arbovirus infection, possibly due to (1) the large number of DQA1/DQB1 molecules that can be generated by the haplotypes exhibiting differential frequencies between patients and controls, (2)

broad peptide specificity, as shown by the large number of arbovirus peptides that these dimers can present, and (3) the distinct chemical nature of the DQA1/DQB1 dimer cleft when compared to that formed by DRA1/DRB1 molecules. In contrast, the protection conferred by the specific DRA1/DRB1 dimer may associated with the presentation of a limited number of arbovirus peptides, suggesting that protective molecules may recognize arbovirus peptides more specifically and more efficiently.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Acknowledgments. The authors thank patients and relatives for their free consent, and the health professionals of the neurology service in the Hospital da Restauração for their great collaboration.

Author contributions. E. A. D. and N. L.-S. conceived, designed, and applied for grants to perform the study. M. L. B. F., C. A. A. B., M. F. M. A., M. T. C., and R. S. A. collected samples and provided clinical and laboratory information. N. H. S. D., G. H. W., and E. L. G. performed HLA-II gene typing. P. S. processed sequenced data and wrote the original manuscript draft. P. S. and R. S. A. performed statistical analyses. A. F. P. J. and R. D. L. performed the computer simulations. P. S., R. S. A., M. T. C., C. A. A. B., M. F. M., R. D. L., E. A. D., and N. L.-S. performed data curation. All authors have critically read and edited the manuscript.

Financial support. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant numbers 440760/2016-0 and 302060/2019-7); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (grant number 88881.130769/2016-01); and the Aggeu Magalhães Institute/Fundação Oswaldo Cruz. P. S. was supported by Fundação Oswaldo Cruz (grant number INOVA FIOCRUZ/02/2019 PDJ); N. L.-S. and R. D. L. are CNPq scholarship holders (grant numbers 310364/2015-9 and 310892/2019-8); and A. F. P. J. was sponsored by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco. Computer allocation was provided by Laboratório Nacional de Computação Científica.

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflict of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Rev Mol Med* 2019; 21:e1.

2. Keesen TSL, de Almeida RP, Gois BM, et al. Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil. *Lancet Infect Dis* **2017**; 17:693–4.
3. Wilder-Smith A, Gubler DJ, Weaver SC, Monath TP, Heymann DL, Scott TW. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis* **2017**; 17:e101–6.
4. Araujo LM, Ferreira ML, Nascimento OJ. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* **2016**; 74:253–5.
5. Ketkar H, Herman D, Wang P. Genetic determinants of the re-emergence of arboviral diseases. *Viruses* **2019**; 11:150.
6. Liu Y, Liu J, Du S, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* **2017**; 545:482–6.
7. Pompon J, Manuel M, Ng GK, et al. Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS Pathog* **2017**; 13:e1006535.
8. Yakub I, Lillibridge KM, Moran A, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection. *J Infect Dis* **2005**; 192:1741–8.
9. Dutta SK, Tripathi A. Association of Toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. *Virology* **2017**; 511:207–13.
10. Chaaithanya IK, Muruganandam N, Anwesh M, et al. HLA class II allele polymorphism in an outbreak of chikungunya fever in Middle Andaman, India. *Immunology* **2013**; 140:202–10.
11. Falcón-Lezama JA, Ramos C, Zuñiga J, et al. HLA class I and II polymorphisms in Mexican Mestizo patients with dengue fever. *Acta Trop* **2009**; 112:193–7.
12. Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2004**; 99:559–62.
13. Thanapati S, Hande A, Das R, Gurav Y, Tripathy AS. Association of human leukocyte antigen class II allele and haplotypes in chikungunya viral infection in a western Indian population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2014**; 108:277–82.
14. Sarri CA, Markantoni M, Stamatis C, et al; MALWEST Project. Genetic contribution of MHC class II genes in susceptibility to West Nile virus infection. *PLoS One* **2016**; 11:e0165952.
15. Malavige GN, Rostron T, Rohanachandra LT, et al. HLA class I and class II associations in dengue viral infections in a Sri Lankan population. *PLoS One* **2011**; 6:e20581.
16. Brito Ferreira ML, Antunes de Brito CA, Moreira ÁJP, et al. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am J Trop Med Hyg* **2017**; 97:1405–9.
17. Pessôa R, Patriota JV, Lourdes de Souza MD, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in Pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, chikungunya, and dengue virus type 1. *Medicine (Baltimore)* **2016**; 95:e3201.
18. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* **2007**; 1:47–50.
19. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **1992**; 48:361–72.
20. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, **2017**. <http://www.R-project.org/>. Accessed 21 December 2020.
21. Benjamin DJ, Berger JO, Johannesson M, et al. Redefine statistical significance. *Nat Hum Behav* **2018**; 2:6–10.
22. Akaike H. A new look at statistical model identification. *IEEE Trans Autom Control* **1974**; 19:716–23.
23. Nguyen TB, Jayaraman P, Bergseng E, Madhusudhan MS, Kim CY, Sollid LM. Unraveling the structural basis for the unusually rich association of human leukocyte antigen DQ2.5 with class-II-associated invariant chain peptides. *J Biol Chem* **2017**; 292:9218–28.
24. Pieper J, Dubnovitsky A, Gerstner C, et al. Memory T cells specific to citrullinated α -enolase are enriched in the rheumatic joint. *J Autoimmun* **2018**; 92:47–56.
25. Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins* **2011**; 79:830–8.
26. Mandell DJ, Kortemme T. Computer-aided design of functional protein interactions. *Nat Chem Biol* **2009**; 5:797–807.
27. Alford RF, Leaver-Fay A, Jeliakov JR, et al. The Rosetta all-atom energy function for macromolecular modeling and design. *J Chem Theory Comput* **2017**; 13:3031–48.
28. Park H, Bradley P, Greisen P Jr, et al. Simultaneous optimization of biomolecular energy functions on features from small molecules and macromolecules. *J Chem Theory Comput* **2016**; 12:6201–12.
29. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98:10037–41.
30. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**; 14:33–8, 27–8.
31. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **1990**; 215:403–410.
32. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* **2019**; 47:D506–15.

33. Li Z, Zhao Y, Pan G, et al. A novel peptide binding prediction approach for HLA-DR molecule based on sequence and structural information. *BioMed Res Int* **2016**; 2016:1–10.
34. Maucourant C, Petitdemange C, Yssel H, et al. Control of acute arboviral infection by natural killer cells. *Viruses* **2019**; 11:131.
35. Reynolds CJ, Suleyman OM, Ortega-Prieto AM, et al. T cell immunity to Zika virus targets immunodominant epitopes that show cross-reactivity with other flaviviruses. *Sci Rep* **2018**; 8:672.
36. Lanteri MC, Kaidarova Z, Peterson T, et al. Association between HLA class I and class II alleles and the outcome of West Nile virus infection: an exploratory study. *PLoS One* **2011**; 6:e22948.
37. Reis PG, Sell AM, Sakita KM, et al. HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 diversity in a mixed population of Paraná, Southern Brazil. *Hum Immunol* **2015**; 76:153.
38. Sotomaior VS, Fauz FR, Schafhauser C, et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles and haplotypes in two Brazilian Indian tribes: evidence of conservative evolution of HLA-DQ. *Hum Biol* **1998**; 70:789–97.
39. Nambala P, Su WC. Role of Zika virus prM protein in viral pathogenicity and use in vaccine development. *Front Microbiol* **2018**; 9:1797.
40. López-Camacho C, Abbink P, Larocca RA, et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nat Commun* **2018**; 9:2441.
41. Kaufman J. Generalists and specialists: a new view of how MHC class I molecules fight infectious pathogens. *Trends Immunol* **2018**; 39:367–79.
42. Singh G, Pritam M, Banerjee M, Singh AK, Singh SP. Genome based screening of epitope ensemble vaccine candidates against dreadful visceral leishmaniasis using immunoinformatics approach. *Microb Pathog* **2019**; 136:103704.
43. Goulder PJ, Walker BD. HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity* **2012**; 37:426–40.
44. Pybus OG, Théze J. Hepacivirus cross-species transmission and the origins of the hepatitis C virus. *Curr Opin Virol* **2016**; 16:1–7.
45. Dazert E, Neumann-Haefelin C, Bressanelli S, et al. Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8⁺ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *J Clin Invest* **2009**; 119:376–86.
46. Manczinger M, Boross G, Kemény L, et al. Pathogen diversity drives the evolution of generalist MHC-II alleles in human populations. *PLoS Biol* **2019**; 17:e3000131.
47. Castanha PM, Cordeiro MT, Martelli CM, Souza WV, Marques ET Jr, Braga C. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. *Epidemiol Infect* **2013**; 141:1080–8.
48. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill* **2016**; 21:30426.
49. Wong SJ, Furuya A, Zou J, et al. A multiplex microsphere immunoassay for Zika virus diagnosis. *EBioMedicine* **2017**; 16:136–40.
50. Chen Y, Liao Y, Yuan K, Wu A, Liu L. HLA-A, -B, -DRB1 alleles as genetic predictive factors for dengue disease: a systematic review and meta-analysis. *Viral Immunol* **2019**; 32:121–30.



In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Lívia Caroline Alexandre de Araújo^a, Antônio Fernando da Purificação-Júnior^b, Sivoneide Maria da Silva^a, Ana Catarina Souza Lopes^c, Dyana Leal Veras^d, Luiz Carlos Alves^d, Fábio Brayner dos Santos^d, Thiago Henrique Napoleão^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Márcia Vanusa da Silva^a, Maria Luiza Vilela Oliva^e, Maria Betânia Melo de Oliveira^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^b Departamento de Virologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil

^c Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^d Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Heavy metal
Biofilm
Co-resistance
Genetic diversity

ABSTRACT

The increase in urbanization and industrialization has contributed to the contamination of different environments by means of xenobiotic compounds, such as heavy metals, causing changes in microbial communities. Among these metals, the Mercury (Hg²⁺) is one the most prevalent toxic metals for the environment. The present study aimed to evaluate the effect of mercury on the formation of biofilm by environmental (collected from urban stream water) and clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. In addition, antibiotic resistance, virulence factors, and genetic diversity were investigated. Taxonomic identity of eight isolates (one reference, two clinical, and five environmental isolates) was performed by MALDI-TOF-MS, while the antibiotic susceptibility profile was assessed by the disc diffusion method. The ability to form biofilms was evaluated by culture on Congo red agar and by crystal violet staining. Biofilm structure was analyzed by scanning electron microscopy. The hydrophobicity profile and the presence of the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD* was investigated. The presence of *merA* and its relationship with antimicrobial resistance were also assessed. The identity of all isolates was confirmed by MALDI-TOF-MS, and different profiles of resistance to mercury and antibiotics as well as of biofilm formation were identified for the clinical and environmental isolates. All isolates were hydrophilic and positive for the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD*; only the clinical isolate K36-A2 was positive for *merA*. The diversity of the isolates was confirmed by ERIC-PCR, which revealed high heterogeneity among the isolates. In conclusion, the data demonstrate that the investigated isolates present different responses to exposure to Hg²⁺ and correspond to distinct populations of *K. pneumoniae* disseminated in the investigated environment. The data obtained in this work will aid in understanding the mechanisms of survival of this pathogen under adverse conditions.

1. Introduction

Heavy metals derived from numerous sources participate in the global ecological cycle and can be transported dynamically through the atmosphere, soil, and water. Because they are not biodegradable, these minerals can remain in the environment for long periods of time (Linde et al., 1996). In the last decades, the increase in urbanization and industrialization has contributed to the presence and permanence of these contaminants in the environment. This increase may lead to modifications in the structure and function of microbial communities. (Dixit

et al., 2015; Fashola et al., 2016; Mahbub et al., 2017a, 2017b, 2017c). The survival of bacteria in the presence of heavy metals is linked to the ability of developing mechanisms that neutralize the toxicity by cross-resistance and/or co-regulation of resistance pathways (Aslam et al., 2018; Li et al., 2017; Martins et al., 2014; Yamnina et al., 2012).

Mercury (Hg²⁺) is one the most prevalent toxic metals for the environment. It may be emitted by several natural and anthropogenic sources and is recalcitrant to biodegradation, thus impacting the ecosystem and human health (Barkay et al., 2003; Jan et al., 2016; Mahbub et al., 2016; Mahbub et al., 2018). Bacteria resistant to mercury have

* Corresponding author.

E-mail address: maria.bmoliveira@ufpe.br (M.B.M. de Oliveira).

been found in different environments such as soils (Mahbub et al., 2017a, 2017b, 2017c), sediments (Wu et al., 2016), water (Jan et al., 2016), and, more recently, in clinical samples (Pérez-Valdespino et al., 2013; Yang et al., 2018).

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium associated with numerous cases of opportunistic respiratory and urinary tract infections in immunocompromised patients (Ahmad and Abulhamd, 2015; Li et al., 2014). In contrast to other bacterial pathogens, this species is ubiquitous and occupies a diversity of niches in nature, including environmental sources (e.g. vegetation, soil, and water), as well as mucosal surfaces and the intestinal tract of humans and animals (Barati et al., 2016; Struve; Krogfelt, 2004).

Some studies have shown that *K. pneumoniae* isolates of environmental origin are highly similar to clinical isolates regarding phenotypic and some genetic features (Barati et al., 2016; Podshun Ullmann, 1993). On the other hand, other studies demonstrate differences between these two groups in relation to virulence factors (Davis et al., 2015; Runcharoen et al., 2017).

Several factors are associated with the virulence of *K. pneumoniae* isolates: lipopolysaccharides, iron uptake system, fimbrial and non-fimbrial adhesins, and polysaccharide capsules (Brisse et al., 2009; Podschun and Ullmann, 1998). Most of them are related to bacterial adhesion to various biotic and abiotic surfaces and, consequently, to the ability of isolates to form biofilms (Murphy et al., 2013; Stahlhur et al., 2012).

Microbial biofilms are complex structures formed by aggregates of microorganisms adhering to a surface, surrounded by a matrix of exopolysaccharides (EPS). Biofilm formation is an effective strategy for microbial survival and persistence under different physicochemical stress and may involve regulatory processes that indirectly activate genetic and biochemical pathways related to the response to exposure to antibiotics and heavy metals (Azevedo and Cerca, 2012). Studies have shown that sub-inhibitory concentrations of antimicrobials may induce biofilm formation (Kaplan et al., 2012; Hennequin et al., 2012). Similarly, several studies have reported the increase in biofilm formation in the presence of different metals, such as lead (Giovannella et al., 2017), cadmium (Wu et al., 2015), nickel (Perrin et al., 2009).

Yang et al. (2018) have emphasized the effect of heavy metals on biofilm formation by bacteria of environmental and/or clinical origin. The aim of this study was to evaluate the effect of Hg^{2+} on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae*, as well as to verify their resistance, virulence characteristics, and genetic diversity.

2. Materials and methods

2.1. *K. pneumoniae* isolates and culture conditions

Eight isolates were used in the present study, five of which were isolated from water samples collected at different points along an urban stream at Recife, Pernambuco, Brazil (Purificação-Junior et al., 2017), and two of which were clinical isolates (K5-A2 and K36-A2), according Melo et al. (2014), obtained from the Bacterial Culture Collection of the Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). In addition, one isolate (UFPEDA396) obtained from the Microorganism Culture Collection of the Departamento de Antibióticos of UFPE was used as a reference. All isolates were stored in glycerol broth at $-80^{\circ}C$ and reactivated in brain heart infusion (BHI) medium (Difco, Difco Laboratórios Ltda, Brazil) at $37^{\circ}C$ for 24 h.

2.2. Identification by MALDI-TOF

Bacterial cultures grown in BHI medium for 24 h were resuspended in deionized water and inactivated, and proteins were extracted as described by Starostin et al. (2015). For mass spectra analysis, 1 μ L of

the protein extract was placed on a plate (96 MSP, Bruker Daltonics, Billerica, MA USA), followed by drying at room temperature. The alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/mL) matrix in 50% (v/v) acetonitrile and 0.3% (v/v) trifluoroacetic acid was applied to the plate containing the samples for crystallization. Spectra were read in positive linear mode (acceleration voltage of 20 kV and m/z detection range of 2.000–20.000) using the software Flex Control, version 3.0, and a MALDI-TOF Autoflex III spectrometer (Bruker Daltonics). The spectra obtained were compared with those in the MALDI Biotyper database, version 3.1.

2.3. Antibiotic resistance profile

The bacterial isolates were tested for susceptibility to fifteen antimicrobial agents: ampicillin (10 μ g), cefazolin (30 μ g), cefepime (30 μ g), cefotaxime (30 μ g), cefoxitin (30 μ g), cefuroxime (30 μ g), meropenem (10 μ g), imipenem (10 μ g), gentamicin (10 μ g), amikacin (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), nalidixic acid (30 μ g), tetracycline (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), and nitrofurantoin (300 μ g), trimethoprim (5 μ g). The experiments were performed in triplicate using the Kirby-Bauer method (disc diffusion), as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017).

2.4. Evaluation of biofilm formation by Congo red agar assay

The ability to produce biofilms was analyzed by the method described by Freeman et al. (1989). In this assay, the behavior of colonies in sterile Congo red agar (CRA) medium, composed of 37 g/L of BHI medium, 50 g/L of sucrose, 15 g/L of base agar, and 0.8 g/L of Congo red (all purchased from Difco, Difco Laboratórios Ltda, Brasil), was analyzed. The isolates were seeded onto the CRA medium by streaking technique, incubated at $37^{\circ}C$ for 24 h, and then left at room temperature for another 18 h. The results were interpreted according to the staining presented by the colonies after the incubation period: biofilm-producing colonies showed black coloration, while non-biofilm producers showed red coloration. The experiment was performed in triplicate, and three independent assays were performed.

2.5. Biofilm quantification assay

Biofilm quantification was performed in 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Costar, Corning, NY, USA) tryptose soy broth (TSB) medium, and incubation at $37^{\circ}C$ for 24 h. The plates were incubated at $37^{\circ}C$, and, after 24 h, the supernatants were discarded and the wells washed three times with 0.85% saline. The biofilm formed was stained by crystal violet and quantified by reading the OD at 570 nm.

The mean absorbance value of each sample (ODs) was determined in comparison with the absorbance of the sterility control (ODc). The samples were classified as strong ($4 \times ODc < ODs$), moderate ($2 \times ODc < ODs \leq 4 \times ODc$) or weak ($ODc < ODs \leq 2 \times ODc$) biofilm formers. The isolates that presented absorbance values equal to or lower than the control value were classified as non-biofilm producers.

2.6. Hydrophobicity profile

Cell surface hydrophobicity (CSH) was evaluated based on the hydrocarbon binding method of the Tendolkar et al. (2004), substituting the hydrocarbon hexadecane for xylene. Isolates grown in BHI broth at $37^{\circ}C$ for 18 h were transferred to microtubes and centrifuged for 10 min at 7000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in PUM buffer (trihydrate and monobasic potassium phosphate, urea, and heptahydrate magnesium sulphate), adjusted to 0.5 the initial reading (ODi) at 600 nm was recorded. Subsequently, para-xylene was added to the bacterial suspensions, followed by vortexing for 2 min. After separation of the phases at room temperature,

Table 1
Primers used for PCR and DNA sequencing.

Gene	Primer	Sequence	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	References
<i>cps</i>	<i>cpsp</i>	5'CTCCCAATTGTGACCGAAATC 3'	61 °C	435	Hennequin et al. (2012)
	<i>cpsprev</i>	5'GCTCGCGGCACCAGCTGA 3'			
<i>fimH</i>	<i>fimT1-F</i>	5'CCGTTATATTTACGGTGCC 3'	59 °C	1200	Abou-Shanab et al. (2007)
	<i>fimT1-R</i>	5' TCTACGTAACTGACCCCG 3'			
<i>mrkD</i>	<i>mrkD-2F</i>	5'CCACCAACTATTCCTCGAA 3'	62 °C	226	Chang et al. (2006)
	<i>mrkD - 2R</i>	5'ATGGAACCCACATCGACATT 3'			
<i>merA</i>	<i>merA-F</i>	5'GAGATCTAAAGCACGCTAAGGC 3'	57 °C	1011	Misra et al. (1984)
	<i>merA-R</i>	5'GGAATCTTGACTGTGATCGGG 3'			
ERIC	<i>ERIC-R1</i>	5' ATGTAAGCTCTGGGGATTAAC 3'	36 °C	–	Duan et al. (2009)
	<i>ERIC-R2</i>	5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'			

the final optical density (OD_f) at 600 nm of the lower phase of each microtube was read. To determine the CSH (%), the following formula was used: CSH (%) = (OD_i - OD_f) / OD_i × 100. Bacteria that had a CSH (%) lower than 30% were considered hydrophilic, and those with a CSH higher than 70% were considered hydrophobic. Samples that had a CSH between 30% and 70% were classified as moderately hydrophobic.

2.7. Quantification of mercury in the environment

To verify the presence or absence of the metal in the investigated environment samples of water and sediment were collected and analyzed according to the recommendations of the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). The results were interpreted according to the concentration limits set forth in Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Resolution No. 454 (BRASIL, 2012).

2.8. Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of mercury

The determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of Hg²⁺ was performed by the microdilution technique in 96-well microplates, as recommended by the CLSI (CLSI, 2017). The isolates were inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB) medium containing mercury chloride (HgCl₂), at concentration of 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and growth was assessed by reading the OD at 600 nm. The experiment was performed in quadruplicate, and three independent assays were performed.

2.9. Effect of mercury on biofilm formation

The effect of Hg²⁺ on biofilm formation was evaluated by the method described by Wu et al. (2015), with some modifications. The bacterial suspension (10⁶ CFU/mL) was transferred to a 96-well polystyrene microplate, into which TSB medium containing mercury at sub-inhibitory concentrations was added. The incubation and the steps occurred according to the topic 2.5.

2.10. Scanning electron microscopy (SEM) studies

For analyzing the structure of the biofilm in the presence and absence of mercury, the isolates were submitted to the same conditions mentioned in Section 2.8 but including catheter fragments in the wells of the microplate. The samples were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and fixed in 0.1 M phosphate buffer containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide, in 0.1 M phosphate buffer, for 90 min. Three washes were then performed in 0.1 M phosphate buffer for dehydration using increasing ethanol dilutions: 30%, 50%, 70%, 90%, and three times in 100%, 10 min for each step. After the dehydration, the critical point for the substitution of ethanol with carbon dioxide was obtained, drying the

material for assembly in metallic stubs using a double carbon tape. The metallization was performed by covering the material with a thin layer of gold for visualization under the scanning electron microscope JEOL JSM-5600 LV.

