



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JAMILE TANIELE DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES PRESENTES NAS PROTEÍNAS DO ENVELOPE  
DO VÍRUS CHIKUNGUNYA CIRCULANTE EM ALAGOAS E SEU POTENCIAL  
IMPACTO NO RECONHECIMENTO DE LINFÓCITOS B E T CITOTÓXICOS**

MACEIÓ-AL

2021

JAMILE TANIELE DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE MUTAÇÕES PRESENTES NAS PROTEÍNAS DO ENVELOPE  
DO VÍRUS CHIKUNGUNYA CIRCULANTE EM ALAGOAS E SEU POTENCIAL  
IMPACTO NO RECONHECIMENTO DE LINFÓCITOS B E T CITOTÓXICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção de grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda

MACEIÓ-AL

2021

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586p Silva, Jamile Taniele da.  
Prospecção de mutações presentes nas proteínas do envelope do vírus chikungunya circulante em Alagoas e seu potencial impacto no reconhecimento de linfócitos B e T citotóxicos / Jamile Taniele da Silva. – 2021.  
175 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Ênio José Bassi.

Coorientador: Cláudio Torres de Miranda.

Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió.

Bibliografia: f. 120-167.

Apêndices: f. 168-171.

Anexos: f. 172-175.

1. Vírus chikungunya. 2. Mutação (Biologia). 3. Epítomos. 4. Imunoinformática. I. Título.

CDU: 578.54



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – *Campus* A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Jamile Taniele da Silva

Prospecção de mutações presentes nas proteínas do envelope do vírus  
Chikungunya circulante em Alagoas e seu potencial impacto no reconhecimento de  
linfócitos B e T citotóxicos

Tese submetida ao corpo docente  
do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da  
Universidade Federal de Alagoas e  
aprovada em 20 de dezembro de  
2021.

### Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



Enio Jose Bassi  
Data: 22/12/2021 18:18:05-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Ênio José Bassi (ORIENTADOR)

Documento assinado digitalmente



Jamylle Nunes de Souza Ferro  
Data: 03/01/2022 16:32:11-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jamylle Nunes de Souza Ferro – UFAL

Documento assinado digitalmente



Edeildo Ferreira da Silva Junior  
Data: 23/12/2021 12:29:05-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior – UFAL

Documento assinado digitalmente



DANILO CANDIDO DE ALMEIDA  
Data: 22/12/2021 20:39:43-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Danilo Candido de Almeida - UNIFESP

Documento assinado digitalmente



RODRIGO NALIO RAMOS  
Data: 25/01/2022 10:42:52-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Rodrigo Nalio Ramos - USP

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (LAPEVI/ICBS/UFAL), sob a orientação do Prof. Dr. Ênio José Bassi

Durante a execução da pesquisa, contamos com o apoio financeiro dos órgãos: CNPq, Ministério da Saúde, Secretaria de Saúde, Governo de Alagoas, FAPEAL, PPSUS

## DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai José Messias e minha mãe Maria Zélia, aos meus irmãos Janine, Jean, Keyla e Maysa, meus avós Manoel e Maria Francisca e aos meus sobrinhos Nicolás, Noan e Sophia.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter conduzido minha vida até esse momento. Diante de tantas coisas que aconteceram durante esse ano, eu senti a Sua mão me guiando, me amparando e me dando forças para não desistir.

Ao meu pai José Messias da Silva, que sempre fez tudo pelo meu futuro, me deu todo o suporte e amor, apoiou minhas decisões, respeitou minhas escolhas e compreendeu minhas ausências. Agradeço também por ele lutar tanto pela vida e por hoje poder estar comigo vivendo esse fechamento de ciclo.

À minha mãe Maria Zélia da Silva, que está sempre ao meu lado incondicionalmente, me dando suporte em todas as estâncias da minha vida e fazendo o possível para que essa trajetória seja a melhor possível. Agradeço também por tanta dedicação, amor e compreensão.

Aos meus irmãos que sempre compreenderam minhas ausências devido a compromissos da vida acadêmica, e sempre me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos. Agradeço aos meus sobrinhos, que mesmo que eles não entendam hoje devido a tenra idade, são uma grande motivação para que eu alcance meus objetivos.

Aos meus amigos Fernanda Souza, Tamara Rodrigues, Sarah Seco, Maria Júlia Tenório, Mykaella Andrade e Oswaldo Cavalcante pois perto ou longe, estiveram comigo em momentos decisivos e me deram muito suporte emocional quando precisei. À família Viveiros de Mello, especialmente à D. Luisa Viveiros, Dilma Viveiros, Edneide Viveiros, Ariana Viveiros e Arion Mello por todo acolhimento e apoio durante os primeiros anos do doutorado.

À Ana Maria Ferreira e Douglas Ferreira por todo suporte, carinho, amor e incentivo que tem sido fundamentais nesses últimos meses.

Aos meus colegas do IMUNOREG/LAPEVI, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pesquisadora, mas também como pessoa, e que hoje, sem pestanejar, posso chamá-los de amigos: Elane Conceição, Stephannie Maia, João Pedro, Grazielle Lobo, Káthia Duarte, Lycia Gama e Júlia Brandão.

Ao Prof. Dr. Ênio José Bassi por ter me acolhido tão abertamente no IMUNOREG, por ter confiado em mim para desenvolver esse projeto, por ter me dado orientação, apoio, motivação e todo o suporte necessário para desenvolver habilidades fundamentais para a vida acadêmica e pessoal. Agradeço à Profa. Letícia Anderson, por ter me desafiado, me ensinado, me motivado e por contribuir técnica e intelectualmente em todas as etapas desse estudo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda, por quem eu tenho uma imensa estima e carinho, pois além de coorientador, me estendeu a mão quando muito precisei.

Ao Prof. Haroldo por ter me orientado nos primeiros anos do doutorado e por ter me desafiado a aprender sobre diferentes aspectos, tanto acadêmicos, quanto pessoais.

Aos meus professores que marcaram a minha trajetória acadêmica, por todas as correções e ensinamentos que me permitiram alcançar meus objetivos dentro da minha formação, em especial: Marcos Carneiro Vital, Olagide Castro, Daniel Gitaí e Salete Smaniotto.

Aos membros dos grupos de WhatsApp aos quais pertenço: Anais do PPGCS, Turma do Fundão (em especial Débora, Phillip e Marlon) e o Grupo de Teatro Colcha de Retalhos, pois foram meu abrigo emocional quando eu precisava espairecer ou até desabafar dramas pessoais e da vida acadêmica, principalmente nos períodos de isolamento após o início da pandemia de COVID-19.

Aos meus colegas da UFAL e do PPGCS, com quem convivi ao longo desses anos, que me incentivaram e que certamente tiveram um impacto gigantesco na minha formação acadêmica e na minha vida como um todo.

À coordenação e secretaria do PPGCS por todo o suporte durante o doutorado. Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEAL por todo apoio financeiro para que esse estudo fosse realizado. À UFAL pela grande oportunidade de estar fazendo esse doutorado.



“All things by immortal power, near or far, hiddenly, to each other linked are, that thou  
canst not stir a flower, without troubling of a star.”

*(Francis Thompson)*

## RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus emergente, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* spp., que causa uma doença caracterizada por febre, cefaleia, erupção cutânea, mialgia e poliartralgia persistente grave. O genoma do CHIKV é um RNA de fita simples de sentido positivo, que o torna suscetível a mutações durante sua replicação nas células hospedeiras, conferindo vantagens adaptativas, como o escape do sistema imunológico. O objetivo deste estudo foi prospectar mutações nas regiões do genoma do CHIKV que codificam as proteínas do envelope, ocorridas em um surto em 2016 no Estado de Alagoas, buscando compreender seu potencial impacto no perfil antigênico das proteínas, por meio de análise computacional. Desta forma, as regiões do genoma viral para as proteínas E1, E2, E3 e 6K foram sequenciadas utilizando amostras de treze pacientes com diagnóstico de CHIKV por RT-qPCR no SUS/Alagoas. As sequências foram avaliadas por análise *in silico* e ferramentas de imunoinformática. Os resultados revelaram que o CHIKV circulante em Alagoas pertence ao genótipo ECSA. Além disso, foram identificadas quatorze substituições de aminoácidos, três delas na glicoproteína E1, uma na proteína 6K, nove na glicoproteína E2 e uma na glicoproteína E3. Dentre elas, está a mutação E2-G60D, previamente descrita como capaz de melhorar a competência vetorial do *Aedes aegypti*. A modelagem de homologia revelou que cinco mutações ocorreram em regiões expostas das proteínas. Todos os epítomos presentes nas proteínas estruturais do CHIKV disponíveis no Immune Epitope Database (IEDB) foram rastreados. Nove mutações pertencem a regiões de 16 epítomos validados experimentalmente, dos quais 8 eram epítomos lineares e 8 epítomos descontínuos. Destes, as mutações E2-G60D e E2-M74T fazem parte de mais de um epítomo descontínuo e 6K-I54V foi detectada em mais de um epítomo de célula T. De acordo com a abordagem imunoinformática (escala Kolaskar e Tongaonkar, escala Chou e Fasman, escala Emini, escala Karplus e Schulz, escala Parker, BepiPred 2.0 e DiscoTope 2.0), treze mutações têm o potencial de pertencer a epítomos de células B. Seis mutações causaram diferenças nas previsões de epítomos de células B lineares, de acordo com diferentes escalas de propensão e algoritmos computacionais. Em relação à predição do processamento e apresentação de peptídeos pelo MHC classe I (MHC-I), algumas mutações afetaram o número de clivagens pelo proteassoma 26S e imunoproteassoma, clivando em novos sítios e abolindo outros. A predição de afinidade para o transportador associado ao processamento de antígeno (TAP) foi perturbada por mutações posicionadas na posição C-terminal, N-terminal e P2 dos peptídeos. As mutações afetaram a afinidade de ligação de alguns peptídeos a alguns alelos do MHC-I, dentre os 27 alelos mais frequentes na população mundial. Esses resultados fornecem informações que podem ajudar a entender o impacto da variabilidade genética do CHIKV na resposta imune e fornecem dados importantes para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico, terapias de anticorpos e vacinas baseadas em epítomos.