2.11. DNA extraction and amplification of the genes *cps*, *fimH*, *mrkD*, and *merA*

Total DNA extraction was performed using the PureLink[®] kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amplification reactions were performed using a total volume of 25 µL per tube, each containing 20 ng genomic DNA, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 200 µM of each dNTP (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂, 15 pmol of the primers, and 1 × PCR buffer (Invitrogen). The amplifications were performed in a thermal cycler (C1000 Thermal Cycler –

BioRad) using the following program: 5 min at 96 °C for initial denaturation, followed by 35 cycles, each consisting of 1 min at 96 °C for denaturation, 1 min at a specific temperature for each primer (Table 1) and 1 min at 72 °C for extension. Next, a final, stretching step of 10 min at 72 °C was performed. Amplification products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in TBE buffer.

2.12. Purification and sequencing of *cps*, *fimH*, *mrkD*, and *merA*

The amplified gene products were purified following the PureLink purification kit protocol (Invitrogen) and then sequenced in an ABI 3100 automatic DNA sequencer, in Sequencing Platform of the Federal University of Pernambuco. The obtained sequences were processed by Staden and MEGA 5.0 programs and compared to other sequences deposited in the NCBI GenBank database using the tool Standard Nucleotide BLAST (BLASTN) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

2.13. ERIC-PCR

For amplification of ERIC sequences by PCR, the oligonucleotide primer ERIC-R1 (Duan et al., 2009) was used. The reaction mixtures contained 1.52 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 40 pmol/µL of each primer, 1 U Taq DNA Polymerase, 1 × reaction buffer, and 100 ng DNA, in final volume of 25 µL. The amplification was performed in a thermal cycler, programmed with an initial cycle of 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 1 min at 92 °C, 1 min at 36 °C, and 8 min at 72 °C and by a final extension step of 16 min at 72 °C. The quality of the amplified products was analyzed on 1.5% agarose gel using the 1 kb Plus DNA Ladder marker. The dendrogram was constructed by the NTSYS-pc software (Numerical Taxonomy System, Version 2.0) from a binary matrix, based on the presence or absence of bands.

2.14. Statistical analysis

The experiments to determine the minimum inhibitory

Table 2
Characterization of the bacterial isolates: Identification by MALDI-TOF-MS, antibiotic resistance profiles, biofilm formation ability, minimal inhibitory concentration (MIC) of mercury (Hg^{2+}), hydrophobicity profile, and the presence of virulence genes and of mercury.

Isolates	Source of isolation	MALDI-TOF Identification	Score Value MS	MALDI-TOF	Antibiotic resistance	Category	MIC Hg^{2+} ($\mu g/ml$)	Hydrophobicity	Presence of genes
F2P2A	Cavouco stream (Point 2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2146		AMP, TET, TRI	MO	25	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F1P3C	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2064		AMP, TET, TRI	MO	25	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P3C	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2104		AMP	MO	25	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P3A	Cavouco stream (Point 3)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2136		AMP, TET, TRI	ST	12.5	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
F2P4A	Cavouco stream (Point 4)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2155		AMP	ST	12.5	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
UFPEDA396	Reference strain	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2146		AMP	ST	12.5	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
K5-A2	Rectal swab	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2364		AMP, CPM, CRX, CFL, MER, CFZ, TRI, IMP, CFO(O), CTX, NIT (0)	MO	25	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i>
K36-A2	Urethral secretion	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2410		AMP, CFZ, CPM, CRX, TET, TRI, CFO, CTX, NIT, GEN, NAL, CFL	ST	50	Hydrophilic	<i>cps</i> , <i>fimH</i> , <i>mrkD</i> , <i>merA</i>

AMP, Ampicillin; TET, Tetracycline; TRI, Trimetoprim; CPM, Cefepime; CRX, Cefuroxime; CFL, Cefalotine; MER, Meropenem; CFZ, Cefazolin; IMP, Imipenem; CFO, Cefoxitin; CTX, Cefotaxime; NIT, Nitrofurantoin; GEN, Gentamicine; NAL, Nalidixic acid. MO: moderate former. ST: strong former; virulence gene: *cps*, *fimH*, *mrkD*; metal gene: *merA*.

concentration of the mercury and formation of biofilm in the absence and presence of this metal were performed in quadruplicate and in three independent assays. The results were presented as mean values \pm the standard deviations (SD). Statistical analyses were performed by the ANOVA test and Student's *t*-test, using GraphPad Prism software.

3. Results

The identity of all isolates was confirmed as belonging to *K. pneumoniae* by MALDI-TOF. Score values varied between 2.104 and 2.410, indicating a high species compatibility level (Table 2). All environmental isolates were obtained from an impacted urban stream that presented values of 0.24 mg/kg of mercury in previous analyses (unpublished data).

Distinct resistance profiles were observed between the environmental and clinical isolates. Among the environmental isolates, two (F2P3C and F2P4A) presented resistance only to ampicillin, similar to that observed for the reference isolate UFPEDA396. The others (F2P2A, F1P3C, and F2P3A) were resistant to this antimicrobial as well as to tetracycline and trimethoprim. The clinical isolates presented a broader resistance profile, being resistant to multiple antibiotics of different classes. K5-A2 was resistant to 10 antimicrobials, while K36-A2 was resistant to 12 of the 15 antimicrobials tested (Table 2).

All isolates were able to form biofilms on Congo red agar. According to crystal violet staining, the environmental isolates F2P2A, F1P3C, and F2P3C and the clinical isolate K5-A2 were classified as moderate biofilm formers, while the others were strong biofilm formers. In addition, all isolates were considered hydrophilic, with CSH values of < 30%, and were positive for *cps*, *fimH*, and *mrkD* (Table 2); only the clinical isolate K36-A2 was positive for *merA*.

To assess the tolerance of the isolates to mercury, the MICs were determined. Mercury chloride presented a MIC value of 12.5 $\mu g/ml$ for UFPEDA396, F2P4A, and F2P3A and 25 $\mu g/ml$ for F2P2A, F1P3C, F2P3C, and K5-A2. A MIC value of 50 $\mu g/ml$ was found obtained for the clinical isolate K36-A2 (Table 2).

In addition, biofilm formation in the absence and presence of mercury was evaluated. All isolates showed different responses at sub-inhibitory concentrations (Fig. 1). An increase in biofilm formation of 70% and 42% was observed in treatments of UFPEDA396 with 6.25 and 3.125 $\mu g/ml$ of mercury chloride, respectively. Biofilm formation by F1P3C increased by 79%, 62%, and 53% at mercury chloride concentrations of 12.5, 6.25, and 3.125 $\mu g/ml$, respectively. However, the presence of mercury chloride did not significantly alter the biofilm formation of F2P2A and F2P3A. On the other hand, there was a 26% reduction in biofilm formation by F2P4A in the presence of 6.25 $\mu g/ml$ of mercury chloride, differentiating this isolate from the other environmental isolates. Among the clinical isolates, K36-A2 presented a 20% increase in biofilm formation after treatment with 12.5 $\mu g/ml$ of mercury chloride, whereas the biofilm formation by the K5-A2 suffered a 35% reduction at this same concentration of mercury chloride.

Among the isolates studied, three (UFPEDA396, F2P3A, and K36-A2) were selected for evaluation of biofilm structure by SEM in the absence (control) and in the presence of mercury at the concentration of 1/2 MIC (Fig. 2). Among the isolates investigated, it was observed that in the absence of the metal, the clinical isolate was the largest biofilm producer (Fig. 2E), while in the control presence (UFPEDA396), Fig. 2B. The results demonstrate that, in the absence of the metal, UFPEDA396 cells adhered strongly, with little extracellular matrix being observed (Fig. 2A). After exposure to mercury, the production of intense amounts of matrix was observed, indicating an increase in biofilm formation (Fig. 2B). No morphological changes in the cells were detected when treating the environmental isolate F2P3A with the metal; however, an increased amount of matrix was observed (Fig. 2D). The clinical isolate K36-A2 formed biofilm in the absence of mercury, with cells adhering to the surface and producing matrix; in the presence of mercury, a

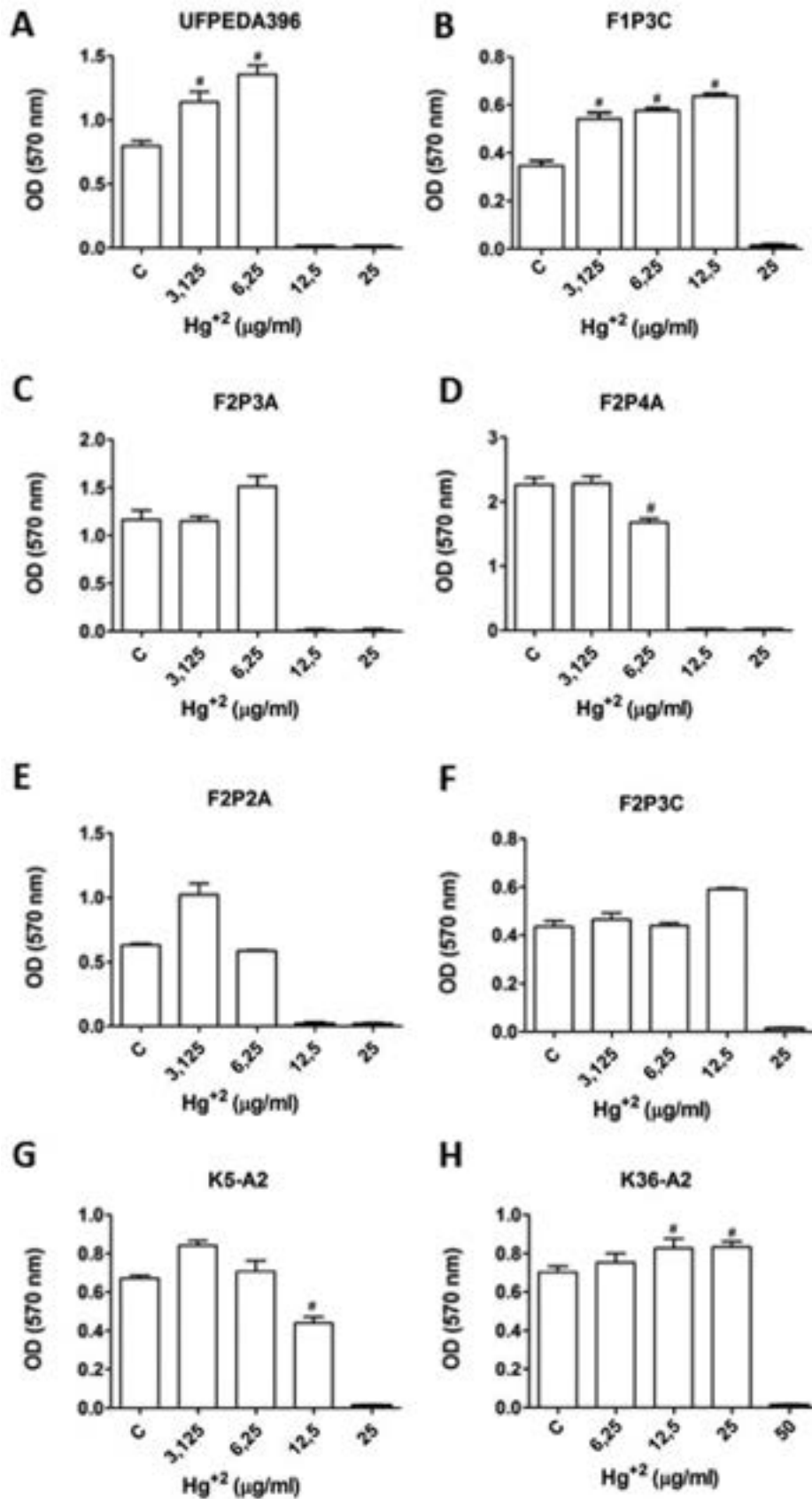


Fig. 1. Biofilm formation in the presence of mercury by reference (UFPEDA396), environmental (F2P2A, F1P3C, F2P3C, F2P3A, and F2P4A), and clinical (K5-A2 and K36-A2) isolates of *K. pneumoniae*. C: Control (absence of metal). # $p < 0.05$ compared to control.

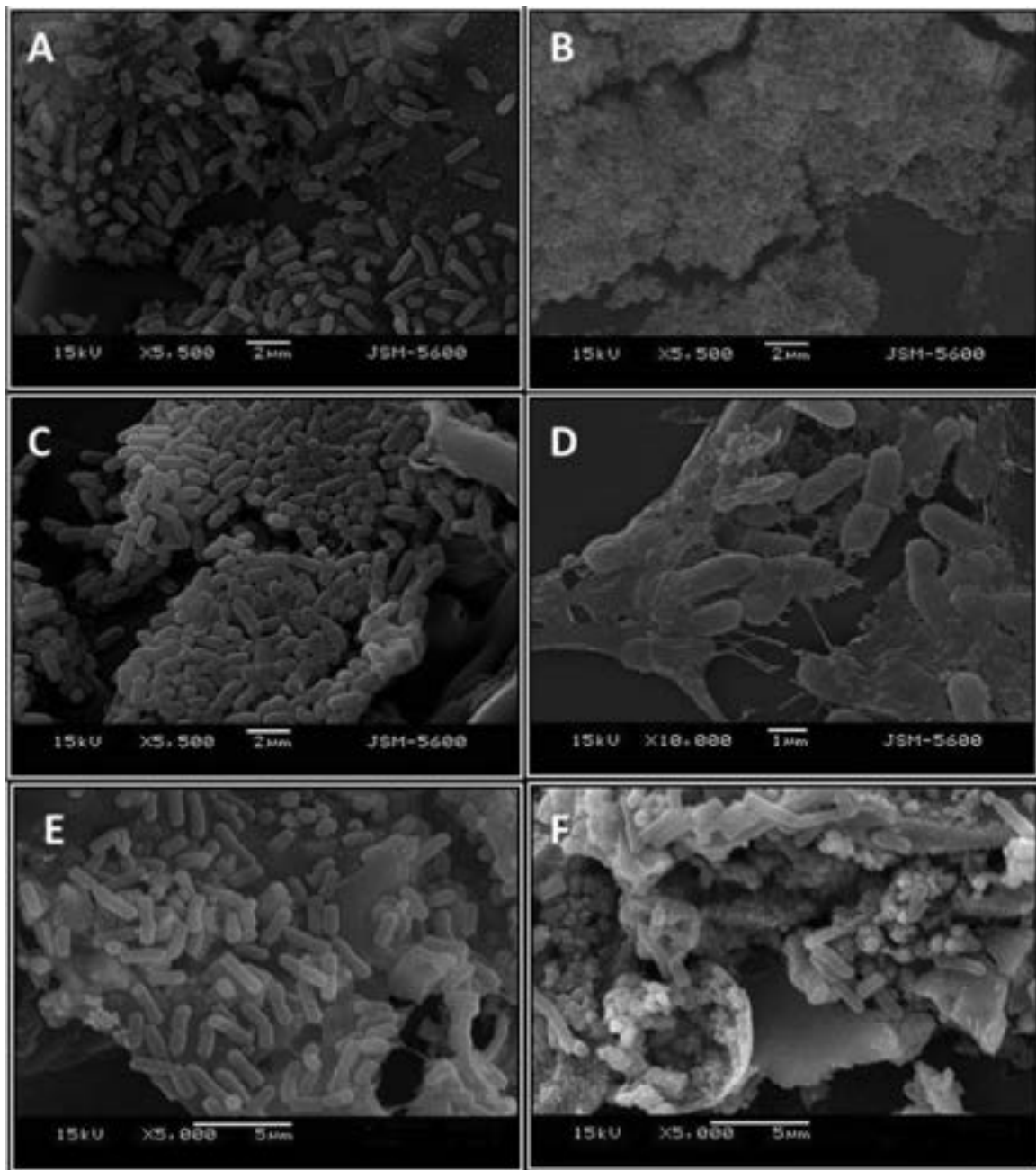


Fig. 2. Scanning electron microscopy image of biofilm formed in the presence and absence of mercury (Hg^{2+}) by isolates of *K. pneumoniae*. A – UFPEDA396 in absence of mercury (control); B - UFPEDA396 exposed to mercury at 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. C – F2P3A control; D – F2P3A exposed to mercury at 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E – K36-A2 control; F – K36-A2 exposed to mercury at 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

significant increase in extracellular matrix production was observed (Fig. 2E, F).

Using ERIC-PCR, different profiles were verified for all the isolates investigated, and the results showed a maximum similarity of approximately 50%, confirming the diversity among the isolates (Fig. 3).

4. Discussion

Confirmation of the taxonomic identity is often used to characterize microorganisms. The MALDI-TOF technique is a viable alternative for this purpose, since it is capable of generating single mass spectra for each microorganism analyzed and, therefore, it is considered reliable for the distinction of bacteria at the level of genus and species (Croxatto et al., 2012; Wattal et al., 2016; Sharma et al., 2017).

Distinct resistance profiles were observed for clinical and environmental isolates. Similar data are found in the literature and demonstrate that these profiles are related to the selective pressure in each environment (Runcharoen et al., 2017). The aquatic environment is considered efficient for the establishment of resistant bacterial populations, since it is prone to changes that exert a selective pressure, as well as constituting a medium for the dissemination of antimicrobial resistance genes (Woodford et al., 2014). However, the selective pressure seems to be lower than that found in hospital environments due to the therapeutic practice performed in clinics

(Runcharoen et al., 2017). It is possible to observe intrinsic resistance, which is present in bacteria independent of the selection pressure suffered or the environment. In the present work, all the clinical and environmental isolates were resistant to ampicillin,

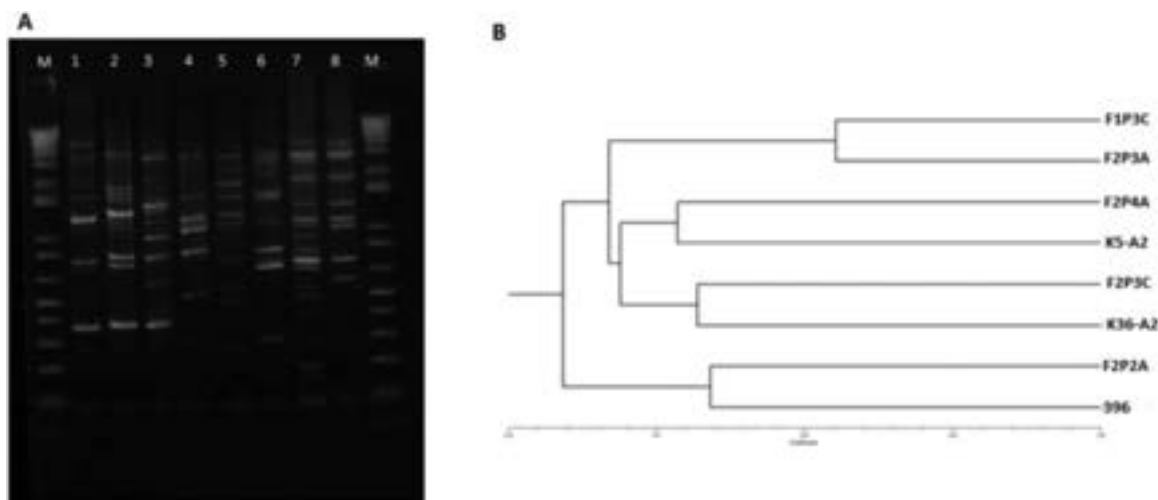


Fig. 3. Genetic diversity of *K. pneumoniae* isolated by ERIC-PCR. (A) Electrophoresis of PCR products. (B) Dendrogram of similarity generated by the NTSYS 2.0 software. M: Molecular marker; 1: F1P3C; 2: F2P3A; 3: F2P4A; 4: F2P2A; 5: F2P3C; 6: UFPEDA396; 7: K36-A2; 8: K5-A2.

corroborating data from the literature, indicating that this is an intrinsic characteristic of the genus *Klebsiella*, linked to the expression of β -lactamases encoded by chromosomal DNA (Struve et al., 2004; Melo et al., 2014). Resistance to tetracycline and trimethoprim was observed in the environmental isolates, which they possibly acquired in the impacted environment. Therefore, it can be concluded that the impacted environment also exerts a selective pressure on environmental bacterial isolates.

All *K. pneumoniae* isolates were classified as hydrophilic and showed to be moderate or strong biofilm formers. These data corroborate the study by Czerwonka et al. (2016), in which the authors correlate a low CSH with high capacity of biofilm production. External bacterial structures such as flagella, fimbriae, and capsules, are also important factors for the formation of biofilms (Ribeiro et al., 2016; Murphy et al., 2013). In *K. pneumoniae*, the polysaccharide capsule and fimbriae are structural components of the cell surface that play important roles in the survival and pathogenicity of this species, being related to adhesion to various surfaces and biofilm formation (Ribeiro et al., 2016). In the present study, the presence of the virulence genes *cps*, *fimH*, and *mrkD*, which codify the polysaccharide capsule and fimbriae types 1 and 3, was identified in all isolates, confirming their potential for biofilm formation, as well as their pathogenic potential.

The relationship between resistance to antimicrobials and heavy metals has been extensively discussed in the literature (Hahn et al., 2015; He et al., 2017). Bacteria develop some mechanisms to neutralize the toxicity of mercury, such as the enzymatic reduction of the mercuric ion (Hg^{2+}) to the volatile and less toxic elemental mercury (Hg^0). This reduction is catalyzed by the enzyme cytosolic mercury reductase (MerA), encoded by a *merA* gene belonging to the *mer* operon.

Studies have shown a frequent association between the *mer* operon and antimicrobial resistance (Baker-Austin et al., 2006; Mathema et al., 2011). Yang et al. (2018), when evaluating the association between heavy metal resistance genes and antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae, found that MIC values of mercury showed were higher for clinical isolates of *K. pneumoniae* positive for *merA*. In addition, a high frequency of antimicrobial resistance genes in these isolates was observed. Pérez-Valdespino et al. (2013) demonstrated that several clinical isolates of *Aeromonas* sp. that presented *merA* were resistant to different antibiotics such as tetracycline, trimethoprim, nalidixic acid, and streptomycin. Among the isolates tested in the present study, the clinical isolate K36-A2 was resistant to the highest number of antimicrobials, and the MIC value of mercury was four times higher than that of other isolates. In addition, this isolate was identified as the only carrier of *merA*, being in accordance with data from the literature

and suggesting a common mechanism of resistance to mercury and the antimicrobials tested.