**Palavras-chave:** Vírus Chikungunya, Mutações, Epítomos, Imunoinformática

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an emergent arbovirus, transmitted by *Aedes* spp. mosquitoes, that causes a disease characterized by fever, headache, rash, myalgia, and severe persistent polyarthralgia. The CHIKV genome is a positive-sense single-stranded RNA, making it susceptible to mutations during its replication on host cells, which confers adaptive advantages, such as immune system escape. The aim of this study was to prospect mutations in the CHIKV genome regions coding for the envelope proteins, occurred at an outbreak in 2016 in the state of Alagoas, seeking to understand their potential impact on the antigenic profile of proteins, through computational analysis. In this way, the viral genome regions for E1, E2, E3, and 6K proteins were sequenced using thirteen patient's samples diagnosed with CHIKV by RT-qPCR in SUS/Alagoas. The sequences were evaluated by *in silico* analysis and immunoinformatic tools. The results revealed that CHIKV circulating in Alagoas belongs to the ECSA genotype. Also, it was identified fourteen amino acid substitutions, three of them in E1 glycoprotein, one in 6K protein, nine in E2 glycoprotein, and one in E3 glycoprotein. Among them is the E2-G60D mutation, previously described as capable of improving the vector competence of *Aedes aegypti*. Homology modeling revealed that five mutations occurred in exposed regions of the proteins. All the epitopes present in the structural proteins of CHIKV available in the Immune Epitope Database (IEDB) were screened. Nine mutations belong to regions of 16 experimentally validated epitopes, which 8 of them were linear epitopes and 8 discontinuous epitopes. Of these, the E2-G60D and E2-M74T mutations are part of more than one discontinuous epitope and 6K-I54V was detected in more than one linear epitope. According to the immunoinformatics approach (Kolaskar and Tongaonkar scale, Chou and Fasman scale, Emini scale, Karplus and Schulz scale, Parker scale, BepiPred 2.0 and DiscoTope 2.0), thirteen mutations have the potential to belong to B cell epitopes. Six mutations have caused differences in predictions of linear B-cell epitopes, according to different propensity scales and computational algorithms. Regarding the prediction of peptide processing and presentation by MHC class I (MHC-I), five mutations affected the number of cleavages by the 26S proteasome and immunoproteasome, cleaving at new sites and abolishing other ones. The prediction of affinity for the transporter associated with antigen processing (TAP) was disturbed by mutations positioned in the C-terminal, N-terminal and P2 position of the peptides. The mutations affected the binding affinity of some peptides to some MHC-I alleles, among the twenty-seven most frequent alleles in the world population. These results provide information that can help to understand the impact of CHIKV genetic variability on the immune response and provide important data for the development of immunodiagnostic tests, antibody therapies, and for the design of epitope-based vaccines.

**Keywords:** Chikungunya virus, Mutations, Epitopes, Immunoinformatics

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do vírus Chikungunya (CHIKV).....	18
Figura 2 - Diagrama esquemático do genoma do CHIKV. ....	19
Figura 3 - Estrutura das proteínas do envelope do CHIKV .....	23
Figura 4 – Ciclo replicativo do CHIKV .....	26
Figura 5 - Ciclo de transmissão do vírus Chikungunya .....	27
Figura 6 - Distribuição global do <i>Aedes aegypti</i> e do <i>Aedes albopictus</i> .....	29
Figura 7 - Locais de origem e distribuição do CHIKV e seus vetores.....	33
Figura 8 - Distribuição dos casos de CHIKV na América do Sul e Central nos anos de 2014-2016. ....	35
Figura 9 - Frequência dos sintomas durante a infecção aguda do CHIKV .....	37
Figura 10 - Etapas sucessivas da infecção pelo CHIKV em humanos.....	40
Figura 11 - Mecanismos antivirais de NAbs contra o CHIKV .....	44
Figura 12 - Reconhecimento de epítomos de células B .....	47
Figura 13 – Classificação de epítomos de célula B.....	48
Figura 14 - Via de processamento de antígenos para apresentação pelo MHC-I.....	50
Figura 15 - Via do proteassoma para a degradação de proteínas .....	51
Figura 16 - Formação do imunoproteassoma.....	52
Figura 17 - Organização do heterodímero TAP.....	54
Figura 18 - Esquema da estrutura 3D do MHC-I e MHC-II.....	55
Figura 19 - Estrutura do complexo TCR.....	57
Figura 20 - Fluxo de experimentos de biologia molecular realizados.....	71
Figura 21 – Regiões de anelamento dos iniciadores.....	84
Figura 22 – Árvore filogenética com as sequências adquiridas no presente estudo .	86
Figura 23 – Mutações não-sinônimas identificadas nas sequências de glicoproteínas estruturais do CHIKV.....	88
Figura 24 - Mapeamento das mutações detectadas na estrutura 3D das glicoproteínas do envelope.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média da taxa de incidência dos casos de CHIKV durante o ano de 2016 .....	36
Tabela 2 – Base de dados de imunoinformática disponíveis na <i>Word Wide Web</i> .....	58
Tabela 3 - Reagentes utilizados na 1ª etapa da transcrição reversa .....	72
Tabela 4 - Reagentes utilizados na 2ª etapa da transcrição reversa .....	72
Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase .....	73
Tabela 6 - Condição de termociclagem para PCR .....	74
Tabela 7 - Resumo das características das amostras de pacientes positivos com CHIKFV durante o surto de 2016 em Alagoas, Brasil. ....	83
Tabela 8 - Iniciadores usados para transcrição de cDNA, amplificação e sequenciamento da PCR.....	84
Tabela 9 - Mutações presentes nas amostras sequenciadas provenientes do surto de Alagoas/BR em 2016. ....	87
Tabela 10 - Epítomos experimentalmente testados e depositados no banco de dados IEDB, cuja sequências abrangem posições das mutações detectadas neste estudo. ....	90
Tabela 11 - Previsão de epítomos lineares com aminoácidos da cepa de referência Tanzânia (1953) e com as substituições de aminoácidos detectadas neste estudo em Alagoas (2016). ....	93
Tabela 12 - Comparação entre os epítomos conformacionais previstos (em negrito) nos sítios de mutação, para a cepa referência (azul) e a cepa de Alagoas (vermelho) (2016). A tabela mostra a proteína mutada, posição, resíduo e pontuação no DiscoTope, onde resíduos com uma pontuação acima de -3,7 são considerados epítomos.....	96
Tabela 13 - Número de clivagens preditas nas sequências das proteínas E3, E2, 6K e E1 .....	96
Tabela 14 - Predição de clivagem pelo proteassoma constitutivo.....	97
Tabela 15 - Predição de clivagem pelo imunoproteassoma .....	97
Tabela 16 – Efeitos das mutações na afinidade da proteína TAP, quando localizadas nas posições N-terminal, P2, P3 e C-terminal dos peptídeos preditos.....	99

Tabela 17 - Potencial efeito das mutações na ligação de peptídeos aos 27 alelos do MHC-I mais frequentes na população mundial.....	102
Tabela 18 - Potencial imunogenicidade dos peptídeos preditos com ligação aos alelos do MHC-I.....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADCC</b>	Citotoxicidade celular dependente de anticorpos, do termo em inglês <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
<b>ADCP</b>	Fagocitose celular dependente de anticorpos, do termo em inglês <i>Antibody-dependent cellular Phagocytosis</i>
<b>ADE</b>	Aumento dependente de anticorpo, do termo em inglês <i>Antibody-dependent enhancement</i>
<b>Ag-Ac</b>	Antígeno-Anticorpo
<b>ANN</b>	Redes neurais artificiais, do termo em inglês <i>Artificial Neural Network</i>
<b>BCR</b>	Receptor de célula B, do termo em inglês <i>B-cell receptor</i>
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CDR</b>	Complementarity-determining region
<b>CXCL</b>	C-X-C motif chemokine ligand
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleotídeos tri-fosfato
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
<b>Fab</b>	Fragment antigen-binding
<b>Fc</b>	Fragment crystallizable
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano, do termo em inglês <i>Human Leucocyte Antigen</i>
<b>HMM</b>	Hidden Markov Model
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IFN-I</b>	Interferon do tipo 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon do tipo Gama
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IP10</b>	Interferon gamma-induced protein 10
<b>LT</b>	Linfócitos T
<b>mAbs</b>	Monoclonal antibodies
<b>MCP-1</b>	Proteína 1 quimioatraente de monócitos, do termo em inglês <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>ME</b>	Microscopia Eletrônica
<b>MHC</b>	Complexo de Histocompatibilidade Principal, do termo em inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MIG</b>	Monokine induced by gamma interferon
<b>NAbs</b>	Neutralizing antibodies