Some studies have reported an increase in biofilm formation in the presence of different metals, such as nickel (Perrin et al., 2009), cadmium (Wu et al., 2015), and lead (Giovannella et al., 2017), among others. Giovannella et al. (2017) evidenced an increase in biofilm formation by a *Pseudomonas* sp. isolate in the presence of mercury (Hg^{2+}), being in line with our results, which showed a significant increase in biofilm production by most of the isolates at different sub-inhibitory concentrations of mercury. However, other studies have shown that, depending on the metal and its concentration, biofilm formation may be reduced (Conibe et al., 2013; Navarrete and De La Fuente, 2014), which we also observed in the case of isolates F2P4A and K5-A2 at concentrations of mercury of 6.25 and 12.5 $\mu g/mL$, respectively. These differences may be related to the fact that the effects of metals depend on their concentration and speciation (Jomova, Valko, 2011; Lemire et al., 2013; Wu et al., 2015), growth conditions, and intrinsic characteristics of the bacterial isolate (Booth et al., 2013; Tremarolli et al., 2008), demonstrating the bacteria response to stress. In *Pseudomonas pseudoalcaligenes* it was observed a divergence in the capacity of biofilm formation in different specimens (Booth et al., 2013).

A bacterial biofilm is usually embedded in a matrix of extracellular polymeric substance (EPS) (Flemming and Wingender, 2010; Sutherland, 1990), whose production is influenced by environmental factors, such as temperature, pH, medium composition, and concentration of heavy metals, among other factors (Mohite et al., 2017). Microorganisms respond to the presence of metals through several intrinsic mechanisms, among them the production of EPS. EPS acts as a protective layer against heavy metals either by binding metal ions or by delaying their diffusion into the biofilm (Pal and Paul, 2008). Sheng et al. (2010) demonstrated that heavy metals stimulate the production of EPS by *Rhodospseudomonas acidophila*, which is in line with our results, wherein an increase of EPS in biofilm formation was observed when exposing the bacteria to the action of Hg^{2+} , as visualized by SEM.

To prove the genetic diversity among the different isolates of *K. pneumoniae*, ERIC-PCR was used. ERIC sequences are located in extragenic regions of the bacterial genome and have been used for the characterization of bacteria because they are highly conserved. El-Badawy et al. (2017) demonstrated the efficacy of this technique for genotyping clinical isolates of *K. pneumoniae* obtained from different sources. Wasfi et al. (2016) compared this technique with RAPD and indicated that ERIC-PCR was more effective in the differentiation of the isolates and correlation with resistance profiles and virulence factors of *K. pneumoniae*. Additionally, Seifi et al. (2016) showed that ERIC-PCR

was efficient in detecting heterogeneity among isolates of this species. These works support our findings, confirming the genetic diversity detected for the isolates studied.

The ability of microorganisms to survive under stress conditions, such as the presence of heavy metals, depends on structural and biochemical attributes, as well as on physiological and/or genetic adaptations (Abou-Shanab et al., 2007). The results described in this study demonstrated the potential for adaptation and survival of *K. pneumoniae* isolates and demonstrate the importance of monitoring impacted aquatic environments, as they may harbor and disseminate bacterial pathogens.

5. Conclusion

The present study revealed that Hg^{2+} can act as a stress factor for clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae*, stimulating biofilm formation. The observed phenotypic differences are supported by the different genetic profiles, indicating the presence of distinct bacterial populations in the analyzed ecosystem. These are the first data on the effect of mercury on clinical and environmental isolates of *K. pneumoniae* and will aid in understanding the mechanisms of survival of this pathogen under adverse conditions.

Acknowledgements

We thank the Coordination for Improvement of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Brazilian agency and the FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) for funding this study.

References

- Abou-Shanab, R.A.I., Van Berkum, P., Angle, J.S., 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360–367.
- Ahmad, S., Abulhamd, A., 2015. Phenotypic and molecular characterization of nosocomial *K. pneumoniae* isolates by ribotyping. *Adv. Med. Sci.* 60 (1), 69–75.
- APHA, 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Aslam, F., Yasmin, A., Thomas, T., 2018. Essential gene clusters identified in *Stenotrophomonas MB339* for multiple metal/antibiotic resistance and xenobiotic degradation. *Curr. Microbiol.* 75 (11), 1484–1492.
- Azevedo, N.F., Cerca, N., 2012. Biofilmes: na Saúde, no Ambiente, na Indústria, 1. ed. Publindústria Edições Técnicas, Portugal.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., Mc Arthur, J.B., 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 14, 176–182.
- Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L.L., et al., 2016. Isolation and Characterization of Aquatic-Borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 426.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 355–384.
- Booth, S.C., George, I.F.S., Zannoni, D., Cappelletti, M., Duggan, G.E., Ceri, H., et al., 2013. Effect of aluminium and copper on biofilm development of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 and *P. fluorescens* as a function of different media compositions. *Metallomics* 5, 723–735.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), 2012. Resolução n 454, de 1 de novembro de 2012. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenuth-Jeanjean, S., Tournebise, R., Diancourt, L., Grimont, P., 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4, e4982.
- Chang, B.J., Huang, Y.J., Chan, C.H., Hsu, L., Peng, H.L., Chang, H.Y., Yew, T.R., Liu, C.H., Chi, S., 2006. Measurement of the adhesive force between a single *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria and collagen IV using optical tweezer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (1), 33–38.
- CLSI, 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Informant. Supplement - M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Conibe, P.A., Cruz, L.F., Navarrete, F., Ducan, D., Tygart, M., De La Fuente, L., 2013. *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm in planktonic cells. *PLoS One* 8, e54936.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 380–407.
- Czerwonka, G., Guzy, A., Kałuż, K., Grosicka, M., et al., 2016. The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Arch. Microbiol.*
- Davis, G.S., Waits, K., Nordstrom, L., Weaver, B., Aziz, M., et al., 2015. Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections. *Clin. Infect. Dis.* 61, 892–899.
- Dixit, R., Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U.B., et al., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability* 7, 2189–2212.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., et al., 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ. Res.* 109, 511–517.
- El-Badawy, M.F., Tawakol, W.M., El-Far, S.W., Maghrabi, I.A., Al-Ghamdi, S.A., Mansy, M.S., Ashour, M.S., Shohayeb, M.M., 2017. Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int. J. Microbiol.* 8050432.
- Fashola, M.O., Ngole-Jeme, V.M., Babalola, O.O., 2016. Heavy metal pollution from gold mines: environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 1047.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42 (8), 872–874.
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A.P., et al., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 162–169.
- Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., Forestier, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (8), 3710–3713.
- Jan, A.T., Azam, M., Choi, I., Ali, A., Mohd, Haq, Q.M.R., 2016. Analysis for the presence of determinants involved in the transport of Mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. *Braz. J. Microbiol.* 47, 55–62.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol* 283, 65–87.
- Kaplan, J.B., Lovetri, K., Cardona, S.T., Madhyastha, S., Sadovskaya, I., Jabbouri, S., Izano, E.A., 2012. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot.* 65, 73–77.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Micro* 11, 371–384.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., Zhou, D., 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 9 (9), 1071–1081.
- Li, L., Xia, Y., Zhang, T., 2017. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME J.* 11, 651–662.
- Linde, A.R., Arribas, P., Sanchez-Galan, S., Garcia-Vazquez, E., 1996. El (Anguilla anguilla) and Brown Trout (*Salmo trutta*) target species to assess the biological impact of trace metal pollution in freshwater ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 297–302.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Andrews, S., Venert, S., Naidu, R., Megharaj, M., 2017a. Bioaugmentation and nutrient amendment decrease concentration of Mercury in contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 576, 303–309.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Naidu, R., Andrews, S., Megharaj, M., 2017b. Mercury toxicity to terrestrial biota. *Ecol. Indic.* 74, 451–462.
- Mahbub, K.R., Subashchandrabose, S.R., Krishnan, K., Naidu, R., Megharaj, M., 2017c. Mercury alters the bacterial community structure and diversity in soil even at concentrations lower than the guideline values. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2163–2175.
- Mahbub, K.R., Bahar, M., Md, Megharaj, M., Labbate, M., 2018. Are the existing guideline values adequate to protect soil health from inorganic mercury contamination? *Environ. Int.* 117, 10–15.
- Mahbub, K.R., Krishnan, K., Megharaj, M., Naidu, R., 2016. Bioremediation potential of a highly mercury resistant bacterial strain *Sphingobium* SA2 isolated from contaminated soil. *Chemosphere* 7, 144–330.
- Martins, V.V., Zanetti, M.O.B., Pitondo-Silva, A., Stehling, E.G., 2014. Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Metal exclusion. Appl. Biochem. Biotechnol.* 17, 2591–2594.
- Mathema, V.B., Thakuri, B.C., Sillanpää, M., 2011. Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch. Microbiol.* 193, 837–844.
- Melo, R.C.A.M., Barros, E.M.R., Loureiro, N.G., Melo, H.R.L., Maciel, M.A.V., Lopes, A.C.S., 2014. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr. Microbiol.* 69, 824–831.
- Misra, T.K., Brown, N., Fritzing, D.C., Pridmore, R.D., Barnes, W.M., Haberstroh, L., Silver, S., 1984. Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operon including the regulatory region and the first two structural genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5975–5979.
- Mohite, B.V., Koli, S.H., Narkhede, C.P., Patil, S.V., 2017. Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183, 582–600.
- Murphy, C.N., Mortensen, M.S., Krogfelt, K.A., et al., 2013. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* 81, 3009–3017.
- Navarrete, F., De La Fuente, L., 2014. Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(10), 97–107.
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48 (1), 49–64.
- Pérez-Valdespino, A., Celestino-Mancera, M., Villegas-Rodríguez, V.L., Curiel-Quesada, E., 2013. Characterization of mercury-resistant clinical *Aeromonas* species. *Braz. J. Microbiol.* 44 (4), 1279–1283.

- Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., 2009. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1723–1733.
- Podschun, R., Ullmann, U., 1993. Bacteriocin typing of environmental *Klebsiella* isolates. *Zent. Hyg. Umweltmed.* 195, 22–26.
- Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (4), 589–603.
- Purificação-júnior, A.F., Araújo, L.C.A., Lopes, A.C.S., et al., 2017. Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. *Afr. J. Microbiol. Res.* 11, 1142–1149.
- Ribeiro, S.M., Cardoso, M.H., Cândido, E.S., Franco, O.L., 2016. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol.* 10–2217.
- Runcharoen, C., Moradugaravand, D., Bane, B., et al., 2017. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological link between clinical and environmental *Klebsiella*. *Genome Med.* 9, 2–10.
- Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., et al., 2016. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J. Microbiol.* 9.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q., Li, X.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28 (6), 882–894.
- Stahlhur, S.G., Struve, C., Krogfelt, K.A., Reisner, A., 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 ou type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65 (2), 350–359.
- Starostin, K.V., Demidov, E.A., Bryanskaya, A.V., et al., 2015. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci. Rep.* 5, 16989.
- Struve, C., Krogfelt, K.A., 2004. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ. Microbiol.* 6, 584–590.
- Sutherland, I.W., 1990. *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* 9 Cambridge University Press.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., Shankar, N., 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039.
- Tremarolli, V., Fedi, S., Turner, R.J., Ceri, H., Zannoni, D., 2008. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 upon biofilm formation on a polystyrene surface acquire a strong antibiotic resistance with minor changes in their tolerance to metal cations and metalloids oxyanions. *Arch. Microbiol.* 190, 29–39.
- Wasfi, R., Elkhatib, W.F., Ashour, H.M., 2016. Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Sci. Rep.* 6, 38929.
- Wattal, C., Oberoi, J.K., Goel, N., Raveendran, R., Khanna, S., 2016. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Woodford, N., Wareham, D.W., Guerra, B., Teale, C., 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 287–291.
- Wu, S.M., Liu, G., Jin, W.H., Xiu, O.Y., Sun, C.M., 2016. Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 7, 102.
- Wu, X., Santos, R.S., Fink-Gremmels, J., 2015. Cadmium modulates biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 2878–2894.
- Yamnina, B., Tahar, B., Laure, M.F., 2012. Isolation and screening of heavy metal resistant bacteria from wastewater: a study of heavy metal co-resistance and antibiotics resistance. *Water Sci. Technol.* 66 (2014-20).
- Yang, Q.E., Agouri, S.R., Tyrrell, J.M., Walsh, T.R., 2018. Heavy metal resistance genes are associated with bla_{NDM-1} and bla_{CTX-M-15} Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (5) (e02642-17).

Full Length Research Paper

Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health

Antonio Fernando da Purificação Júnior¹, Lívia Caroline Alexandre de Araújo², Ana Catarina de Souza Lopes³, Marcela de Araújo Sobral⁴, Gláucia Manoella de Souza Lima⁴, Márcia Vanusa da Silva⁵, Maria Tereza dos Santos Correia⁵ and Maria Betânia Melo de Oliveira^{5*}

¹Genetic, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

²Biological Science, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

³Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

⁴Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

⁵Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil.

Received 3 May, 2017; Accepted 7 July, 2017

Pollution of water bodies can cause environmental and public health problems. The Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe River, one of the main rivers in the state of Pernambuco, Brazil, and receives a high pollution load from residential, laboratory and hospital effluents. The aim of the present study was to perform phenotypic and molecular characterization in this stream, and evaluate the water quality using microbiological parameters. Water was collected from five sampling points, and bacterial species were identified using biochemical and molecular methods through 16S rRNA gene sequence analysis. Total and thermotolerant coliforms were also quantified. Fermenting Gram-negative bacilli from the family Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*), non-fermenting bacilli (*Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*) and Gram-positive bacilli (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Staphylococcus hominis*) were identified. A total of 25 bacterial isolates were phenotypically identified. All phenotypic identifications were confirmed by molecular analysis, except for *S. hominis*, which was molecularly identified as *Exiguobacterium*. Regarding water quality, all analyzed samples were positive for total and thermotolerant coliforms. The results obtained suggest that the Cavouco stream presents a potential risk for transmission of water-borne diseases, because of the presence of pathogenic bacteria. In addition, the current state of the stream also threatens the conservation of its native species.

Keywords: Public health, Enterobacteriaceae, thermotolerant, Bacilli.

INTRODUCTION

Aquatic ecosystems have suffered significant changes due to multiple environmental effects, resulting from the release of large quantities of effluent without prior treatment (International Joint Commission, 2015; USGS, 2015). This discharge can cause physical, chemical and

biological deterioration, and endangers both the resident aquatic organisms and public health. Scientific, technological and epidemiological advances have provided new tools for the assessment of water quality, both for human consumption and environmental

purposes (Tanchou, 2014).

In 2015, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reported that approximately 780 million people had no access to drinking water around the world. The consumption of contaminated water and lack of basic sanitation is estimated to cause 842,000 deaths per year worldwide, and 1,000 children under the age of five years die every day (WHO, 2014; WHO and UNICEF, 2015). Contaminated water carries pathogens that cause diarrhea, gastrointestinal disorders and systemic diseases, approximately 70% of diarrheal diseases could be avoided by improving basic sanitation (WHO, 2014). According to the Brazilian Ministry of Health, 6,715 deaths caused by diarrhea or gastroenteritis, presumably resulting from infection, were recorded between 2010 and 2015 (BRASIL, 2015).

Some studies have used traditional methods of selective isolation and cultivation to characterize the microbial communities of the affected environments (Skariyachan et al., 2013). However, taxonomic classification by these methods can be difficult because of variations in phenotypic characteristics (Woo et al., 2008). For this reason, molecular methods that allow fast and reliable confirmation of microbial identity have been developed (Ramírez-Castillo et al., 2015). Among these, methods using *16S rRNA* gene sequencing are predominant. This gene is used as a phylogenetic marker because its sequences are highly conserved (Srinivasan et al., 2015).

The aim of the present study was to evaluate the water quality by the isolation and identification of representative bacterial species present in this environment, using biochemical and molecular methods.

METHODS

Study area

The Cavouco stream, located at latitude 8°2'52.05"S and longitude 34°57'10.33" W, state of Pernambuco (UFPE), Brazil, is approximately 6 km long, and flows into the right margin of the Capibaribe River, one of the main rivers of state. Along its course, it receives pollutants from residential, laboratory and hospital waste, which reduces the water quality and threatens the aquatic life (Araújo and Oliveira, 2013; Freitas et al., 2016). Water samples (200 mL) were collected from five points (Figure 1) along the stream, according to the methods of Araújo and Oliveira (2013), and stored between 1 and 4°C until subsequent bacteriological analysis.

Isolation and phenotypic identification of bacterial isolates

For bacterial isolation, 50 µL of water was inoculated onto eosin

methylene blue (EMB) agar and 5% bovine blood agar (to count colony forming units), and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Gram staining was then performed to make presumptive identifications of the bacteria found according to the technique described by Koneman and Winn (2006).

Gram-negative isolates were preliminarily identified using the following biochemical tests: glucose, lactose and sucrose fermentation, hydrogen sulfide production, motility, indole production and citrate, lysine and urea degradation. Species identification was confirmed using the Kit API 20E (Biomérieux), according to the manufacturer's instructions.

Gram-positive isolates were preliminarily identified through colony morphology, hemolysis in blood agar, and presence/absence and position of spores, visualized through Gram staining. Species identification was confirmed using an automated system (BD Phoenix™ Automated Microbiology System).

Analysis of total and thermotolerant coliforms

For analysis of total and thermotolerant coliforms, water samples were collected from the water surface at a depth of 30 cm, from each of the five sampling points. The samples were stored between 1 and 4°C until analysis.

The presence and number of total and thermotolerant coliforms were determined using the multiple-tube fermentation method, and the results were expressed as most probable number (MPN) per 100 mL of sample, according to APHA (2015).

Molecular identification using *16S rRNA* gene sequence analysis

The bacterial samples were inoculated into 5 mL brain heart infusion (BHI) broth for 24 h at 37°C for to DNA extraction. Chromosomal DNA was extracted using the phenol-chloroform method (Sambrook and Russell, 2001). DNA quality was evaluated by electrophoresis in a 0.8% agarose gel using 0.5× TBE buffer and run at 100 V for 1 h; gels were analyzed using a UV transilluminator and photographed. DNA concentration was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

The *16S rRNA* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using the primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). PCR was performed in a final volume of 25 µL, containing 1× buffer, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA-polymerase (1 U/µL; Invitrogen), 10 pmol of each primer, and 10 ng of DNA template. The PCR was performed using a thermocycler (C1000 Thermal Cycler – BioRad), and the PCR program consisted of 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 45 s, primer annealing at 54°C for 45 s, extension at 72°C for 2 min, and a final extension at 72°C for 5 min.

PCR products were purified using the Pure Link purification kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and sequenced using the Big Dye Kit (Applied Biosystems) on an automated DNA sequencer (ABI 3100). The *16S rRNA* gene sequences obtained was compared with sequences deposited in the GenBank database (NCBI). The dendrogram was constructed using multiple sequence alignment, based on genetic distances, maximum parsimony, and maximum likelihood, using Molecular Evolutionary Genetic Analysis 5.2 software (MEGA5).

*Corresponding author: E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br or mbetaniam2008@gmail.com. Tel: +55 (81) 2126 8547 R. 229 Fax: +55 (81) 2126 8576.

Author(s) agree that this article remains permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

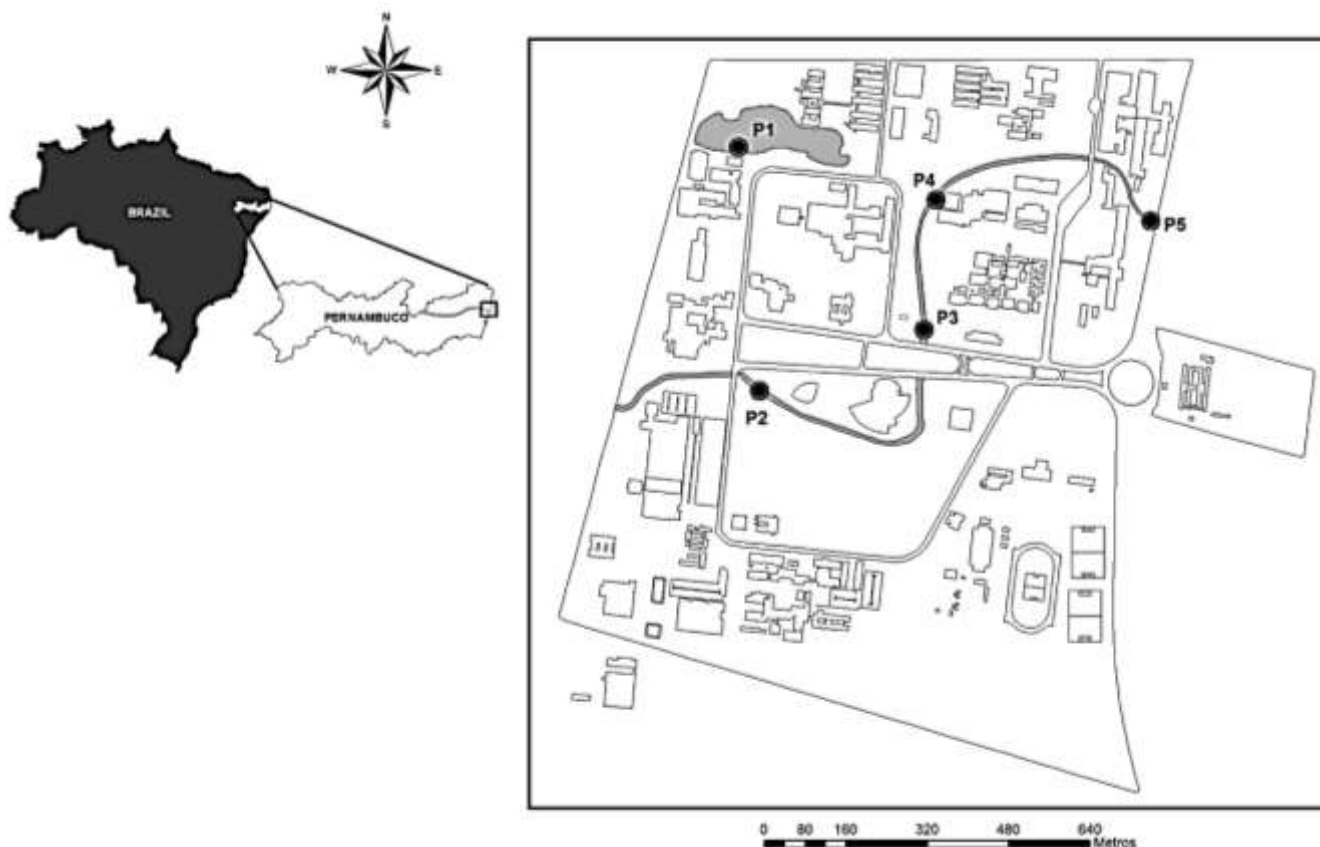


Figure 1. Representation of Cavouco creek area, Brazil, showing the five collection points (P1-P5) and microbial representatives obtained from each point.

Bacterial library of Cavouco stream – UFPE

Identified bacteria were stored in 80% glycerol (150 μ L of glycerol and 850 μ L of bacterial culture) at -80°C , and under pure mineral oil (Isofar) at ambient temperature. The isolates were labeled according to: C (Cavouco), P (sampling point), the number of sampling points, and the number of isolations.

RESULTS

Microscopic and biochemical identification of bacterial colonies

Inoculated blood agar presented innumerable colony forming units (CFU), except for water samples collected at the stream source (Point 1), for which only a few colonies were observed. Due to EMB medium selectivity, these plates presented an average of 200 CFU, with a lower number of CFUs observed for Point 1, and higher number for point 5 EMB plates presented colonies with metallic green sheen, dark center, some with bright or pink edges, and mucoid appearance. In blood agar, some colonies were shiny or gray, with or without beta-hemolysis, and with irregular edges. Microscopic examination of Gram-stained colonies revealed the presence of Gram-

negative and positive bacilli. Some Gram-positive bacilli were observed to be arranged in chains, filaments and spherical bodies. Approximately, 22 and 25 colonies were selected from the most frequent colonies present on EMB medium, and from blood agar, respectively.

A total of 25 isolates were identified phenotypically, belonging to seven genera (*Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*). Enterobacteria were present in all sampling points. *Proteus mirabilis* was highly prevalent among Gram-negative species (with eight isolates mostly from point 5), followed by *Escherichia coli* (six isolates), and *Klebsiella pneumoniae* (five isolates, from points 2, 3, and 4). Among the Gram-positive bacilli, the genus *Bacillus* was prevalent, with two species (*Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*) identified from point 4, and one (*Bacillus cereus*) from point 1. Another Gram-positive species, *S. hominis*, was identified from point 4 (Table 1).

Presence of total and thermotolerant coliforms

All analyzed samples were positive to total and thermotolerant coliforms, presenting an MPN $> 1.4 \times$

Table 1. Phenotypic and molecular identification of isolated bacteria from Cavouco stream collection points. ID: Identity. *Access number refer to sequences deposited in GenBank.

Points	Isolates	Phenotypic Identification		16S rRNA gene sequencing		
		API 20E (ID%)	BD Phoenix	Species	Similarity (%)	Accession*
P1	CP ₁ 1 _S	-	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	99	KT719668.1
	CP ₂ 3 _P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
P2	CP ₂ 4 _P	<i>Escherichia coli</i> (94.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₂ 2 _P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.8%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KM233642.1
P3	CP ₃ 5 _S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₃ 6 _S	<i>Pseudomonas putida</i> (44.5%)	-	<i>Pseudomonas</i>	99	JQ994361.1
	CP ₃ 8 _S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.9)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.1
	CP ₃ 9 _P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (98.1%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.1
	CP ₃ 13 _P	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.7%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	AB680212.11
	CP ₃ 7 _S	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₃ 10 _P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
	CP ₃ 11 _P	<i>Escherichia coli</i> (99.8%)	-	<i>Escherichia coli</i>	99	CP014225.1
P4	CP ₄ 14 _S	<i>Escherichia coli</i> (99.9%)	-	<i>Escherichia coli</i>	98	CP013837.1
	CP ₄ 16 _S	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.7%)	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99	KC524425.1
	CP ₄ 15 _S	<i>Enterobacter cloacae</i> (99.4%)	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	GU191924c.1
	CP ₄ 18 _S	-	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	KJ26873.1
	CP ₄ 19 _S	-	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Bacillus pumilis</i>	99	KJ526890.1
	CP ₄ 20 _P	-	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Exiguobacterium</i> spp.	99	KT074375.1
P5	CP ₅ 22 _S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KF811051.1
	CP ₅ 23 _S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 25 _S	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 26 _P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 27 _P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1
	CP ₅ 28 _P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	HQ169118.1
	CP ₅ 27 _P	<i>Proteus mirabilis</i> (99.9%)	-	<i>Proteus mirabilis</i>	99	KR150991.1

10³/100 mL.

Molecular identification using 16S rRNA gene analysis

The 16S rRNA gene sequences (approximately 1.500 bp) for the 25 selected isolates were aligned, and compared with sequences deposited in the GenBank database. The obtained sequences were found to have a high degree of genetic similarity (98-99%) with deposited sequences for the same species, confirming their phenotypic identification. Of the 25 isolates, only *S. hominis* did not display concordance between the phenotypic and molecular identification. This isolate was identified phenotypically as belonging to the genus *Staphylococcus*, but through molecular analysis, it revealed 99% similarity with the genus *Exiguobacterium* (Table 1). The phylogenetic tree showed clustering of 16S rRNA gene sequences obtained from the studied isolates with those from GenBank, confirming molecular identification (Figure 2).

Construction of the bacterial library of Cavouco

The bacterial library of Cavouco currently includes 21 Gram-negative and four Gram-positive species isolated from five sampling points, stored in frozen stocks under mineral oil. These are the first bacterial isolates of this environment, and the first representatives of the Bacterial Library of Impacted Environments of UFPE.

DISCUSSION

The analyses showed high water contamination of the Cavouco stream, located in Recife-PE, Brazil, with all samples containing thermotolerant coliforms. The presence of coliforms is a parameter evaluated for water quality monitoring programs and indicates the presence of potentially pathogenic microorganisms (WHO, 2014).

In the present study, the quantification of microbiological parameters indicated that all samples were unfit for human consumption and recreational use. The observed coliform levels were higher than those considered safe by

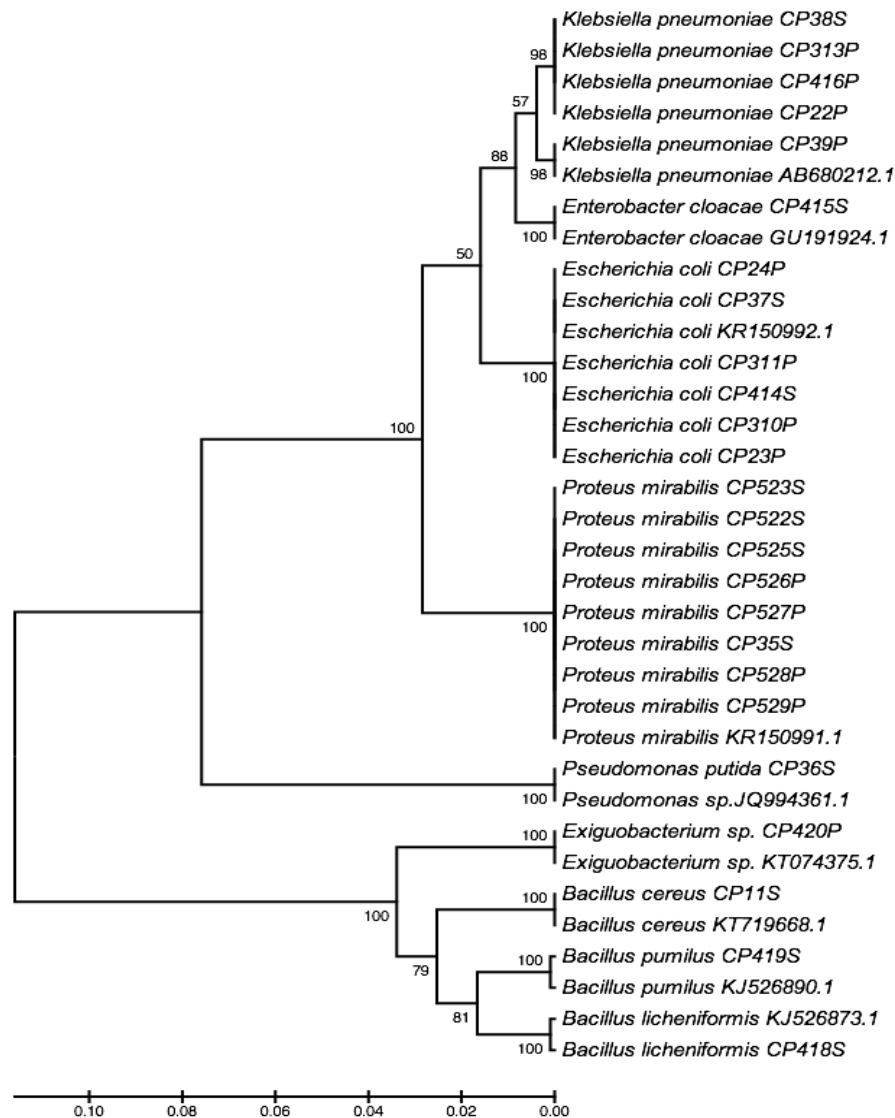


Figure 2. Similarity dendrogram generated from the comparison between the sequences of 16S rRNA strains isolated from collection points at Cavouco and the deposited ones in GenBank database.

the US Environmental Protection Agency (EPA), 2011 and the Brazilian Environmental Council (Normative Resolution N° 357/2005) (CONAMA, 2005), representing risk for human health.

Indications of significant pollution in the studied regions of the Cavouco stream had been previously observed. Araujo and Oliveira (2013) analyzed Cavouco stream water, and found changes in the levels of dissolved oxygen, ions and ammonia, as well as values of the Index of Water Quality for the Protection of Aquatic Life (IQAPVA) indicating low capacity for the maintenance of aquatic life.

Enterobacteria were present at all sampling points in the present study. Several studies have shown that most enterobacteria can cause infections because of their

ability to survive in hostile environments and their ability to develop resistance to antimicrobial drugs (Irengue et al., 2015; Tajbakhsh et al., 2015; Patel et al., 2016).

Several pipes located along the margins of the Cavouco stream discharge residential, hospital, and laboratory effluents into the stream, which explains the presence of bacteria of fecal origin. In addition, the existence of pastures for animal grazing and the development of other activities, together with the poor conservation state of the local riparian forest, could contribute to this microbiological water pollution.

Previous studies of affected environments have reported similar results. Rodrigues et al. (2009), evaluated the water quality of the Piracuama River, located in the state of São Paulo (SP), Brazil, and identified enterobacteria of

genera *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella* and *Shigella*. A study performed on a contaminated river in India also identified the presence of important pathogens for public health, namely *Edwardsiella* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. and *Staphylococcus* spp. (Skariyachan et al., 2013), with fecal coliforms being the most common pathogens in contaminated rivers and streams (Kim et al., 2013; Liu et al., 2015).

Escherichia coli was isolated from several sampling points of stream, is used as a specific indicator of fecal contamination in tropical and temperate regions (Páll et al., 2013). This species is considered one of the main causes of diarrhea in adults and children in developing countries, infection most often occurring through contact with contaminated water (Walker et al., 2007; Isidean et al., 2011) and is an important cause of urinary tract and wound infections and pneumonia in immunosuppressed hospitalized patients, and meningitis in newborn children (Wijetunge et al., 2015; Martelius et al., 2016).

Proteus spp. has been described as an important infectious agent in hospital environments (Chen et al., 2014; Murray et al., 2015). Bacteria from the genus, are commonly found in the environment, especially in locations with water pollution and soils with degraded material (Drzewiecka, 2016). A study performed in hospitals located in northeast Brazil, the same region as the present study, isolated *P. mirabilis*, which produces extended spectrum beta-lactamase (ESBL), have been reported to be an important cause of nosocomial infection in worldwide (Abreu et al., 2011). In the present study, this species was isolated in an area where there is discharge of hospital waste.

The genus *Klebsiella* is widely distributed in nature and in the gastro intestinal tract of humans and animals.. *K. pneumoniae* can also be found in the oropharynx of hospitalized patients, constituting a source of pulmonary infections, and usually occurring in patients with debilitating conditions such as alcoholism and diabetes (Distel et al., 2013). This species can also infect the urinary tract, cutaneous wounds, and blood, causing bacteremia, meningitis in infants, hepatic abscess, and urinary tract infections (Siu et al., 2012). This species has gained importance due to the development and inter-species and intra-species dis-semination of several antimicrobial resistance mechanisms, namely, the production of beta-lactamases such as ESBLs and KPC (*K. pneumoniae* Carbapenemase), which degrade beta-lactam antibiotics, frequently detected in hospitalized patients in Recife, PE, Brazil (Lopes et al., 2010; Cabral et al., 2012; Melo et al., 2014).

The presence of the genus *Bacillus* in the Cavouco stream is worrisome. The presence of *Bacillus* in food in amounts higher than 10^6 cells per gram indicates multiplication, and indicates a high health risk (Germano and Germano, 2003). Another interesting aspect was the

observed diversity of *Bacillus* species. This might indicate that the environmental conditions (nutrients, temperature, humidity, oxygen concentration, and pH) were favorable for the multiplication and maintenance of these species at the studied site.

Bacillus species can sporulate, and the resistance conferred by these spores constitutes an important problem for the epidemiology of associated infections. Because the Cavouco stream is a tributary of the Capibaribe River, which is used as a water source for local agriculture and fishing, the presence of *Bacillus* could contribute to food contamination.

Of the five sampling points, points 3 and 4 presented the highest microbial diversity, whereas point 5 yielded only one species, *P. mirabilis*. The absence of diversity at point 5, which receives the discharge of effluents from a morgue and hospital, may have been due to difficulty of isolating Gram-positive bacteria and the lack of selectivity of the blood agar used for bacterial cultures. Another possible explanation for the difficulty in isolating Gram-positive bacteria was the presence of high concentrations of toxic substances in hospital effluents, such as antibiotics, cytostatic agents, heavy metals, disinfectants and hormones, which could have a genotoxic effect on these bacteria (Jean et al., 2012; Devarajan et al., 2015).

Molecular tools were used in the present study to confirm the phenotypic identification of the 25 isolates. The *16S rRNA* gene is widely used as phylogenetic marker, and it has been sequenced for a large number of bacterial lineages (Srinivasan et al., 2015). Most of these sequences are deposited in the GenBank database (Benson et al., 2012), and can therefore be compared with sequences of new isolates.

For isolates belonging to different species, their *16S rRNA* gene sequences must share less than 97% similarity (Goebel and Stackebrandt, 1994). The sequences obtained in the present study shared 98% or higher similarity with sequences deposited in the GenBank database, confirming the phenotypic identification of all isolates, except for *S. hominis*, which presented 98% similarity with genus *Exiguobacterium*. This can be explained by the fact that both genera have very similar morphological and biochemical characteristics, such as motility, positive catalase and urease activity, negative phosphatase and coagulase activity, presence or absence of nitrate reduction, and acid production under aerobic conditions, and both contain aerobic and facultative anaerobic species (Stieglmeier et al., 2009). These colonies are spherical, opaque, butyrous or yellow-orange, growing at temperatures varying between 20 and 45°C (Schleifer et al., 1979; Collins et al., 1983). The similar morphological and biochemical characteristics of the two genera might have contributed to its initial identification as *Staphylococcus*. Similar results were reported by Elmaci et al. (2015), who observed a divergence in identification at the species level for 53.3% (81/152) of the tested lactic

acid bacteria isolates, identified phenotypically using the API CHL method and 16S rRNA gene sequence analysis. Bosshard et al. (2006) observed a discrepancy at the genus and species level for 20.6% (12/58) of the tested non-fermenting Gram-negative bacterial isolates, identified using API 20 NE and 16S rRNA gene sequence analysis. Both studies attributed this divergence to the similarity of morphological and biochemical characteristics of different taxonomic groups, making identification using phenotypical methods difficult, and confirming the specificity of molecular analysis.

The present results indicate that the Cavouco stream could significantly contribute to an increase in microbial pollution, presenting a potential risk of waterborne disease transmission, as genera of pathogenic bacteria were identified. In addition, the current state the Cavouco stream also threatens the conservation of its native species. Environmental cleaning actions such as the establishment of a sewage collection and treatment systems are urgently needed to improve the water quality of this and other affected aquatic environments, such as rivers, lakes and coastal areas. The obtained data enabled the establishment of a bacteria library, which will help to understand the evolution of impacted environment, in terms of environmental quality, overtime. The present study characterized a sample of cultured bacteria isolated from the studied area. In spite of the importance and relevance of this data for public health, it does not represent the totality of organisms present in the studied area.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Abreu AG, Marques SG, Monteiro-Neto V, Carvalho RM, Gonçalves AG (2011). Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing Enterobacteriaceae in Northeast Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44(4):441-446.
- APHA-American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2015). Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. American Public Health Association, 22 ed. Washington, DC, USA.
- Araujo MC, Oliveira MBM (2013). Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. *Rev. Ambient. Água* 8(3):247-257.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2012). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 40 (D1):D48-D53.
- Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Böddinghaus B, Altwegg M, Bötter EC (2006). 16S rRNA Gene Sequencing versus API 20 NE System and the VITEK 2 ID-GNB Card for identification of non-fermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44(4):1359-1366.
- BRASIL Ministério da Saúde (2015). DATASUS, informações de Saúde- Brasil. <http://tabnet.datasus.gov.br>
- Cabral AB, Melo RCA, Maciel MA, Lopes AC (2012). Multidrug resistance genes, including bla (KPC) and bla (CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45:572-578.
- Centers for Disease Control and Prevention- CDC (2015). Global Water, Sanitation, and Hygiene (WASH). <http://www.cdc.gov/healthywater/global/>.
- Chen P, Zhang L, Meng B (2014). Correlation between urinary stones and urinary tract infections. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 35:597-599.
- Collins MD, Lund BM, Farrow JAE, Schleifer KH (1983). Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 129:2037-2042.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (2005). Resolução 357. Diário Oficial da União, n. 53, 17 de março de 2005, Seção 1. Available in. P 58. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Conam.
- Devarajan N, Laffite A, Ngelikoto P, Elongo V, Prabakar K, Mubedi JI, Piana PT, Wildi W, Poté J (2015). Hospital and urban effluent waters as a source of accumulation of toxic metals in the sediment receiving system of the Cauvery River, Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22:12941-12950.
- Distel C, Jacobson S, Tille PM (2013). Alcohol induced diabetic ketoacidosis exacerbated by an acute respiratory infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Lab. Sci.* 26(2):68-71.
- Drzewiecka D (2016). Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microb. Ecol.* 72(4):741-758.
- Elmaci SB, Tokath M, Dursun D, Özçelik F, anlibaba P (2015). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiol.* 60:241-251.
- Environmental Protection Agency- EPA (2011). National Characteristics of Drinking Water Systems Serving 10,000 or Fewer People. <http://water.epa.gov/type/drink/pws/smallsystems/upload/REVFINAL-Nat-Characte-July-2011-508-compliant.pdf>
- Freitas JHES, Santana KV, Nascimento ACC, Paiva SC, Moura MC, Coelho LCCB et al. (2016). Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble Moringa oleifera seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. *Chemosphere* 163:133-141.
- Germano PML, Germano MIS (2003). Higiene E Vigilância Sanitária de Alimentos, Qualidade das Matérias Primas, Doenças transmitidas por alimentos e Treinamento de recursos humanos, 2nd ed. Varela, São Paulo, Brasil. 655p.
- Goebel BM, Stackebrandt E (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(5):1614-1621.
- International Joint Commission (2015). The Impact of Urban Development on Water Quality. <http://www.ijc.org/php/publications/html/12br/english/report/physical/iudwq.html>.
- Ireng LM, Kabego L, Kinunu FB, Itongwa M, Mitangala PN, Gala JL, Chirimwami RB (2015). Antimicrobial resistance of bacteria isolated from patients with bloodstream infections at a tertiary care hospital in the Democratic Republic of the Congo. *S. Afr. Med. J.* 105(9):752-755.
- Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK (2011). Porter A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. *Vaccine* 29:6167-6178.
- Jean J, Perrodin Y, Pivrot C, Trepo D, Perraud M, Droguet J, Tissot-Guerraz F, Locher F (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *J. Environ. Manage.* 103:113-121.
- Kim JY, Lee H, Lee JE, Chung MS, Ko GP (2013). Identification of human and animal fecal contamination after rainfall in the Han River, Korea. *Microbes Environ.* 28:187-194.
- Koneman EW, Winn WC (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th edn. Williams & Wilkins, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1565p.
- Liu WC, Chan WT, Young CC (2015). Modeling fecal coliform contamination in a tidal Danshuei River estuarine system. *Sci. Total. Environ.* 502:632-640.
- Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo RD, Ayala J (2010). bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 105:163-167.
- Martelius T, Jalava J, Kärki T, Möttönen T, Ollgren J, Lyytikäinen O

- (2016). Nosocomial bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins, Finland, 1999-2013: Trends, patient characteristics and mortality. *Infect. Dis. (Lond)*. 48:229-234.
- Melo RCA, Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Lopes AC (2014). Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr. Microbiol.* 69:824-831.
- Murray EC, Marek A, Thomson PC, Coia JE (2015). Gram-negative bacteraemia in haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30(7):1202-1208.
- Páll E, Niculac M, Kiss T, andru CD, Spînu M (2013). Human impact on the microbiological water quality of the rivers. *J. Med. Microbiol.* 62:1635-1640.
- Patel CB, Shanker R, Gupta VK, Upadhyay RS (2016). Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of *Enterobacter*: an emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable Water. *Front. Microbiol.* 7:172.
- Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL (2015). Waterborne pathogens: Detection methods and challenges. *Pathogens* 4(2):307-334.
- Rodrigues JDD, Jorge AOC, Ueno M (2009). Avaliação da qualidade das águas de dias áreas utilizadas para recreação do Rio Piraciamá-SP. *Revista Biociências.* 15:88-94.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory; 3 ed.
- Schleifer KH, Meyer SA, Rupprecht M (1979). Relatedness among coagulase-negative staphylococci: Deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. *Arch. Microbiol.* 122:93-101.
- Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY (2012). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 12:881-887.
- Skariyachan S, Lokesh P, Rao R, Kumar AU, Vasist KS, Narayanappa R (2013). A pilot study on water pollution and characterization of multidrug-resistant superbugs from Byramangala tank, Ramanagara district, Karnataka, India. *Environ. Monit. Assess.* 185:5483-5495.
- Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE* 10:e0117617.
- Stieglmeier M, Wirth R, Kminek G, Moissl-Eichinger C (2009). Cultivation of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria from Spacecraft-Associated Clean Rooms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(11):3484-3491.
- Tajbakhsh E, Tajbakhsh S, Khamesipour F (2015). Isolation and molecular detection of Gram negative bacteria causing urinary tract infection in patients referred to Shahrekord hospitals, Iran. *Iran Red Crescent Med. J.* 17(5):e24779.
- Tanchou V (2014). Review of Methods for the Rapid Identification of Pathogens in Water Samples—ERNICIP Thematic A = r² Chemical & Biological Risks in the Water Sector—Task 7, Deliverable 1. Institute for the Protection and Security of the Citizen Publications Office of the European Union, <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92395/lbna26881enn.pdf>.
- USGS-Science for a Changing World (2015). The Effects of Urbanization on Water Quality: Waterborne Pathogens. <http://water.usgs.gov/edu/urbanpath.html>.
- Walker RI, Steele D, Aguado T, Ad Hoc ETEC Technical Expert Committee (2007). Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 25:2545-2566.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.
- WHO (2014). Water Sanitation and Health. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases.
- WHO and UNICEF (2015). Lack of sanitation for 2.4 billion people undermining health improvements. <http://www.unicef.org/mz/en/unicef-who-lack-of-sanitation-for-2-4-billion-people-undermining-health-improvements>.
- Wijetunge DS, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Kariyawasam S (2015). Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC Microbiol.* 15(1):211.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:908-934.