<b>NAbs</b>	Anticorpos neutralizantes
<b>NCLP</b>	Nucleocapsid-like particle
<b>NCLP</b>	Partícula semelhante ao nucleocapsídeo
<b>NGS</b>	Sequenciamento de nova geração (do inglês <i>Next Generation Sequencing</i> )
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana de Saúde
<b>pMol</b>	Picomol
<b>PRR</b>	Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês <i>Pattern Recognition receptors</i> )
<b>RANK-L</b>	Receptor activator nuclear kappaB- ligand
<b>RANTES</b>	Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>SRC</b>	Síndrome reumática crônica
<b>SRC</b>	Síndrome Reumática Crônica
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SVM</b>	Support-Vector Machine
<b>TAP</b>	Transporter associated with antigen processing
<b>TCR</b>	Receptores de célula T (TCR do inglês <i>T cell receptor</i> )
<b>TH1</b>	T-helper 1
<b>TH17</b>	T-helper 17
<b>TM</b>	Temperatura de melting
<b>TREG</b>	Linfócitos T reguladores
<b>VLP</b>	Virus-like particle
<b>VME</b>	Vacinas de múltiplos epítomos



# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>18</b>
1.1 Biologia do vírus Chikungunya .....	18
1.1.1 <i>Proteínas não-estruturais (nsPs)</i> .....	19
1.1.2 <i>Proteínas estruturais</i> .....	21
1.1.3 <i>Ciclo de replicação viral</i> .....	24
1.4 Ciclos de transmissão do CHIKV e principais vetores .....	27
1.5 Epidemiologia Clínica e Molecular .....	29
1.5.1 <i>Surgimento do CHIKV</i> .....	29
1.5.2 <i>Ressurgimento do vírus Chikungunya</i> .....	31
1.5.3 <i>Chegada do CHIKV nas Américas, no Brasil e no Estado de Alagoas</i> .....	33
1.6 Febre Chikungunya .....	36
1.6.1 <i>Patogênese</i> .....	38
1.6.2 <i>Resposta Imunológica</i> .....	40
1.7 Uso de anticorpos na terapia .....	44
1.8 Uso de anticorpos no diagnóstico .....	45
1.9 Reconhecimento dos antígenos por linfócitos B e anticorpos .....	47
1.10 Reconhecimento de antígenos por linfócitos T .....	49
1.10.1 <i>Clivagem de peptídeos pelo proteassoma e imunoproteassoma</i> .....	50
1.10.2 <i>Transporte pela proteína transportadora de antígenos (TAP)</i> .....	53
1.10.3 <i>Ligação dos peptídeos às moléculas do MHC-I</i> .....	55
1.11. <i>Reconhecimento Pelo TCR</i> .....	56
1.11 Imunoinformática .....	58
1.11.1 <i>Predição de epítomos lineares de célula B através de imunoinformática</i> .....	59
1.11.2 <i>Predição de epítomos conformacionais de células B</i> .....	60
1.11.3 <i>Predição de epítomos de linfócitos T</i> .....	61
1.12 Epítomos-alvo de anticorpos anti-CHIKV.....	62
1.13 Utilização de epítomos para desenho de vacinas .....	64
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>67</b>
2.1 Objetivo geral .....	67
2.2 Objetivos específicos .....	67
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>69</b>
3.1 Aspectos éticos .....	69
3.2 Local do estudo .....	69
3.3 Amostras coletadas na população de estudo .....	70
3.4 Análise do genoma do chikv .....	70

3.4.1	<i>Desenho de iniciadores específicos para o CHIKV</i> .....	70
3.4.2	<i>Extração de RNA viral a partir do soro de amostras de pacientes</i> .....	72
3.4.3	<i>Transcrição reversa (RT)</i> .....	72
3.4.4	<i>Reação em cadeia da polimerase</i> .....	73
3.4.5	<i>Eletroforese de ácidos nucleicos</i> .....	74
3.4.6	<i>Purificação do produto da PCR</i> .....	74
3.4.7	<i>Quantificação do produto da PCR purificado</i> .....	75
3.4.8	<i>Sequenciamento das amostras</i> .....	75
3.5	<i>Análises In Silico de mutações no chikv</i> .....	76
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>83</b>
4.1	<i>Análise das sequências de CHIKV e mutações</i> .....	83
4.1.1	<i>Oligonucleotídeos iniciadores</i> .....	83
4.1.2	<i>Análise filogenética</i> .....	85
4.1.3	<i>Variabilidade genética das proteínas do envelope viral</i> .....	87
4.1.4	<i>Localização das mutações na estrutura da proteína</i> .....	89
4.2	<i>Potencial impacto das mutações no reconhecimento imunológico</i> .....	90
4.2.1	<i>Rastreamento de mutações em epítomos experimentalmente testados</i> .....	90
4.2.2	<i>Predição de epítomos lineares para célula B</i> .....	92
4.2.3	<i>Predição de mutações em epítomos conformacionais de célula B</i> .....	95
4.2.4	<i>Predição da clivagem pelo proteassoma</i> .....	96
4.2.5	<i>Predição do transporte pela TAP</i> .....	98
4.2.6	<i>Impacto das mutações na ligação dos peptídeos a moléculas de MHC-I</i> .....	102
4.2.7	<i>Impacto das mutações na imunogenicidade</i> .....	108
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>120</b>
	<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>168</b>
	<b>APÊNDICE 2</b> .....	<b>170</b>
	<b>ANEXO 1 - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS</b> .....	<b>172</b>
	<b>ANEXO 2 – ARTIGOS EM FASE DE ESCRITA E REVISÃO</b> .....	<b>175</b>
	<b>ANEXO 3 – PREMIAÇÃO</b> .....	<b>175</b>

## INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus emergente com alto impacto global, devido a sua crescente disseminação em novos continentes. A transmissão do CHIKV ocorre através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes* spp., amplamente distribuído no mundo, principalmente em ambientes urbanos, atuando como principal vetor de outras arboviroses como Dengue, Zika e Febre Amarela (WEAVER; FORRESTER, 2015).

O CHIKV é o agente etiológico da Febre Chikungunya (CHIKF), que clinicamente se divide nas fases aguda, pós-aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença de febre de início repentino, exantema, dor de cabeça, mialgia e dores articulares (SIMON et al., 2015). Na fase pós-aguda pode haver persistência dos eventos inflamatórios iniciais, acompanhada do agravamento de artropatias pré-existentes (SIMON et al., 2015). Após três meses, a doença pode progredir para a cura espontânea, sem sequelas, ou para a persistência prolongada dos sintomas articulares e agravamento dos processos inflamatórios e degenerativos, caracterizando uma síndrome reumática crônica, que pode persistir por meses ou anos (SIMON et al., 2015; VAN AALST et al., 2017; PAIXÃO et al., 2018)

Além dos prejuízos diretos à saúde física do indivíduo acometido por esta doença, a infecção pelo CHIKV tem sido associada à depressão nos pacientes crônicos (VAN AALST et al., 2017). Economicamente, a CHIKF tem causado o aumento da carga do sistema de saúde e dos anos de vida ajustados à incapacidade (DALYs, do termo em inglês *Disability-adjusted life years*) (CARDONA-OSPINA; DIAZ-QUIJANO; RODRÍGUEZ-MORALES, 2015). Apesar do seu grande impacto, não existem vacinas ou medicamentos antivirais específicos contra o CHIKV.

Até o ano de 2017, mais de 100 países já registraram a transmissão autóctone do CHIKV (LETA et al., 2018), e o aumento da distribuição do CHIKV tem sido atribuído a diferentes fatores, como mudanças climáticas, aumento da urbanização e da frequência de viagens internacionais, alta densidade populacional, bem como características genéticas do hospedeiro e adaptabilidade genética viral através de mutações no seu genoma (KETKAR; HERMAN; WANG, 2019).

Elevadas taxas de mutação e alta variabilidade genética são características intrínsecas dos vírus de RNA, como o CHIKV (HOLLAND et al., 1982; KHAN et al.,

2002). As mutações ocorrem durante a replicação viral, devido à ausência de atividade de revisão da exonuclease nas polimerases de RNA dependentes de RNA (RdRp) virais (DRAKE; HOLLAND, 1999). Essa propriedade permite que o vírus supere os desafios encontrados na natureza, como as pressões do sistema imunológico e no ambiente celular ao qual são submetidos, durante seu curto ciclo de replicação (LAURING; FRYDMAN; ANDINO, 2013).

Embora a maioria das mutações tenha efeitos deletérios ou letais para o vírus, a literatura tem reportado a ocorrência de mutações no genoma viral que favorecem o CHIKV, conferindo aptidão para novos vetores (TSETSARKIN et al., 2007), melhorando a infectividade do vírus no mosquito (TSETSARKIN; WEAVER, 2011), causando maior patogenicidade no hospedeiro (HAWMAN et al., 2017), desenvolvendo mecanismos de escape da imunidade inata (PRIYA et al., 2013) e da imunidade adaptativa (KAM et al., 2012), o que pode interferir no desenvolvimento de vacinas ou nos resultados de ensaios diagnósticos (YAP et al., 2010).

Assim, a caracterização genética do vírus é de fundamental importância para identificar os genótipos virais, definir a ancestralidade viral, realizar o mapeamento da rota de disseminação do vírus e prever surtos, bem como auxiliar no desenvolvimento de ensaios diagnósticos, vacinas e descoberta de novos alvos antivirais. Diante disso, esse estudo realizou a caracterização molecular do CHIKV, por meio do sequenciamento do genoma viral codificante para as proteínas E1, E2, E3 e 6K do CHIKV, seguido de análises *in silico* e de abordagens de imunoinformática, para estimar o impacto das mutações na antigenicidade e imunogenicidade das proteínas que compõem o envelope da cepa circulante em Alagoas, durante o surto de 2016.