Organizadores

Amanda Virgínia Barbosa
Sivoneide Maria da Silva
Francisco Henrique S. da Silva
Matheus Alves Siqueira de Assunção
Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANOS E TERAPIAS EMERGENTES

Vol. 03 – Vírus

São José dos Pinhais

LATIN AMERICAN PUBLICAÇÕES

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586f Silva, Sivoneide Maria

Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes / Sivoneide Maria da Silva. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2022.
354 p.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui: Bibliografia

ISBN: 978-65-996545-0-3

DOI: 10.47174/lap2020.ed.0000093

1. Infecções. 2. Vírus.

I. Silva, Sivoneide Maria. II. Silva, Francisco Henrique Santana. III. Barbosa, Amanda Virgínia. IV. Assunção, Matheus Alves Siqueira. V. Anjos, Fálba Bernadete Ramos. VI. Título.

Latin American Publicações
São José dos Pinhais – Paraná – Brasil
www.latinamericanpublicacoes.com.br/
editora@latianamericanpublicacoes.com.br

CAPÍTULO 12

CHIKUNGUNYA: DA EPIDEMIOLOGIA AO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Antonio Fernando da Purificação Júnior

Doutorando em Biociências e Biotecnologia em Saúde pelo Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil

E-mail: afpjr@outlook.com

Elisa Almeida Neves Azevedo

Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil

E-mail: elisaaalmeida@gmail.com

Roberto Dias Lins Neto

Pesquisador do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil

E-mail: roberto.lins@cpqam.fiocruz.br

Isabelle Freire Tabosa Viana

Pesquisadora do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil

E-mail: isabelle.viana@fiocruz.br

RESUMO: O vírus Chikungunya (CHIKV) é o membro clinicamente mais relevante do gênero *Alphavirus*. O CHIKV é um vírus reemergente transmitido por mosquitos, sendo então considerado um arbovírus. O CHIKV causa uma doença febril aguda, com erupções cutâneas, dores articulares e que, muitas vezes, evolui para uma manifestação crônica caracterizada por artralgia debilitante e artrite. Os programas de controle de mosquitos não são eficientes para combater todos os potenciais vetores do CHIKV e ainda não existem medidas profiláticas e terapêuticas específicas para esta infecção. Desta forma, o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico, monitoramento, antivirais e vacinas é essencial para reduzir o ônus da doença. Este capítulo apresenta o estado atual do conhecimento sobre a doença causada pela infecção do CHIKV, incluindo epidemiologia, apresentação clínica, diagnóstico, patogênese e desenvolvimento de vacinas.

PALAVRAS-CHAVE: Arbovírus, Alphavirus; Febre chikungunya; Vírus chikungunya; Patogênese; Epidemiologia; Diagnóstico e Tratamento.

ABSTRACT: Chikungunya virus (CHIKV) is the most clinically relevant member of the *Alphavirus* genus. CHIKV is a re-emergent virus transmitted by mosquitoes, and is therefore classified as an arbovirus. CHIKV infection mainly results in acute febrile illness, rash and often evolves to a chronic manifestation characterized by debilitating arthralgia and arthritis. As mosquito control programs are not sufficiently effective, antivirals and vaccines are essential to reduce the burden of the disease. However, there is no vaccine or specific antiviral treatment available to prevent or treat CHIKV infection, despite recent advances in these areas. This chapter assesses the literature and summarize the current state of knowledge about the disease associated with CHIKV, including clinical presentation, diagnosis, pathogenesis and the development of, vaccines.

KEYWORDS: Arbovirus; Alphavirus; Chikungunya fever; Virus Chikungunya; Pathogenesis; Epidemiology; Diagnosis; Treatment and Vaccines.

1. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (*Chikungunya virus* – CHIKV) é um arbovírus que pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, de relevante importância médica. É responsável por milhões de casos de infecções, relatados em todo o mundo e a transmissão do vírus permanece ativa em vários países no continente americano e africano (CDC, 2019). Esse vírus foi isolado pela primeira vez em 1952, na província de Tanganica, atual Tanzânia, com o indivíduo infectado apresentando dores articulares incapacitantes, febre intensa e erupção cutânea (KUCCHARZ, EUGENE J.; CEBULA-BYRSKA, ILONA, 2012; ROBINSON, 1955).

Diante da importância deste vírus para a saúde pública, este capítulo traz uma revisão de literatura estruturada de modo a abordar o estado atual do conhecimento sobre a doença associada ao CHIKV, incluindo epidemiologia, biologia do vírus, apresentação clínica, diagnóstico, fatores de risco para o desenvolvimento de doença grave, patogênese em humanos, tratamento e vacinas.

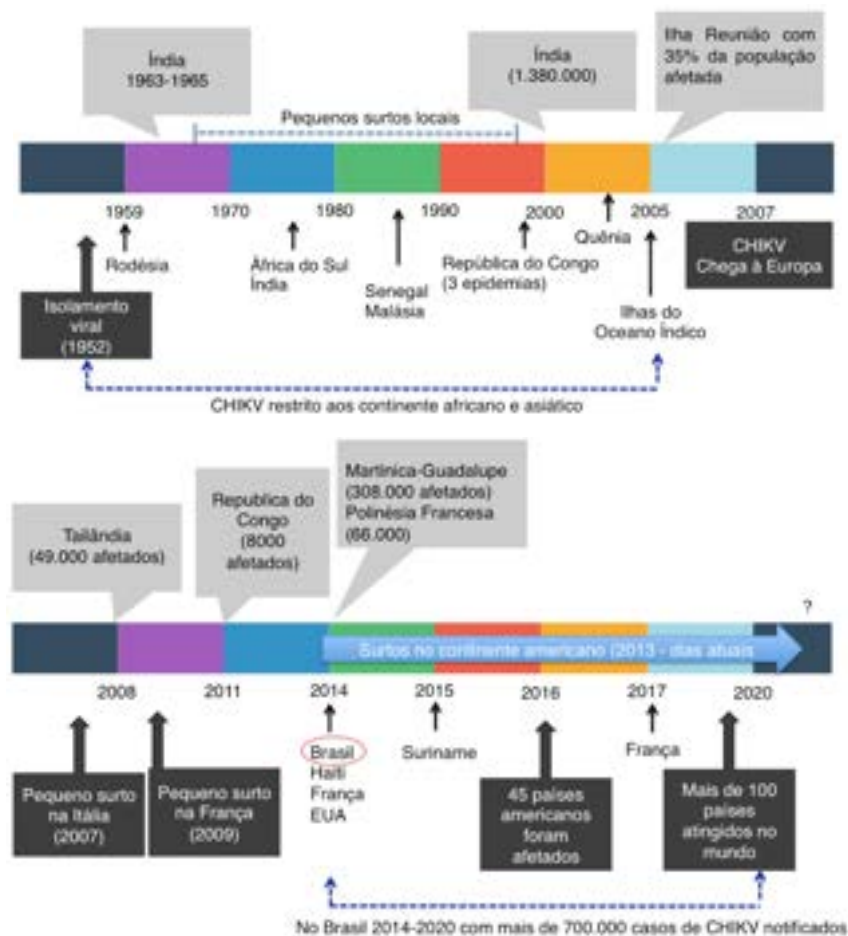
2. HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV

O CHIKV foi isolado em 1952 e a doença ganhou o nome de chikungunya que é derivada do verbo raiz de Makonde “kungunyala”, que significa “aquilo que se dobra”, referindo-se às posições distorcidas daqueles que foram afetados pelo início repentino e grave de uma artralgia (KUCCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I., 2012; ROBINSON, 1955). Uma característica distinta do CHIKV diz respeito à sua capacidade de causar surtos explosivos, depois de aparentemente desaparecer por vários anos ou décadas. Devido ao ressurgimento do CHIKV em 2004 (Figura 1), quase meio milhão de casos foram registrados em um surto ocorrido no Lamu Atoll, no Quênia. O vírus migrou para regiões próximas, afetando quase 1,5 milhões de pessoas (CAVRINI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010; YERGOLKAR *et al.*, 2006).

Em dezembro de 2013, foram reportados os primeiros casos autóctones de infecções por esse vírus nas Américas (Figura 1). Esse surto se espalhou rapidamente pelas Américas Central, do Sul e do Norte, onde as principais epidemias atingiram o seu pico em 2016 com aproximadamente 2 milhões de casos distribuídos em 45 países (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014; LOURENCO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). Até setembro de 2019, havia casos autóctones relatados em mais de 100 países distribuídos nas Américas, África, Europa e Ásia, um aumento alarmante e sem

precedentes afetando milhões de pessoas (CDC, 2019).

Figura 1. Linha do tempo dos principais surtos causados pelo CHIKV. Fonte: Adaptado pelo autor de (MASCARENHAS *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).



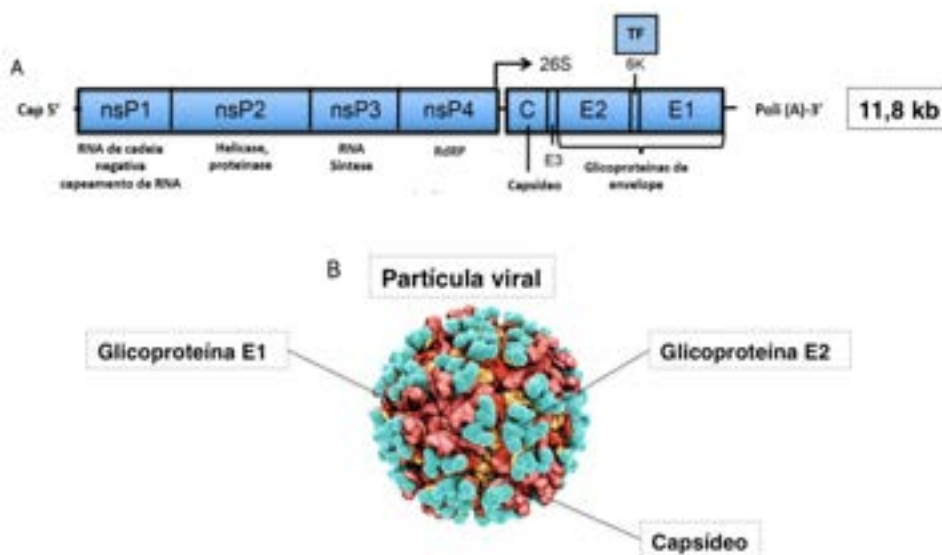
Fonte: Os autores.

As análises filogenéticas do CHIKV identificaram três linhagens principais: Linhagem da África Ocidental (*West Africa-WA*), Linhagem Leste, Central e Leste/Central/África do Sul (*East/Central/South African-ECSA*), Linhagem Asiática (VOLK *et al.*, 2010). Em 2004, uma epidemia da linhagem ECSA ressurgiu na África e no Oceano Índico e evoluiu para uma nova linhagem do Oceano Índico (IOL), que assolou esta região causando uma série de surtos explosivos e depois acometendo a Itália e a França (REZZA; WEAVER, 2019; VENTURI *et al.*, 2017; WEAVER; FORRESTER, 2015). Todas as linhagens de CHIKV constituem essencialmente um único sorotipo (95,2-99,8 % de identidade dos aminoácidos), e a imunidade de rebanho com proteção cruzada provavelmente regula a natureza periódica das principais epidemias (CHUA *et al.*, 2016; LANGSJOEN *et al.*, 2018; VOLK *et al.*, 2010).

3. GENOMA E ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

O CHIKV tem aproximadamente 65nm (nanômetros) de diâmetro, com nucleocapsídeo isosaédrico e envelopado. O genoma, RNA fita simples sentido-positivo de ~11.8kb de tamanho possui dois quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames- ORFs*) codificando duas poliproteínas: não-estrutural e estrutural (GANESAN *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2002) (Figura 2). A tradução da ORF codificando para as nsPs produz uma poliproteína que é clivada nas proteínas nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, que tem a função de replicar o genoma, modular funções celulares, e clivar a poliproteína (STRAUSS; STRAUSS, 1994). A sPs são traduzidas de um RNA subgenômico que é produzido pelo reconhecimento de um promotor interno pela replicase, produzindo um RNA intermediário de sentido-negativo. As sPs consistem na proteína do capsídeo, E3, E2, 6K/TF e E1 (GARMASHOVA *et al.*, 2007; STRAUSS; STRAUSS, 1994). As principais funções das proteínas virais estão sumarizadas na Tabela 1.

Figura 2. Organização genômica e estrutura da partícula do CHIKV. A – Organização do genoma e papéis funcionais dos quadros de leitura abertos da poliproteína não estrutural e estrutural, bem como do promotor subgenômico 26S. Durante a tradução, o ribossomo no gene da 6K muda para a posição -1 do quadro de leitura, levando à produção de proteína TF. B – Reconstrução microscópica crio-eletrônica de partículas semelhantes ao vírus CHIKV. Fonte: Adaptado pelo autor de: (ERASMUS; ROSSI; WEAVER, 2016).



Fonte: Os autores.

Tabela 1 - Principais funções das proteínas virais.

Proteína viral	Função
nsP1	Responsável pelo capeamento tanto do RNA viral genômico, quanto do RNA subgenômico 26S
nsP2	Envolvida na replicação viral
nsP3	Envolvida na replicação viral
nsP4	Responsável pela síntese de RNA viral
Capsídeo (C)	Envolvida em interações proteicas que inibem a tradução de proteínas da célula infectada
E1	Promove a fusão do envelope viral com a membrana endossomal da célula
E2	Interagem com moléculas de adesão celular para entrada viral
E3	Estabilização e maturação da glicoproteína E2
TF/6K	Mediam a permeabilidade da membrana e o brotamento viral

Fonte: Elaborado pelo autor.

4. TRANSMISSÃO VIRAL E PERMANÊNCIA EM FLUIDOS BIOLÓGICOS

Os mosquitos fêmeas são infectados após se alimentarem de um animal virêmico. Dois diferentes ciclos de transmissão existem para o CHIKV, o ciclo silvestre, visto principalmente na África, e o ciclo urbano que foi inicialmente visto na Ásia e atualmente presente em vários centros urbanos (COFFEY *et al.*, 2014).

Interessantemente, uma única mutação de Ala 226 para um resíduo de valina (A226V) na glicoproteína E1 aumentou a disseminação do CHIKV nos órgãos secundários dos mosquitos *Ae. Albopictus*, potencializando assim a disseminação viral (VAZEILLE *et al.*, 2007). As populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* continuam a se expandir devido a fatores como resistência a inseticidas e infraestrutura deficiente (Figura 3), baixo nível de informação e desenvolvimento urbano descontrolado (BAGNY *et al.*, 2009; SIMARD *et al.*, 2005).

Figura 3. Potencial criadouro artificial de mosquitos do gênero *Aedes* transmissores de arboviroses. Fotografia de um reservatório de água em residência da cidade do Recife sem a devida proteção a mosquitos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora a maioria das transmissões de CHIKV seja feita por mosquitos, casos de transmissão materno-fetal foram relatados e o maior risco para essa transmissão parece ser durante o parto (perinatal), podendo acarretar doenças graves do sistema nervoso central (SNC) que podem ser fatais (CONTOPOULOS-IOANNIDIS *et al.*, 2018; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009; GERARDIN; BARAU; *et al.*, 2008). O vírus foi também detectado no leite materno humano, porém sem evidências de transmissão do CHIKV pela amamentação (CAMPOS *et al.*, 2017). Similarmente, o vírus foi detectado no sêmen humano 30 dias após o início dos sintomas, indicando a possível transmissão sexual (BANDEIRA *et al.*, 2016).

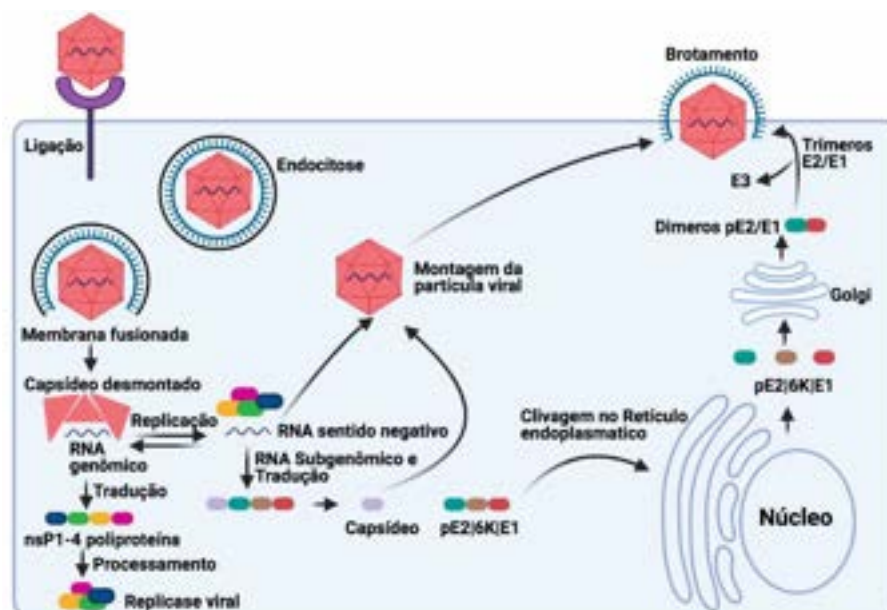
Assim, como ocorre com outras infecções por arbovírus, existe o risco de transmissão do CHIKV por transfusões de sangue (APPASSAKIJ *et al.*, 2013). Alguns relatos de transmissão durante transplante de órgãos sólidos também foram descritos na literatura, mas sem complicações ou óbitos dos transplantados (DALLA GASPERINA *et al.*, 2015; FORESTO *et al.*, 2019; GIRÃO *et al.*, 2017; KEE *et al.*, 2010).

5. CICLO DE REPLICAÇÃO NA CÉLULA DO HOSPEDEIRO

O primeiro passo na infecção envolve a ligação do vírus a um receptor da célula hospedeira (Figura 4). As glicoproteínas de membrana que estão associadas como trímeros de heterodímeros (E2-E1) na superfície viral medeiam a entrada na célula. Tanto o domínio A quanto o domínio B da proteína E2 contêm locais de ligação a receptores putativos (LI *et al.*, 2010; VOSS *et al.*, 2010).

Os receptores envolvidos com a infecção do CHIKV não são completamente compreendidos. A importância da molécula de adesão, MXRA8, para a infecção foi recentemente publicada. Todavia alguns outros candidatos foram apenas sugeridos e precisam ser melhores investigados, tais como proibitinas, glicosaminoglicanos, imunoglobulina da célula T da glicoproteína de superfície celular e a mucina 1 (TIM-1), fosfatidilserinas, integrinas e proteína de choque térmico (APTE-DESHPANDE *et al.*, 2014; BASORE *et al.*, 2019; FRAISIER *et al.*, 2014; MOLLER-TANK *et al.*, 2013; VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015; WINTACHAI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 4. Ciclo de replicação do CHIKV. O ciclo de replicação viral começa com a ligação da partícula do vírus a um dos fatores ou receptores de ligação expressos na superfície celular (1); Posteriormente, o vírus é internalizado via endocitose mediada por clatrina (2); Então, as moléculas de clatrina se dissociam da vesícula e o vírus é entregue aos endossomos e dentro do lúmen levemente ácido do endossomo, as glicoproteínas virais E2 e E1 sofrem grandes alterações conformacionais que levam à fusão da membrana (3); Posteriormente, o capsídeo é liberado e desmontado no citosol (4); O genoma viral é traduzido e replicado (5); A proteína C se junta a uma fita de RNA e há a montagem da partícula viral (6); As glicoproteínas sofrem processamento celular e se tornam maduras e prontas para compor o envelope viral (7); Na superfície da célula a partícula viral adquire o envelope (trímeros de E1-E2 e bicamada lipídica) quando acontece brotamento da célula e ocorre liberação da partícula viral madura. A replicação ocorre rapidamente (~4 h). Fonte: Adaptado pelo autor de (ABDELNABI *et al.*, 2015).



Fonte: Os autores.

6. SINAIS E SINTOMAS CLÍNICOS

A literatura aponta que ao contrário de muitas infecções arbovirais, como DENV e ZIKV, a maioria das infecções por CHIKV é sintomática (80 a 97%) (BURT *et al.*, 2012; GERARDIN; GUERNIER; *et al.*, 2008; POWERS, 2010; QUEYRIAUX *et al.*, 2008; SERGON *et al.*, 2007). O período de incubação é de 2 a 10 dias, após picada de mosquito infectado e depois acontece o aparecimento dos sintomas clínicos da doença, que pode ser dividido em fases aguda e crônica (BROUARD *et al.*, 2008; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Nas duas próximas sessões são detalhadas essas fases e também os sintomas atípicos.