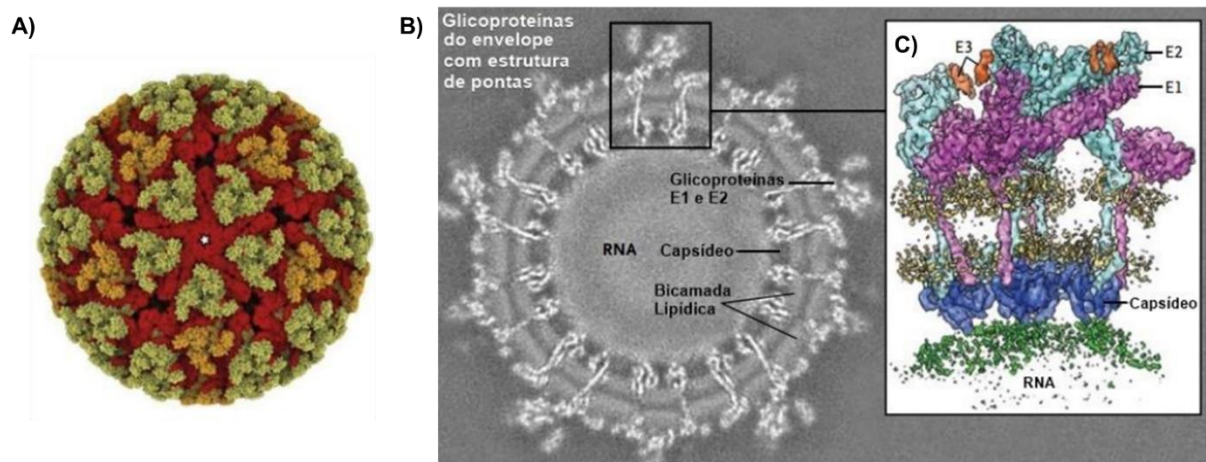
# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 Biologia do vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus pertencente ao gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*), transmitido por fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes* spp. (POWERS et al., 2001; CHEN et al., 2018). Trata-se de um vírus pequeno (60-70 nm), esférico, cujo genoma é formado por uma fita simples de RNA senso positiva, composta por aproximadamente 11.800 nucleotídeos (nt) de comprimento (KHAN et al., 2002). O genoma do CHIKV é encapsulado por proteínas do capsídeo (PC), que formam um nucleocapsídeo icosaédrico (HOLLAND CHENG et al., 1995).

O nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica, derivada da célula hospedeira, na qual estão incorporadas espículas compostas por trimeros de heterodímeros de glicoproteínas E1 e E2, com pequenas proteínas E3 associadas (HOLLAND CHENG et al., 1995; MANCINI et al., 2000) (Figura 1).

**Figura 1 - Estrutura do vírus Chikungunya (CHIKV)**



Reconstrução 3D da estrutura do CHIKV mostrando a estrutura basal com E1 em vermelho e a protusão central da E2 (verde). B) Corte do mapa de densidade 3D. C) Estrutura predita para uma unidade assimétrica do vírus contendo quatro cópias únicas de E1 (magenta), E2 (ciano), E3 (laranja) e PC (azul), e a membrana viral (amarela) e o RNA genômico (verde).

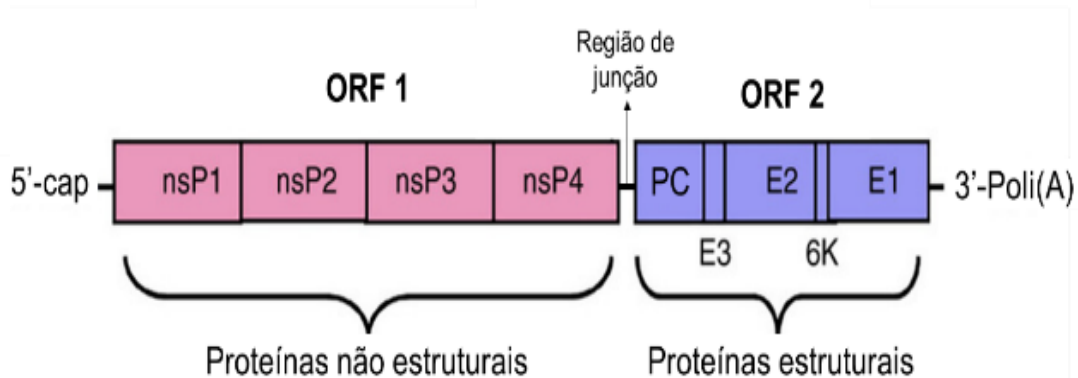
Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2011; WEAVER & LECUIT, 2015