6.1 Fase Aguda (primeiras três semanas)

A fase aguda da infecção pelo CHIKV, pode ser subdividida em estágios virais (antes do quinto dia após o início da doença) e de convalescença (dias 5-14) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A tríade clássica durante o estágio agudo da infecção

por esse vírus inclui uma doença febril de início abrupto, artralguas graves, muitas vezes debilitantes, e erupção cutânea (BURT *et al.*, 2017). A fase aguda é geralmente seguida por uma fase pós-aguda, geralmente a partir da quarta semana até o final do terceiro mês (SIMON *et al.*, 2015).

6.2 Fase Crônica (depois do terceiro mês)

Esta fase é caracterizada pela persistência de eventos inflamatórios iniciais, incluindo artralgia e artrite. Alguns estudos realizados após os surtos do CHIKV na Ilha da Reunião em 2006 e na Itália em 2007 mostraram a persistência de mialgia, astenia e artralgia em 60-67 % dos casos de 36 e 12 meses pós-infecção, respectivamente (MORO *et al.*, 2012; SCHILTE *et al.*, 2013). Revisões sistemáticas e metanálises concluíram que 30 % e 50 % dos pacientes podem sofrer artrite e fadiga debilitantes por anos (EDINGTON *et al.*, 2018; PAIXÃO *et al.*, 2018). A artralgia afeta múltiplas articulações na maioria dos casos acomete as extremidades como mãos e tornozelos (MORO *et al.*, 2012; SCHILTE *et al.*, 2013).

A doença crônica tem sido associada à replicação persistente do vírus nas células alvo e/ou ao estabelecimento de um mecanismo inflamatório auto-sustentado que leva ao dano tecidual. Dezoito meses após o início da doença, 40 % dos pacientes ainda apresentam IgM anti-CHIKV (QUEYRIAUX *et al.*, 2008). No entanto, os mecanismos exatos subjacentes à persistência do CHIKV em santuários de tecidos ainda são pouco compreendidos e mais estudos em modelos animais e investigações clínicas são necessários para resolver esse problema (HOARAU *et al.*, 2010).

6.3 Outros sintomas

A maioria dos adultos que sofrem da doença grave são idosos e tem condições médicas subjacentes (QUEYRIAUX *et al.*, 2008; ROBIN *et al.*, 2008). Outras complicações associadas ao CHIKV, do mais comum ao menos comum, incluem insuficiência respiratória, descompensação cardiovascular, meningoencefalite, hepatite aguda grave, efeitos cutâneos graves, outros problemas do sistema nervoso central e insuficiência renal (QUEYRIAUX *et al.*, 2008; ROBIN *et al.*, 2008; SANTHOSH *et al.*, 2008; SIMON *et al.*, 2008). Ainda a doença pode incluir sequelas como astenia e alterações de humor, que deterioram ainda mais a qualidade de vida do indivíduo (QUEYRIAUX *et al.*, 2008).

7. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR CHIKV

O diagnóstico clínico não diferencia de maneira confiável as infecções por CHIKV de outras etiologias, como outros alfavírus (MAYV, ONNV) e flavivírus (mais comumente DENV e ZIKV) (Tabela 2). Os desfechos clínicos desses três vírus são diferentes, portanto, um diagnóstico específico é importante.

Tabela 1 - Sinais e sintomas que podem contribuir no diagnóstico diferencial entre dengue, chikungunya e zika.

Sinais e sintomas	Arbovírus		
	Chikungunya	Dengue	Zika
Febre	>38 °C (2–3d ^a)	>38 °C (4–7 ^d)	≤38 °C (1-2 ^d)
Erupção cutânea	++ (d2-d5 ^b)	++ (d4 ^c)	++ (d1-d2 ^d)
Prurido	+ / ++	+ / +++	++ / +++
Mialgia	+	+++	++
Artralgia	+++	+	++
Dor retroorbital	+ / -	+++	+ / -
Conjuntivites	+	+ / -	++ / +++
Sangramento da pele	+ / -	++	+ / -
Inchaço nas articulações	++ / +++	+ / -	+
Dor de cabeça	++	+++	++
Diarréia	+ / -	++	+ / -
Complicações neurológicas	++	+	+++
Linfadenopatia	++	+	+++
Discrasia hemorrágica	+	++	-

^a Duração da febre em dias; ^b Início de erupção cutânea em 50 % dos casos; ^c Início de erupção cutânea em 30–50 % dos casos; ^d Início de erupção cutânea em 100 % dos casos. Fonte: Adaptado pelo autor de (BRITO; CORDEIRO, 2016).

O vírus provoca um alta viremia sendo assim facilmente identificado seu material genético por métodos moleculares, logo no início da infecção. Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) podem ser usados para confirmar a presença de anticorpos anti-CHIKV, com os níveis de imunoglobulina M (IgM) mais altos de três a cinco semanas após a infecção e persistindo por até dois meses. Passado o período agudo, os níveis de imunoglobulina G (IgG) persistem por anos. Um interessante achado sobre na doença articular crônica provocada por esse vírus, são IgM positiva e presença de RNA viral nas articulações (QUEYRIAUX *et al.*, 2008; TANABE *et al.*, 2018).

8. VACINAS CONTRA CHIKV

As estratégias atuais para o desenvolvimento de vacinas para CHIKV incluem: vacinas virais inativadas, vacinas de subunidade, vacinas de vírus vivo atenuado, vacinas recombinantes com vetor de vírus, vacinas quiméricas, vacinas de partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles* – VLP) e vacinas de ácido nucleico (Tabela 3).

Tabela 3 - Vacinas contra o CHIKV em desenvolvimento clínico.

Nome	Fase de desenvolvimento	Antígeno/alvo	Plataforma	Quantidade de doses requeridas	Fabricante
Vacina Inativada					
USAMRIID (HARRISON <i>et al.</i> , 1971; WHITE <i>et al.</i> , 1972)	1	Vírus inteiro	Inativado por formalina, cultivado em células renais de macaco verde ou células embrionárias de galinhas	1 ou 2 doses	United States USAMRIID
BBV87 (KUMAR <i>et al.</i> , 2012; TIWARI <i>et al.</i> , 2009)	1	Vírus inteiro	Inativado por formalina cultivado em células renais de macaco verde	2 doses	Bharat Biotech International, Ltd, Índia
Partícula semelhante a vírus (VLP)					
VLP-NIH (VRC-CHKVLP059-00-VP) (AKAHATA <i>et al.</i> , 2010; CHEN <i>et al.</i> , 2020; TIWARI <i>et al.</i> , 2009)	2	C-E3-E2-6K-E1	VLPs produzidas a partir de DNA transfectado em células embrionárias de rim humano (derivada de HEK-293)	3 x (10, 20 ou 40 µg)	NIAID/ Emergent BioSolutions
Viva atenuada ou vetor					
181/clone25 (TSI-GSD-218) (EDELMAN <i>et al.</i> , 2000; LEVITT <i>et al.</i> , 1986)	2 (interrompida)	Vírus inteiro	Atenuação por passagens seriadas em células MRC5 de placa em placa	(1 dose) 5 log ₁₀ PFU	USAMRIID/ Salk Institute for Biological Studies
Δ5nsP3 VLA1553 (HALLENGÅRD <i>et al.</i> , 2014; ROQUES <i>et al.</i> , 2017)	1	Vírus inteiro (exclusão de 180 nucleotídeos do gene da nsP3)	Atenuação por exclusão de uma grande porção (180 nucleotídeos) da região do gene da replicase nsP3	10 ⁵ PFU, dose única	Valneva Austria GmbH
MV-CHIK (REISINGER <i>et al.</i> , 2019; ROSSI <i>et al.</i> , 2019)	2	Proteínas estruturais do CHIKV com as do vírus do sarampo	Vírus recombinante do sarampo (cepa de Schwartz) expressando VLP do CHIKV	5 x 10 ⁴ , 5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ , duas doses	Themis Bioscience GmbH
ChAdOx1 – CHIK (CAMPOS <i>et al.</i> , 2019; LÓPEZ-CAMACHO <i>et al.</i> , 2019)	1	C, E3, E2, 6K e E1	Adenovírus recombinante que expressa genes estruturais da poliproteína de CHIKV	1 dose (10 ⁸ unidades infecciosas)	Jenner Institute, University of Oxford
Ácidos nucleicos					

mRNA VAL-181388 (GOYAL <i>et al.</i> , 2018; SCHRAUF <i>et al.</i> , 2020)	1	Poliproteína estrutural	Plataforma de mRNA que instruir as células hospedeiras a expressar antígenos virais para gerar anticorpos	Dose única (100 µg de mRNA-1388 – 100% de soroconversão)	Moderna Therapeutics, USA e Defense Advanced Research Projects Agency
-------------------------------------------------------------------------------	---	-------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------

Fonte: Adaptado de (ERASMUS *et al.*, 2016; REZZA; WEAVER, 2019; SCHRAUF *et al.*, 2020).

9. CONCLUSÕES

- O vírus Chikungunya (CHIKV) causa uma doença febril aguda caracterizada por artralgia debilitante e que pode se cronicar. Além disso, quadros neurológicos e óbitos têm sido relatados, principalmente em idosos e neonatos.
- CHIKV é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*.
- As glicoproteínas virais E1 e E2 são cruciais para infecção celular por interagirem com moléculas de adesão celular e promoverem a entrada viral.
- Os métodos de diagnóstico laboratoriais são importantes para diferenciar esta arbovirose de outras, tendo em vista que os sintomas clínicos das infecções causadas por arbovirus co-circulantes (ex: DENV e ZIKV) são muito similares.
- Esforços recentes de desenvolvimento de vacinas incluem formulações de vírus inativados, subunidades recombinantes, DNA, vetores adenovirais e partículas semelhantes a vírus, contudo, ainda não há vacina disponível para uso humano.
- Dada a inexistência de vacinas ou tratamentos anti-virais específicos, a prevenção da infecção por CHIKV através da melhoria das condições sanitárias da população e redução dos focos de reprodução dos mosquitos vetores são as melhores estratégias para mitigar o avanço das epidemias.
- Apesar das características inerentes à infecção por CHIKV, tais como a rápida expansão global e doença grave associada, as pesquisas envolvendo os aspectos básicos da infecção, bem como o desenvolvimento de ferramentas aplicáveis ao diagnóstico, monitoramento, prevenção e tratamento, ainda apresentam lacunas. A resolução destas é de suma importância para evitar futuras epidemias e seu impacto na saúde pública.

REFERÊNCIAS

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, 121, p. 59-68, Sep 2015.

AKAHATA, W. *et al.*, A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nature Medicine**, 16, n. 3, p. 334-338, Mar 2010.

APPASSAKIJ, H. *et al.*, Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion**, 53, n. 10 Pt 2, p. 2567-2574, Oct 2013.

APTE-DESHPANDE, A. D. *et al.*, *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, 139, n. 5, p. 762-768, May 2014.

BAGNY, L. *et al.*, Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. **Journal of Medical Entomology**, 46, n. 6, p. 1541-1545, Nov 2009.

BANDEIRA, A. C. *et al.*, Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, 6, p. 100-103, 2016.

BASORE, K. *et al.*, Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, 177, n. 7, p. 1725-1737.e1716, 06 2019.

BRITO, C. A.; CORDEIRO, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49, n. 5, p. 537-543, 2016 Sep-Oct 2016.

BROUARD, C. *et al.*, Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. **Transfusion**, 48, n. 7, p. 1333-1341, Jul 2008.

BURT, F. J. *et al.*, Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, 17, n. 4, p. e107-e117, 04 2017.

BURT, F. J. *et al.*, Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, 379, n. 9816, p. 662-671, Feb 2012.

CAMPOS, G. S. *et al.*, First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 36, n. 10, p. 1015-1017, Oct 2017.

CAMPOS, R. K. *et al.*, A Single and Un-Adjuvanted Dose of a Chimpanzee Adenovirus-Vectored Vaccine against Chikungunya Virus Fully Protects Mice from Lethal Disease. **Pathogens**, 8, n. 4, 11 2019.

CAVRINI, F. *et al.*, Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 3, n. 10, p. 744-752, Dec 15 2009.

CDC. **Geographic distribution, where has Chikungunya Virus been found?** , 2019. Acesso em: 3 de junho de 2020.

CHEN, G. L. *et al.*, Effect of a Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, 323, n. 14, p. 1369-1377, 04 2020.

CHUA, C. L. *et al.*, Antigenic Variation of East/Central/South African and Asian Chikungunya Virus Genotypes in Neutralization by Immune Sera. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10, n. 8, p. e0004960, 08 2016.

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

CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. *et al.*, Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 12, n. 6, p. e0006510, Jun 2018.

DALLA GASPERINA, D. *et al.*, Chikungunya infection in a human immunodeficiency virus-infected kidney transplant recipient returning to Italy from the Dominican Republic. **Transplant Infectious Disease**, 17, n. 6, p. 876-879, Dec 2015.

ECONOMOPOULOU, A. *et al.*, Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. **Epidemiology & Infection**, 137, n. 4, p. 534-541, Apr 2009.

EDELMAN, R. *et al.*, Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 62, n. 6, p. 681-685, Jun 2000.

EDINGTON, F.; VARJÃO, D.; MELO, P. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: A systematic review of the literature and meta-analysis. **Joint Bone Spine**, 85, n. 6, p. 669-678, 12 2018.

ERASMUS, J. H.; ROSSI, S. L.; WEAVER, S. C. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, 214, n. suppl 5, p. S488-S496, Dec 2016.

FORESTO, R. D. *et al.*, Chikungunya in a kidney transplant recipient: a case report. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 41, n. 4, p. 575-579, 2019 Oct-Dec 2019.

FRAISIER, C. *et al.*, Kinetic analysis of mouse brain proteome alterations following Chikungunya virus infection before and after appearance of clinical symptoms. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e91397, 2014.

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

GARMASHOVA, N. *et al.*, The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. **Journal of Virology**, 81, n. 5, p. 2472-2484, Mar 2007.

GERARDIN, P. *et al.*, Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLOS Medicine**, 5, n. 3, p. e60, Mar 18 2008.

GERARDIN, P. *et al.*, Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infectious Diseases**, 8, p. 99, Jul 28 2008.

GIRÃO, E. S. *et al.*, Chikungunya Infection in Solid Organ Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, 49, n. 9, p. 2076-2081, Nov 2017.

GOYAL, M. *et al.*, Recent development in the strategies projected for chikungunya vaccine in humans. **Drug Design, Development and Therapy**, 12, p. 4195-4206, 2018.

HALLENGÄRD, D. *et al.*, Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. **Journal of Virology**, 88, n. 5, p. 2858-2866, Mar 2014.

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

HOARAU, J. J. *et al.*, Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, 184, n. 10, p. 5914-5927, May 2010.

KEE, A. C.; YANG, S.; TAMBYAH, P. Atypical chikungunya virus infections in immunocompromised patients. **Emerging Infectious Diseases journal**, 16, n. 6, p. 1038-1040, Jun 2010.

KHAN, A. H. *et al.*, Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, 83, n. Pt 12, p. 3075-3084, Dec 2002.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, 23, n. 4, p. 325-329, 2012/06/01/ 2012.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, 23, n. 4, p. 325-329, Jun 2012.

KUMAR, M.; SUDEEP, A. B.; ARANKALLE, V. A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. **Vaccine**, 30, n. 43, p. 6142-6149, Sep 2012.

KUMAR, N. C. *et al.*, D. Association of ABO blood groups with Chikungunya virus. **Virology Journal**, 7, p. 140, Jun 25 2010.

LANGSJOEN, R. M. *et al.*, Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. **mBio**, 9, n. 2, 03 2018.

LEPARC-GOFFART, I. *et al.*, Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, 383, n. 9916, p. 514, Feb 8 2014.

LEVITT, N. H. *et al.*, Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. **Vaccine**, 4, n. 3, p. 157-162, Sep 1986.

LI, L. *et al.*, Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, 468, n. 7324, p. 705-708, Dec 2 2010.

LÓPEZ-CAMACHO, C. *et al.*, Assessment of Immunogenicity and Neutralisation Efficacy of Viral-Vectored Vaccines Against Chikungunya Virus. **Viruses**, 11, n. 4, 04 2019.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11, n. 6, p. e0005698, Jun 2017.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento de casos de arboviroses transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, febre e zika) até uma Semana Epidemiológica** 20, 2020. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/May/23/Boletim-epidemiologico-SVS-21.pdf>. Acesso em: 25 de maio de 2020.

MOLLER-TANK, S. *et al.*, Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. **Journal of Virology**, 87, n. 15, p. 8327-8341, Aug 2013.

MORO, M. L. *et al.*, Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. **Journal of Infection**, 65, n. 2, p. 165-172, Aug 2012.

PAIXÃO, E. S. *et al.*, Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 112, n. 7, p. 301-316, 07 2018.

POWERS, A. M. Chikungunya. **Clinics in Laboratory Medicine**, 30, n. 1, p. 209-219, Mar 2010.

QUEYRIAUX, B. *et al.*, Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, 8, n. 1, p. 2-3, Jan 2008.

REISINGER, E. C. *et al.*, Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored chikungunya virus vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. **The Lancet**, 392, n. 10165, p. 2718-2727, 12 2019.

REZZA, G.; WEAVER, S. C. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 13, n. 1, p. e0006919, Jan 2019.

ROBIN, S. *et al.*, Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **Journal of Child Neurology**, 23, n. 9, p. 1028-1035, Sep 2008.

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

ROQUES, P. *et al.*, Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. **JCI Insight**, 2, n. 6, p. e83527, 03 2017.

ROSSI, S. L. *et al.*, Immunogenicity and Efficacy of a Measles Virus-Vectored Chikungunya Vaccine in Nonhuman Primates. **The Journal of Infectious Diseases**, 220, n. 5, p. 735-742, 07 2019.

SANTHOSH, S. R. *et al.*, Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. **Virus Research**, 135, n. 1, p. 36-41, Jul 2008.

SCHILTE, C. *et al.*, Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7, n. 3, p. e2137, 2013.

SCHRAUF, S. *et al.*, Current Efforts in the Development of Vaccines for the Prevention of Zika and Chikungunya Virus Infections. **Frontiers in Immunology**, 11, p. 592, 2020.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, 8, n. 7, p. 491-500, Jul 2010.

SERGON, K. *et al.*, Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 76, n. 6, p. 1189-1193, Jun 2007.

SIMARD, F. *et al.*, Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) in Cameroon, Central Africa. **Journal of Medical Entomology**, 42, n. 5, p. 726-731, Sep 2005.

SIMON, F. *et al.*, French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Médecine et Maladies Infectieuses**, 45, n. 7, p. 243-263, Jul 2015.

SIMON, F.; PAULE, P.; OLIVER, M. Chikungunya virus-induced myopericarditis: toward an increase of dilated cardiomyopathy in countries with epidemics? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 78, n. 2, p. 212-213, Feb 2008.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiology Reviews**, 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

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

TIWARI, M. *et al.*, Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. **Vaccine**, 27, n. 18, p. 2513-2522, Apr 2009.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. *et al.*, Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, 7, n. 7, p. 3647-3674, 2015.

VAZEILLE, M. *et al.*, Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS One**, 2, n. 11, p. e1168, Nov 14 2007.

VENTURI, G. *et al.*, Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. **Eurosurveillance**, 22, n. 39, Sep 2017.

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

VOSS, J. E. *et al.*, Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, 468, n. 7324, p. 709-712, Dec 2 2010.

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

WHITE, A.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J. P. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. **Journal of Applied Microbiology**, 23, n. 5, p. 951-952, May 1972.

WINTACHAI, P. *et al.*, Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**, 84, n. 11, p. 1757-1770, Nov 2012.

YERGOLKAR, P. N. *et al.*, Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. **Emerging Infectious Diseases journal**, 12, n. 10, p. 1580-1583, Oct 2006.

ZHANG, R. *et al.*, Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, 557, n. 7706, p. 570-574, 05 2018.

Article

Design of a synthetic protein targeting Chikungunya Virus E2B domain epitopes for acute phase diagnostics and therapy

Antonio Fernando da Purificação Júnior¹, Matheus Vitor Ferreira Ferraz^{1,2}, Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti Freire³, Isabelle Freire Tabosa Viana¹ and Roberto Dias Lins Neto^{1,*}

¹ Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife 50750-465, PE, Brazil; afjr7@hotmail.com (A.F.P.J.); matheus.ferraz@h-its.org (M.V.F.F.); isabelle.viana@fiocruz.br (I.F.T.V.); roberto.neto@fiocruz.br (R.D.L.N.)

² Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco; Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife 50750-465, PE, Brazil

³ Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, Avenida Trab. São Carlsense, 400, Parque Arnold Schimidt, São Carlos 13566-590, SP, Brazil; marjorie_freire@hotmail.com (M.C.L.F.)

* Correspondence: roberto.neto@fiocruz.br; Tel.: +55-81-2123-7848

Abstract: CHIKV infection causes a severe febrile illness and is characterized by debilitating polyarthrits. Currently there is no treatment or vaccine against CHIKV. The E2 envelope protein is the main site of interaction with cellular receptors for the infection and the main target of neutralizing antibodies. In this work, we computer-designed a high affinity aptamer against the E2B protein based on hot spots grafting. The structural and dynamic properties of the most promising designed proteins were evaluated through molecular dynamics simulations. Based on the computational results, one of the aptamers was selected and expressed in *E. coli*. Using microscale thermophoresis, the binding affinity of this aptamer was determined, and it was able to bind the target with affinity comparable to that of natural antibodies ($K_D = 100\text{nM}$). Circular dichroism showed that the aptamer is highly stable, preserving its secondary structure content even at high temperatures. Neutralization assays (plaque reduction and microneutralization) demonstrated that the aptamer was able to neutralize CHIKV infection in vitro, with an EC50 of 31.44 μM (PRNT) or 107.4 μM (MN). Therefore, our results indicate that the designed protein has potential application as a diagnostic marker for acute infections, as well as in new therapeutic strategies against CHIKV infection.

Keywords: Chikungunya Virus, Alphavirus, Aptamers, Viral Neutralization, Protein engineering

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Viruses* **2022**, *14*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Alphaviruses (*Togaviridae* family) are globally widespread and identified in different vertebrate hosts. Several viruses of this genus are pathogenic to humans and responsible for many infections worldwide. Among those, the Chikungunya virus (CHIKV) is the causative agent of Chikungunya fever, a febrile illness transmitted by the bite of infected female mosquitoes of the *Aedes sp.* genus. Its transmission remains active in several countries in Africa and Latin America [1]. The acute phase of the infection is characterized by high fever, myalgia, debilitating polyarthrits, headaches, periorbital pain, and edema. The chronic phase is characterized by polyarthrits for months and even years [2-5].

Currently, there are no vaccines or antiviral drugs against CHIKV, and most treatment regimens are symptomatic-based. In addition, given the symptomatic similarities, clinical diagnosis is not reliable to differentiate CHIKV infections from other etiologies, such as Dengue or Zika virus, endemical viruses that co-circulate in similar geographic region. Results from routine laboratory generally are inespecific for CHIKV, and available diagnostic tests are limited by low sensitivity. Thus, it poses an extra challenge for CHIKV detection and surveillance, leading to misdiagnosis and hindering suitable treatment to the disease. Due to the severity of the symptoms and the constant outbreaks of

chikungunya fever, it is urgent to develop proper strategies to detect, prevent, and control this infection. [2-5].

CHIKV presents a single positive-sense strand RNA of approximately 11.8 kb that is cleaved into four non-structural proteins (nsP1, nsP2, nsP3, and nsP4), three structural proteins (Capsid, E1, and E2 envelope glycoprotein), and two cleavage proteins (E3 and 6k) [6]. The two envelope proteins decorate the viral surface with spike structures and are responsible for anchoring, receptor interaction, and membrane fusion, promoting the viral entry into the host cells. The E2 protein contains the the E2B domain, responsible for interacting with the cellular receptor and consequently cell attachment, whereas the E1 protein controls membrane fusion during the infection. Hence, preventing the interaction of the E1-E2 proteins with the host-cell receptors represents a promising antiviral strategy for the therapy and prophylaxis of CHIKV-induced disease. Several approaches to block this interaction have been proposed, such as the use of monoclonal antibodies (MAbs), which have been reported to block virus entry *in vitro* and even able to protect mice and non-human primates against CHIKV.

Most of the Abs triggered against CHIKV target the E2 protein, especially the E2B domain, which has been implicated as the main target for Abs response during the entire course of the disease. Given its importance in triggering the infection, and its high concentration in the first days of infection, molecules that selectively bind the E2 protein can be used as both highly efficient acute-phase diagnostic reactant and therapeutic agent. Fox and coworkers [11] have screened a panel of mouse and human anti-CHIKV MAbs targeting the E2B domain, and identified two broadly neutralizing MAbs, CHK-187 and CHK-265, which provided *in vivo* protection against the CHIKV and other related alphaviruses in mice. Through cryogenic electron microscopy it was possible to elucidate the neutralization mechanism, as well as the footprint of cryptical neutralizing epitopes in the E2B domain.

While representing an effective diagnostic and therapeutic tool, MAbs display major concerns regarding its application. Firstly, their production and commercialization are laborious and onerous, precluding its massive employment, specially in low-income countries. In addition, Abs are prone to cause some risks such as antibody-dependent enhancement (ADE). In the absence of drugs and vaccines, alternative efficacious measures are sought. In this regard, the steadily growth of the computational protein design (CPD) field holds promise allowing for the design of artificial proteins as innovative therapeutics strategy *in silico* providing faster results. Computationally-tailored proteins can afford advantages over MAbs including low production cost, higher stability, and heterologous expression, while do not present ADE risk.

In this work, based on the footprint mapped by Fox et al., we propose a computer-engineered protein termed CETZDT-2 to interact with the CHIKV E2B domain. This protein was designed based on a seeded interface design protocol where relevant residues for binding from the MAb CHK-265 was grafted onto the surface of a scaffold protein. Subsequently, CPD techniques were used to ensure optimal packing and affinity against the E2 protein. Molecular dynamics (MD) simulations suggested that the CETZDT-2 presents high stability, further corroborated by circular dichroism (CD) experiment. The lead design presented an affinity of XXX, within the range of conventional MAbs, and was characterized for *in vitro* neutralization of CHIKV, in which viral neutralization was observed. Thus, the findings contained in this study furnishes the basis of a promising diagnostic/therapeutic molecule against CHIKV while presenting an efficient design protocol that can be harnessed to design novel antiviral proteins, including against present and upcoming viral outbreaks.

2. Materials and Methods

2.1. System Building and refinement

Since the structure for the complex E1-E2-CHK-265 FAB, as determined from cryogenic electron microscopy (cryo-EM), presents a resolution of 16.9 Å (PDB ID: 5ANY) [11], it was computationally modelled as from the isolated binding partners. The coordinates for the CHK-265 MAb (heavy and the light chain) were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) under the accession code 5ANY [11] (chains ID I and M for heavy and light chains, respectively), and for the E2 protein, PDB ID 3N42 [13] was used, in which, only a 66-mer region corresponding to the E2B domain was considered. Missing residues were added using the Swiss-PDBViewer Software [37]. The structures were refined using the 5 rounds of the FastRelax protocol of the Rosetta package v. 3.7 [38] in conjunction with the Rosetta Energy rosetta energy function 2015 (REF15) [39], by maintaining the coordinates of the backbone heavy atoms restrained. The relaxed structures were initially positioned towards each other by considering their binding pocket according to the cryo-EM rigid body orientation. To predict the bound structure of the proteins, local docking calculations were performed as implemented in the Rosetta package v. 3.7, using the RosettaDock application. 100,000 structures were generated by randomly perturbing the ligand of structure (here chosen as the E2B protein) by translation and rotation restricted to 3 Å and 8° respectively through a Monte Carlo search scheme. The optimization of the side-chain conformations was carried as described by Wang et al. [40], since it allows an efficient recovery of the correct rotameric side-chain conformations. The docking score (referred to as the interface score) and the free energy of binding, both calculated using the Rosetta package, were used as the selection criteria to identify the putative native-like conformation within the decoy. Molecular dynamics (MD) simulation was used for further refinement of the obtained structure.

2.2. Classical Atomistic Simulations

For all MD simulations, the proteins were centered in a cubic box treated for periodic boundary condition in the x , y , and z directions. The systems were explicitly solvated with the single point charge (SPC) water model. Counterions were added to assure the system's electroneutrality with a saline concentration of 0.15 mM (NaCl). MD simulations were carried out in the NPT ensemble (Number of particles, Pressure, and Temperature held constant) using the Gromacs v.4.6.7 engine. The GROMOS 54A7 force field [41] was used to describe the solute's interatomic potential, whereas the GROMOS 53A6 parameters [42, 43] set was used for the ions. Bonds involving hydrogen atoms were holonomic constrained using the LINCS method. The solute and solvent temperatures were separately coupled to the v-rescale thermostat, with a reference temperature of 310 K and a relaxation time of 0.50 ps. The pressure was isotropically maintained constant at 1.01 bar using the Berendsen barostat with relaxation time of 0.5 ps and compressibility of $4.50 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. A cut-off radius of 1.4 Å was applied to treat short-range interactions. The long-range electrostatic effect was taken into account by the reaction field method with $\epsilon =$

66 [44]. The systems were initially energy optimized using 5,000 steps of the steepest descent algorithm and equilibrated for 100 ps in the NVT ensemble (Number of particles, Volume, and Temperature held constant) maintaining the coordinates of the heavy atoms restrained by applying a force of $100 \text{ kJ} \cdot (\text{mol} \cdot \text{\AA})^{-1}$. Upon restraints release, the production runs were carried out for a period of 100–200 ns depending on the system under investigation. The integration of the equations of motion was numerically accomplished using an integration time step of 2 fs based on the leapfrog algorithm. Post-processing tools within the Gromacs v. 4.6.7 were used to analyze the trajectories. Occupancy analysis based on interatomic contact of residue pairs (considering a distance of 4 Å within the binding interface) during the simulated time was carried out using the TK Console of the Visual Molecular Dynamics v. 1.9.3 software [45].

2.3. Alanine Scanning (AS)

To map the residues in the interface that are thermodynamically important in the CHK-265 and CHIKV E2B interface, computational alanine scanning was employed using the Rosetta v. 3.7 package, where each interacting residue had its side-chain individually replaced by a single methyl group (thus, being converted into an alanine residue), and the difference in the binding free energy upon mutation is calculated. Residues containing at least one atom within a cut-off of 4 Å from any atom from the opposite interface are considered to be in the interface. All residues within a distance cut-off of 5 Å from the mutation site are repacked prior to mutant binding free energy calculation. These calculations were carried out for a structural ensemble generated through the MD simulation. Snapshots were saved each 1 ns of simulation and used to calculate the $\Delta\Delta G$ upon alanine mutation. A total of hundred snapshots were considered. The binding free energy change is calculated as the difference between the alanine-mutated complex's binding free energy and the binding free energy of the native-complex ($\Delta\Delta G = \Delta G_{MUT} - \Delta G_{NAT}$), and it was calculated as an average of the hundred snapshots. Hot spots residues are defined as residues showing a change in the binding free energy $\geq 2.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ when replaced by alanine, and therefore, are of major relevance for the thermodynamics of binding. In this work, 2.5 REU was used as a threshold for a residue to be considered as a hotspot. The Rosetta energy function presents a correlation of $R = 0.73$ for calculating $\Delta\Delta G$ prediction based on a database set of 1210 mutations [29], therefore, for this case the equivalence between REU and $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ is justifiable.

2.4. Computational Protein Design

The protein design was carried out using the Rosetta package v. 3.7, and the MotifGraft protocol described elsewhere [46]. This approach consists of grafting a motif of known structure that interacts with the target onto a scaffold protein. In this work, we adapted the protocol to graft individual residues, termed hot spots, instead of a protein motif. The mapping of the hot spots residues was reasoned by the MD simulation data and the AS calculations, leading to the following residues: S308, S309, D329, T330, N331, N332, and W370. To identify scaffold proteins capable of spatially accommodating these residues in their native conformation, a library containing 2,000 putative scaffolds was built by retrieving three-dimensional structures from the PDB based on 1) the X-ray crystallographic resolution ($<2.5 \text{ \AA}$); 2) the capability to be expressed in *E. coli*; 3) lack of binding partners; 4) and their size (200–300 residues). The scaffold

library was computationally scanned to identify putative grafting sites. The backbone of the grafted residues' atoms matched a scaffold protein when a low RMSD value (up to 1.5Å) for the superimposition on the scaffold protein was found. For each protein scaffold containing the grafted residues, the design of the surrounding interaction was carried out using a MC search of sequences by combinatorial mutations to generate 100,000 redesigned sequences. The designs were constrained by considering sequence restriction based on phylogenetic information through the FavorSequenceProfile mover. To this end, position sequence score matrices (PSSM) were constructed for the native scaffold protein sequence using multiple alignment performed with the BLASTp. PSSMs were built using psiblast. All calculations were carried out using the Talaris14 energy function. Scripts for protein design are available in the Supplementary Information.

2.5. Designs Selection

The designs were selected based on the free energy of binding calculated with the Rosetta energy function. To assess the folding probability, AlphaFold2 developed by DeepMind (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) was used to predict the three-dimensional structure of the designed sequence. The predicted AlphaFold structure refined with the AMBER force field was subjected to geometry optimization using 5 rounds of the Rosetta relax protocol. To evaluate the stability of the designed proteins, MD simulations were carried out.

2.6. Protein Expression and Purification

The DNA sequence coding for the CETZDT-2 was codon optimized and synthesized into the pET14b prokaryotic expression vector (Genscript). This construct encodes a CETZDT-2 with a N-terminal histidine tag (6xHis-tag). For protein expression, this plasmid construction was transformed into in *E. coli* (BL21 Star (DE3) pLysS strain, Invitrogen) and cultured in liquid Luria-Bertani (LB) medium supplemented with ampicillin (100 ug/mL). The expression was induced with of 1mM Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubation at 22°C, 200 RPM for 16h. The bacterial cells were harvested by centrifugation (5,000g/30min/4°C) and resuspended in lysis buffer (300mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 20mM Imidazole, 10% glycerol, pH 8.0). Cells cells were disrupted by ultrasonication and clarified by centrifugation at 12,000 \times g for 30 min at 4 °C.

The CETZDT-2 was purified through affinity chromatography in an AKTA Purifier System (GE Healthcare), using a HisTrap HP column (Cytiva) The elution was performed isocratically, using 300mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 300mM Imidazole, 10% glycerol, pH 8.0. The eluted fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE to confirm the presence of purified CETZDT-2. Protein concentrations were determined spectrophotometrically in a Nanodrop 1000 spectrophotometer, using the measured absorbances at 280 nm and the theoretical extinction coefficient of 18,450 M⁻¹ cm⁻¹.

2.7. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

Conventional far-UV CD experiments were performed for CETZDT in a Jasco J-815 CD Spectrometer (JASCO Corporation, Easton, USA). The spectra were recorded from 280 to 195 nm, using a 1mm path length quartz cuvette and

measured at 20 °C with a Peltier system temperature control. Data were collected at 0.5 nm intervals with a scanning speed of 100 nm.min⁻¹, and a response time of 0.5 s by averaging 6 scans. The final protein concentration was 4.33 µM, diluted in PBS 1X buffer. Data processing was carried out using the CDTool software [49] and converted to delta epsilon values. Thermal denaturation experiment was carried out using the same protein concentration diluted in the same buffer, in a temperature range of 10 to 95 °C. A scan rate of 1.0 °C/min controlled by the Peltier system was used, and the ellipticity changes were monitored at the fixed wavelength of 222 nm. Graphical representations were performed using GraphPad Prism Software, v.7.0 (GraphPad Software).

2.8. Microscale Thermophoresis (MST)

MST experiments were performed on a Monolith® NT.115 instrument (Nanotemper technologies). The CETZDT-2 Twenty micromolar was labeled using the RED fluorescent dye NT-647-NHS Labeling Kit (NanoTemper Technologies, Germany) according to the manufacturer's instructions. Unreacted dye was removed by buffer-exchange chromatography (EC), and the labeled protein was eluted in 1X PBS (phosphate-buffered saline) buffer. MST measurements were performed using standard coated capillaries (Nanotemper), temperature was fixed at at 25°C, the red excitation LED was set to 40%, laser power to medium, laser on-time was set to 30s and laser off-time was set to 5s. Binding assays were conducted using 100 nM of labeled CETZDT-2 and a serial dilution (1:2) of CHIKV viral particles (ranging from 317µM to 0,0096µM), in 1X PBS, 0.05% Tween-20 buffer. The dissociation constant (K_D) was derived from three independent MST experiments and was obtained by fitting the binding curve with the Hill function using GraphPad Prism v.7.0 (Graph Pad Software).

2.9. Vero Cell Culture

Vero cells (ATCC® CCL81™) were cultured in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagles Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) and 1% antibiotic/antimycotic at 37°C and 5% CO₂. These cells were used for the viral stock production and plaque assays.

2.10. Viral Stockpile Production of CHIKV

Vero cells were inoculated with the local isolate strain of CHIKV (CHIKV/H.sapiens/Brazil/PB242/2017), in 75 cm² vented bottles at 80% confluence, in DMEM medium with 2% SFB, supplemented with 5% sodium bicarbonate, 1% antibiotic/antimycotic. The culture was maintained for 2 days at 37°C and 5% CO₂. After this period, the supernatant was collected, aliquoted into microtubes and stored at -80 °C for subsequent titration.

2.11. CHIKV Stock Titration

Virus stock was titrated through plate assay. For this purpose, 1.0 x 10⁵ Vero cells were distributed in each well of a 24-well plate. In the next day, they were infected with up to 7 serial dilutions (in the ratio virus: medium - 1:10) of the CHIKV stocks. After 1 hour of incubation at 37°C and 5% CO₂ for viral adsorption, semi-solid medium containing 1% carboxymethyl cellulose (CMC)

and DMEM with 2% SFB was added to a final volume of 1mL per well. After 2 days, the semi-solid medium was removed, the cells were fixed with formalin and stained with 3% crystal violet. The total number of plaques was determined by visual inspection and counting. Values were expressed as PFU/mL.

2.12. Neutralization Assays

The assessment of virus-specific neutralizing activity by the CETZDT-2 was performed by plaque reduction neutralization test (PRNT) and microneutralization (MN) tests, according to modified protocols [47, 48]. Briefly, PRNT assays were performed in a monolayer of Vero cells infected with locally isolated CHIKV strains. Two-fold serial dilutions of the engineered protein were performed and incubated with the challenge doses of CHIKV (625 plaque forming units - PFU/mL) and allowed to neutralize virus infectivity for 1h at 37°C. While PRNT relies on visual plate counting, MN measures virus neutralizing antibody titers using a colorimetric readout. Two-fold serial dilutions of the CETZDT-2 were performed using 50µL aliquots across the rows of a 96-well plate. Following, 625 PFU/well of CHIKV were mixed with the serially diluted protein and allowed to neutralize virus infectivity for 1 hour at 37°C. Each virus was tested individually. Following neutralization, a 100 µL aliquot containing 80,000 cells of a fresh Vero cells suspension was added to each well of the plates. The plates were incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO₂ and humidity. The plates were washed with 1X PBS supplemented with 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and fixed with 80% acetone, followed by blocking with 5% (w/v) skimmed milk (BIO-RAD) in PBS-T for 30min at room temperature, and incubated with virus-specific monoclonal antibody (anti-CHIKV mAb (A54Q, Invitrogen) for 2 hours at room temperature. After a washing step, the plates were incubated with horseradish-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma) for 1 hour at room temperature. The plates were washed and developed with TMB-KPL microwell peroxidase substrate system (Pierce, IL, USA) for 45 min at room temperature. The reaction was stopped with 1N hydrochloric acid and the absorbance at 450 nm was measured in a BioTek microplate reader (Winooski, VT, USA). For both PRNT and MN assays, the half maximal effective concentration (EC50) was determined by calculating the protein dilution that neutralized 50% of the maximum signal using a four-parameter non-linear regression (Graphpad Prism software v.7). A virus titration curve was included in every plate to ensure assay reproducibility.

3. Results

3.1. Hot spots mapping Local docking was used to predict the bound state structure for the CHK-265 and CHIKV E2B domain with atomistic resolution. One hundred thousand structures were generated using a Monte Carlo based search and two docking evaluation metrics were employed to filter the native-like binding mode of the complex. The structure that presented simultaneously the lowest: 1) the predicted binding free energy (ΔG); and 2) the interface score (ISc) was chosen for further validation. To refine and assess the stability of the modelled complex, MD simulations were used. As a criterion to evaluate the structural stability of the model, the root mean square deviation (RMSD) of all backbone atoms were calculated as a function of time (Figure 1a) The RMSD

Figure 1- Hot spot selection for grafting. (A) schematic representation of the modeled complex mAb254 bound to the CHKV E2b domain. (B) root mean square deviation for the modeled complex taken for the C-alpha carbons. (C) Occupancy analysis between the antibody and E2b domain represented as percentage. (D) alanine scanning performed for the interface residues considering 100 snapshots from Molecular dynamics

3.2. Computational protein design

The scaffold protein must display desired physical-chemical properties while being able to spatially accommodate the motif residues in their native conformation maintaining the initial relevant contacts with the antigen in the interface. To this end, a library containing 2500 putative scaffold proteins were screened to identify scaffold backbones that can superimpose the motif with low RMSD. Subsequently, the design of the surrounding interaction surface was performed to stabilize the protein structure, to accommodate the grafted residues and to increase the binding affinity. It was not possible to find a scaffold able to accommodate the seven hot spots residues at the same time while complying with their native conformation considering an RMSD of 0.5 Å. Therefore, different random combinations of these residues were attempted to be grafted on a basis of 4- and 5-combinations from a set of the 7 residues. Thus, a total of 45 scaffold proteins able to accommodate the hot spots in their native conformation were obtained. A list of the PDB code of the candidates along with the ΔG towards the E2B domain can be found in the supplementary material. Only the complexes of E2B domain bound to the grafted-chimerical proteins possessing $\Delta G < -10$ REU (calculated using the Rosetta package) after the grafting were selected for further design of the interface. The PDB ID for the selected proteins was 1JB3 (STETEFELD *et al.*, 2001), 1TZV (BONIN *et al.*, 2004), 2ZPD (OGUCHI *et al.*, 2008), 4YME (10.2210/pdb4yme/pdb), and 5H9K (JABLONKA *et al.*, 2016). The grafted hot spots for each scaffold protein is found at the Supplementary Information.

To enhance the affinity of the chimerical proteins obtained towards the target and to increase the stability of the designs, local docking followed by interface design approach was employed based on Monte Carlo combinatorial mutations and on the use of phylogenetic constraints using a position specific score matrix (PSSM). A total of 100,000 structures were designed for each of the six obtained scaffold proteins, and these were filtered by assessing interface quality metrics calculated using the InterfaceAnalyzer tool of the Rosetta, as described in the methods section. For each of the six initial complexes, the protein in the output decoy presenting simultaneously lowest ISc and ΔG was selected. Herein, the protein derived from the native PDBs 1JB3, 1TZV, 2ZPD, 4YME, and 5H9K are referred to as CETZDT-1, CETZDT-2, CETZDT-3, CETZDT-4, and CETZDT-5, respectively. Based on the free energy of binding and visual inspection, CETZDT-2 protein was chosen for further structural, biophysical and immunological characterization, since it presented the lowest free energy of binding.

A powerful filter to assess the folding probability of a designed protein consists of structure prediction calculations. The designed sequence when

submitted to protein structure programs should result in a similar structure to the designed one. Here, we have used Alphafold, a deep-learning based algorithm with unprecedented prediction accuracy. The Alphafold generated model showed a high per-residue confidence score (pLDDT) accounting for more than 90% of the covered sequence, indicating it was modelled with high accuracy. By fitting the backbone atoms of the Rosetta-designed with the Alphafold predicted structures, a RMSD of 1.3 Å was calculated, indicating a high probability of correctly folding.

Sequence alignment shows that the CETZDT-2 and the native protein it was derived from, maritima NusB (N utilization substance protein B) (PDB ID: 1TZV), a thermophilic protein from *Thermotoga maritima*, share 92% of identity, differing by a total of 11 residues (Supplementary information). The association between CETZDT-2 and CHIKV E2B domain, ultimately responsible for the molecular recognition, can be visualized in terms of chemical interactions within the contact surface. As it can be seen in Figure 2a, the binding interface is electrostatically-driven in the form of ionic interactions and hydrogen bonding.

To investigate how these mutations impact the overall folding of CETZDT-2, MD simulations were carried out. The MD trajectory suggests that CETZDT-2 is structurally stable, as it can be seen from Figure 2b, c e d, the RMSD for CETZDT-2 along the time using the alpha carbons as compared to the reference (initial) structure shows that the MD simulation reaches equilibrium in the first picoseconds of simulations and displays a similar profile to the wild-type structure. This behavior reflects a lack of significant structural changes. The secondary structure content along the time corroborates the stability of the designed protein indicating no loss of structural patterns. To characterize the flexibility of CETZDT-2, the root mean square fluctuation (RMSF) was used as a criterion, since it measures the magnitude of motion of an atom. This way, RMSF was calculated for alpha carbon atoms. As it can be observed, the designed protein presents a slightly more rigid profile of RMSF as compared to its native structure, highlighting its stability.

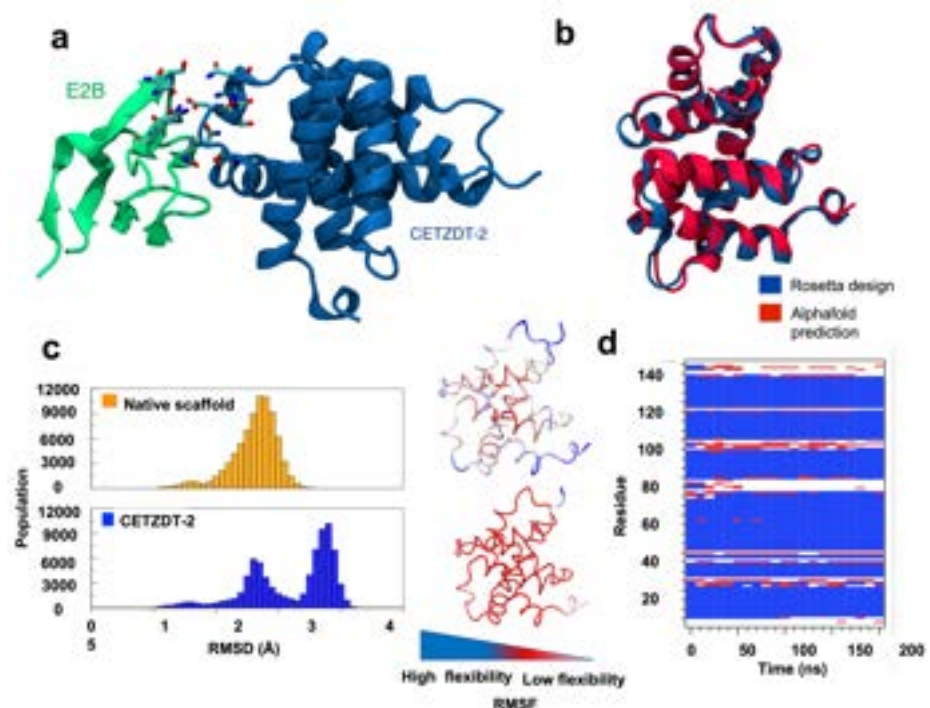


Figure 2- A) schematic representation of the putative binding mode between the designed aptamer and E2B domain, highlight the interface contacts. (B) superimposition of the alphafold prediction for the designed aptamer and the resulting structure from the Rosetta-output decoy. (C) root mean square deviation and fluctuation for the designed aptamer and the native scaffold. (D) secondary structure content analysis in the simulated time.

3.3. CETZDT-2 expression, purification and structural stability

The CETZDT-2 was bacterially expressed and purified using a chromatography system. The purity was confirmed by acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Supplementary Fig. S.1). This engineered protein is formed by 166 amino acids, has a theoretical molecular mass (MM) of 19.4 kDa and showed an expression yield of 154.62 mg/mL. It is important to point out that all the carriers in the library assembled for the design steps, had been previously expressed in a prokaryotic system.

Thus, circular dichroism (CD) spectroscopy was performed to evaluate the secondary structure profile of purified CETZDT-2. The results showed that the CD spectrum of CETZDT-2 presented two negative minima at 208 and 222 nm, characteristic of helical-rich proteins [35] (Figure 3A). This secondary structure profile corroborates qualitatively with the predicted secondary structure content. This profile is related to the scaffold structure, the protein NusB, in which the three-dimensional structure reveals this same profile of an alpha-helical fold [31].

The CD spectroscopy was also applied to evaluate the thermal stability of CETZDT-2 by monitoring the ellipticity at 222 nm as a function of temperature. The results showed that the ellipticity values remained constant (Figure 3.B), indicating that the temperature variation did not cause structural changes in CETZDT-2. Thus, the unfolding process was not observed for this protein in the temperature range evaluated (10 °C to 90°C). This thermal stability can be explained by the scaffold coming from a thermophilic organism, suggesting that the transition of CETZDT-2 to unfolded state occurs at temperatures higher than the maximum temperature evaluated.

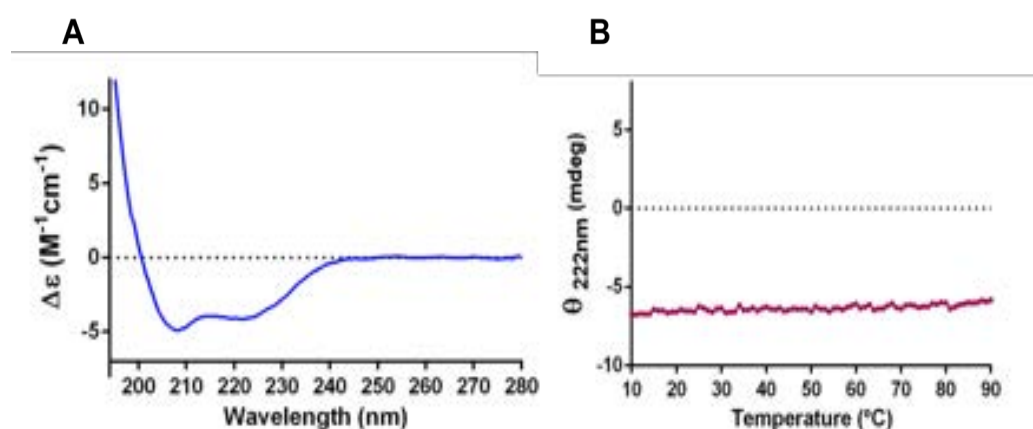


Figure 3. A) Secondary structure profile of CETZDT-2 by CD spectroscopy. The CETZDT-2 spectrum suggests the predominance of helical secondary structures. B) Thermal stability of CETZDT-2 probed by CD spectroscopy. The ellipticity was monitored at the fixed wavelength of 222 nm as a function of temperature.

3.4. Microscale thermophoresis and Neutralization assays

MicroScale thermophoresis (MST) was performed to access the interaction between CETZDT-2 and CHIKV viral particles. The results showed a binding profile with the occurrence of a well-defined MST curve (Figura 4A). From that, the dissociation constant (KD) for this interaction was estimated as 0.1 ± 0.02 μM . This binding affinity is similar to those typically observed for natural antibodies, which range from micromolar to nanomolar scale (HUCKER et al., 2021; KOSE et al., 2019)

In addition to MST experiments, the CETZDT-2 protein was evaluated regarding its ability to neutralize the virus entry into cells. In these assays, dilutions of CETZDT-2 were previously incubated with CHIKV to promote the formation of immunocomplexes. If the protein is capable of binding to the virus, consequently, presence of binding, a reduction in the plaque formation or absorbance (OD) at 450nm is observed. Therefore, suggesting that the protein is able to neutralize the viral action in the cell.

Pre-fixation neutralization assays determine whether the antibodies block viral engagement prior to cell attachment (e.g. by aggregating virions or inhibiting attachment to the cells). After the cells were incubated, viral production was measured using plaque reduction neutralization (PRNT) and microneutralization (MN) tests. The half of the maximum effective concentration (EC_{50}) of CETZDT-2 was determined and results in 31.44 μM (1620ng/mL) for PRNT and 107.4 μM (5536ng/mL) for MN assays for CHIKV (Figure 4 B e C). All concentrations of CETZDT-2 tested in the neutralization assays were used alone in Vero cells for the purpose of checking for cytotoxic effect, which was not evident for any of the wells incubated at equal assay time and temperature conditions.

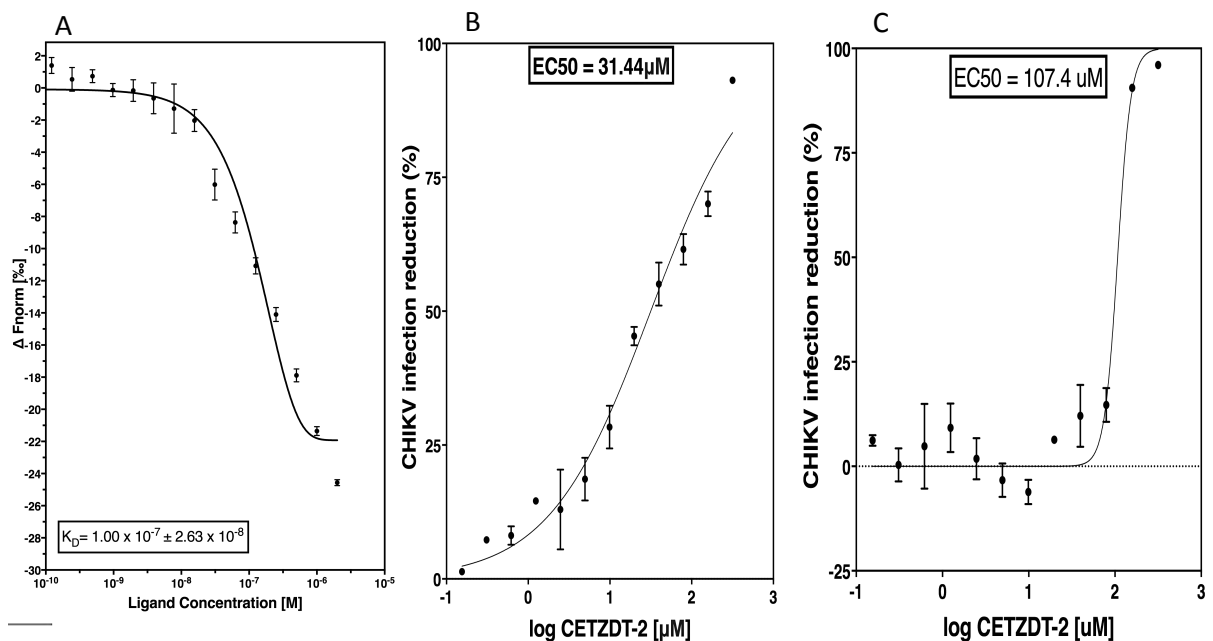


Figure 4- A) MST. B) Neutralization of live virus by designed miniprotein inhibitors. Neutralization activity of CETZDT-2 was measured by PRNT (A) e MN (B). Indicated concentrations of binders was incubated CETZDT-2 potentially neutralize CHIKV, with EC_{50} values 31.44 μ M (PRNT) or 107.4 μ M (MN). Data are representative of two independent experiments, each performed in technical duplicate.

4. Discussion

To block the interaction of the E2 protein against the human cell receptors has been considered an efficient strategy to mitigate CHIKV infection. In addition, molecules that selectively bind the E2 protein can be used as diagnostic reagent. In this work, we present CETZDT-2, a highly stable 142-mer protein with promising application as both diagnostic reagent and therapeutic. Our designed protein was conceived based on a hot spots grafting approach. To this end, a combination of molecular modeling techniques and Fox et al. (REF) screening experiment to map cryptical epitopes footprints were employed to define the hot spots. The hot spots were mapped by considering the protein dynamism in response to thermal energy by employing dynamical simulation methods, and these were grafted into scaffold proteins using the Rosetta software. Mapping the structural and thermodynamic contribution of the residues in the interface by considering an ensemble of structures is a more efficient approach rather than using a statistic structure. The explored computational design strategy against CHIKV E2B domain by grafting hot spots in their native

conformations poses a structural advantage, since it starts the design with favorable interactions and has been successfully applied to several targets.

CETZDT-2 was engineered based on the NusB from *Thermotoga maritima*, which consists of a predominantly helicoidal folding. Similarly, the Rosetta-designed structure and structure prediction by AlphaFold2 suggests that CETZDT-2 is also enriched with alpha-helix content. The predicted secondary structural elements was confirmed by CD assays to present high helix content. Moreover, MD simulations and CD experiments demonstrated the high structural and thermostability of the protein. Even at high temperatures (ca. 90°C), the protein maintained its folded structure, which was derived from a thermophilic organism. This high thermal stability may offers advantages, such as the lack of necessity for cold chain processes, which allows healthcare professionals to transport this protein specially in high-temperature locations, which geographically, accomodates the vast majority of the CHIKV cases.

The smaller size of CETZDT-2, which is in average one tenth the size of conventional antibodies makes it a promising candidate to scale-up its production, since it is much simpler for heterologous expression, while does not require expression in mammalian cells for proper folding, like antibodies. In addition, the small size combined with its high stability, makes its presentation to dendritic cells less likely, bypassing immunogenicity.

Given the robustness of the computational data obtained for CETZDT-2, an experimental approach was also carried out to confirm the therapeutic potential of this engineered protein. For this purpose, CETZDT-2 was expressed in a bacterial system and obtained with a high yield in its purified form. Interaction studies were performed between this protein and CHIKV viral particles, demonstrating an interaction with a K_D in the nanomolar range. Thus, these data confirm the binding capacity of this engineered protein. Furthermore, neutralization assays were performed demonstrated that the aptamer was able to neutralize CHIKV infection *in vitro*, with an EC_{50} of 31.44 μ M (PRNT) or 107.4 μ M (MN).

Although potent mAbs for CHIKV have already been reported, [36] [10][10], these results are encouraging as a starting point for affinity maturation. The investigation of neutralizing mAbs as therapeutic platforms have become interesting due to the neutralization capacity and the lower cost of production. Thus, they present perspectives for implementing therapeutic and prophylactic strategies against CHIKV. Additionally, CETZDT-2 was designed to bind to a conserved epitope of E2B, suggesting its potential to neutralize different CHIKV strains.

Given the urgency of developing therapeutic approaches against CHIKV infection, the anti-CHIKV properties of CETZDT-2 identified in this study make it a promising candidate for *in vivo* trials. Furthermore, additional studies combining CETZDT-2 with other recently identified CHIKV inhibitors are needed and may pave the way to mitigate the severe outcomes of CHIKV infection in the population. Although there are no therapeutic antibodies with this type of licensed methodology yet, the final production cost is likely to be much lower than that of the corresponding IgG molecule made in cultured cells. Thus, this study may suggest a platform for the rapid development and deployment of viral blockers for this and other emerging infectious diseases,

5. Conclusions

In this study, we set out to design artificial proteins targeting the E2B domain of CHIKV. Using computational protein design techniques associated with MD simulations, the structurally stable aptamer CETZDT-2 was engineered and able to bind and neutralize the E2B protein in Vero E6 cells. Its binding capability holds promise to the development of diagnostic algorithms. The neutralization provided by our computer-designed protein is equivalent to what is observed among available neutralizing anti-CHIKV antibodies. Since CETZDT-2 was designed to bind a highly conserved epitope of the E2B domain, it is expected to display cross-reactive neutralizing capacity against different strains of the CHIKV. In addition to supporting the development of improved biotherapeutics for CHIKV-induced disease, this work also presents a new pipeline to rationally engineering target-specific binding proteins. Preparing against unknown future pandemics is difficult, and such methodology could be an important component of a general response strategy.

Acknowledgments: This study was supported by grants from CAPES - Biomol, FACEPE, CNPq and Fiocruz. Computer allocation was partly granted by the Brazilian National Scientific Computing Center (LNCC).

Conflicts of Interest: The authors have declared that they have no competing interests.

References

1. CDC. Geographic distribution, where has Chikungunya Virus been found? 2019 [cited 2020 3 de junho de 2020]; Available from: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>.
2. Sissoko, D., et al., Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS neglected tropical diseases*, 2009. 3(3): p. e389-e389.
3. Schilte, C., et al., Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. 7(3): p. e2137.
4. Ganesan, K., et al., Chikungunya Encephalomyelorradiculitis: Report of 2 Cases with Neuroimaging and 1 Case with Autopsy Findings. *American Journal of Neuroradiology*, 2008. 29(9): p. 1636-1637.
5. Chandak, N., et al., Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*, 2009. 57(2): p. 177-180.
6. Strauss, J.H. and E.G. Strauss, The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*, 1994. 58(3): p. 491-562.
7. Sourisseau, M., et al., Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*, 2007. 3(6): p. e89.
8. Kam, Y.W., et al., Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. *J Virol*, 2012. 86(23): p. 13005-15.
9. Cho, B., et al., Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection. *Yonsei Med J*, 2008. 49(5): p.828-35.
10. Pal, P., et al., Development of a highly protective combination monoclonal antibody therapy against Chikungunya virus. *PLoS Pathog*, 2013. 9(4): p. e1003312.
11. Fox, J.M., et al., Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. *Cell*, 2015. 163(5): p. 1095-1107.
12. Li, L., et al., Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature*, 2010. 468(7324): p. 705-8.
13. Voss, J.E., et al., Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 2010. 468(7324): p. 709-12.
14. Asnet Mary, J., et al., Identification of structural motifs in the E2 glycoprotein of Chikungunya involved in virus-host interaction. *J Biomol Struct Dyn*, 2013. 31(10): p. 1077-85.
15. Yan, Y., et al., Extracellular interaction between hCD98 and the PDZ class II domain of hCASK in intestinal epithelia. *J Membr Biol*, 2007. 215(1): p. 15-26.
16. Ye, F. and M. Zhang, Structures and target recognition modes of PDZ domains: recurring themes and emerging pictures. *Biochem J*, 2013. 455(1): p. 1-14.

17. Akahata, W., et al., A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med*, 2010. 16(3): p. 334-8.
18. Gangneux, N., et al., Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2009. 200(4): p. 516-523.
19. Couderc, T., et al., A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog*, 2008. 4(2): p. e29.
20. Warter, L., et al., Chikungunya virus envelope-specific human monoclonal antibodies with broad neutralization potency. *J Immunol*, 2011. 186(5): p. 3258-64.
21. Kam, Y.W., et al., Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with chikungunya virus clearance and long-term clinical protection. *J Infect Dis*, 2012. 205(7): p. 1147-54.
22. Yoon, I.K., et al., High rate of subclinical chikungunya virus infection and association of neutralizing antibody with protection in a prospective cohort in the Philippines. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. 9(5): p. e0003764.
23. Fric, J., et al., Use of human monoclonal antibodies to treat Chikungunya virus infection. *J Infect Dis*, 2013. 207(2): p. 319-22.
24. Long, K.M. and M.T. Heise, Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. *Curr Trop Med Rep*, 2015. 2(1): p. 13-21.
25. Hawman, D.W., et al., Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J Virol*, 2013. 87(24): p. 13878-88.
26. Tripathi, P., et al., ClbS Is a Cyclopropane Hydrolase That Confers Colibactin Resistance. *J Am Chem Soc*, 2017. 139(49): p. 17719-17722.
27. Kortemme, T., D.E. Kim, and D. Baker, Computational alanine scanning of protein-protein interfaces. *Sci STKE*, 2004. 2004(219): p. p12.
28. Kortemme, T. and D. Baker, A simple physical model for binding energy hot spots in protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(22): p. 14116-21.
29. Kellogg, E.H., A. Leaver-Fay, and D. Baker, Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins*, 2011. 79(3): p. 830-8.
30. Stetefeld, J., et al., The laminin-binding domain of agrin is structurally related to N-TIMP-1. *Nat Struct Biol*, 2001. 8(8): p. 705-9.
31. Bonin, I., et al., Crystal structures of the antitermination factor NusB from *Thermotoga maritima* and implications for RNA binding. *Biochem J*, 2004. 383(Pt. 3): p. 419-28.
32. Oguchi, Y., et al., Opening and closing of the hydrophobic cavity of LolA coupled to lipoprotein binding and release. *J Biol Chem*, 2008. 283(37): p. 25414-20.
33. Jablonka, W., et al., Structure and Ligand-Binding Mechanism of a Cysteinyll Leukotriene-Binding Protein from a Blood-Feeding Disease Vector. *ACS Chem Biol*, 2016. 11(7): p. 1934-44.
34. Are, V.N., et al., Crystal structure and dynamics of Spt16Ndomain of FACT complex from *Cicer arietinum*. *Int J Biol Macromol*, 2016. 88: p. 36-43.
35. Greenfield, N.J., Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 2006. 1(6): p. 2876-90.
36. Selvarajah, S., et al., A neutralizing monoclonal antibody targeting the acid-sensitive region in chikungunya virus E2 protects from disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. 7(9): p. e2423.
37. Guex, N. and M.C. Peitsch, SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 1997. 18(15): p. 2714-23.
38. Leaver-Fay, A., et al., ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol*, 2011. 487: p. 545-74.
39. Alford, R.F., et al., The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. *J Chem Theory Comput*, 2017. 13(6): p. 3031-3048.
40. Wang, C., P. Bradley, and D. Baker, Protein-protein docking with backbone flexibility. *J Mol Biol*, 2007. 373(2): p. 503-19.
41. Schmid, N., et al., Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J*, 2011. 40(7): p. 843-56.
42. Oostenbrink, C., et al., A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*, 2004. 25(13): p. 1656-76.
43. Oostenbrink, C., et al., Validation of the 53A6 GROMOS force field. *Eur Biophys J*, 2005. 34(4): p. 273-84.
44. Tironi, I.G., et al., A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, 1995. 102(13): p. 5451-5459.
45. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 1996. 14(1): p. 33-8, 27-8.
46. Silva, D.A., B.E. Correia, and E. Procko, Motif-Driven Design of Protein-Protein Interfaces. *Methods Mol Biol*, 2016. 1414: p. 285-304.
47. Magalhaes, T., et al., Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, 2017. 11(11): p. e0006055.
48. Nascimento, E.J.M., et al., Use of a Blockade-of-Binding ELISA and Microneutralization Assay to Evaluate Zika Virus Serostatus in Dengue-Endemic Areas. *Am J Trop Med Hyg*, 2019. 101(3): p. 708-715.
49. Lees, J.G., et al., CDtool-an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis, and archiving. *Anal Biochem*, 2004. 332(2): p. 285-9.
50. SAHOO, B., CHOWDARY, T. K. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2-E1 dissociation during viral entry. **Bioscience reports**. v. 39, n. 6, BSR20191077. 28 Jun. 2019. Disponivel em: <<https://doi.org/10.1042/BSR20191077>>.
51. GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL SE, et al. Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability. **Molecular cell, Elsevier**. V. 63, n. 2, p.337-346, 2016. Disponivel em: <<https://doi:10.1016/j.molcel.2016.06.012>>.