O RNA genômico compõe dois quadros de leitura aberta (ORF, do termo em inglês “*Open Reading Frames*”), flanqueados por duas regiões não traduzíveis (UTR do inglês *Untranslated Region*) localizadas nas porções 5' (76 nt) e 3' (526 nt) do

genoma, e uma região de junção entre as duas ORFs (68 nt), promotora da síntese de RNA subgenômico (KHAN et al., 2002). A extremidade 5' é capeada e possui uma região conservada importante para a replicação dos *Alphavirus* (OU et al., 1983). A extremidade 3' é poliadenilada e contém elementos conservados de sequência repetida (RSEs do inglês *Repeated Sequence Elements*) envolvidos na regulação da síntese de RNA viral (ZHANG et al., 2013).

A ORF-1 (5') dá origem a uma forma precursora de poliproteína que é clivada em quatro proteínas não estruturais (nsPs): nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (KHAN et al., 2002). A ORF-2 (3') codifica uma poliproteína precursora, traduzida diretamente do RNA subgenômico 26S, que dá origem às proteínas estruturais PC, E3, E2, 6K e E1 (Figura 2) (KHAN et al., 2002).

**Figura 2 - Diagrama esquemático do genoma do CHIKV.**



O genoma é uma fita simples de RNA senso-positiva compreendendo duas ORFs. A ORF-1 (rosa) codifica uma poliproteína que ao ser clivada, dá origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). A ORF-2 (lilás) codifica uma poliproteína precursora que, após sucessivas clivagens, dá origem às cinco proteínas estruturais (proteína C da cápside, E3, E2, 6K/TF ou E1).

Fonte: Adaptado de TOMAR; AGGARWAL, (2017)

### 1.1.1 Proteínas não-estruturais (nsPs)

As nsPs são responsáveis pela formação do complexo de replicação do CHIKV, para a síntese do RNA genômico 49S das novas partículas virais, e para a síntese do

RNA subgenômico 26S, que atua como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas estruturais durante a replicação viral (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A proteína nsP1, composta por 535 aminoácidos (aa) (KHAN et al., 2002), é a única proteína do complexo replicativo do CHIKV que se associa à membrana, sendo a principal responsável pela localização da ancoragem do complexo de replicação nas membranas celulares (GOTTIPATI; WOODSON; CHOI, 2020). Além disso, possui domínios com atividade de metiltransferase (MTase) e guanililtransferase (GTase), necessários para o capeamento e metilação do RNA genômico e subgenômico viral (CROSS, 1983; AHOLA; KÄÄRIÄINEN, 1995). Diferentes resíduos na proteína nsP1 têm potencial para gerar vírus atenuados candidatos para a produção de vacina (CHAN et al., 2019) ou de serem alvos de moléculas antivirais (DELANG et al., 2016; FEIBELMAN et al., 2018; ABDELNABI et al., 2020; KOVACIKOVA et al., 2020)

A nsP2, que possui 798 aa, é uma proteína multifuncional com domínios altamente conservados dentre os *Alphavirus* (KHAN et al., 2002). É responsável principalmente pelo processamento dos precursores da poliproteína não estrutural P123 e P1234 e pela transcrição do RNA viral e do RNA genômico (STRAUSS; STRAUSS, 1994). A região amino-terminal da nsP2 possui atividade NTPase RNA-dependente, 5'-RNA trifosfatase e RNA-helicase (GOMEZ DE CEDRÓN et al., 1999; VASILJIEVA et al., 2000; KARPE; AHER; LOLE, 2011). A região C-terminal possui atividade de protease necessária para o processamento das nsPs e está envolvida no início da síntese do RNA subgenômico 26S (HAHN et al., 1989). Em células infectadas, a nsP2 é capaz de subverter a resposta antiviral celular através da poliubiquitinação da subunidade catalítica da RNA polimerase II dependente de DNA celular (RpB1), o que induz sua degradação proteassomal, e por consequência, anula a síntese de RNA celular (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012). Além disso, a nsP2 inibe a sinalização JAK-STAT estimulada por interferon (IFN) (FROS et al., 2010). Devido a suas propriedades, a nsP2 é alvo de diferentes inibidores de replicação do CHIKV (LUCAS-HOURANI et al., 2013; DAS et al., 2016).

A nsP3 (530 aa) é dividida em três domínios (SHIN et al., 2012). O primeiro domínio é um macrodomínio que liga-se a mono e poli-ADP-ribose, bem como a RNA, e também pode hidrolisar ADP-ribose ligada a proteínas (AHOLA; MERITS, 2016). O domínio central é conservado entre os *Alphavirus* (SHIN et al., 2012) e está envolvido nas funções iniciais de replicação durante a síntese de RNA de cadeia negativa e RNA subgenômico (LASTARZA; LEMM; RICE, 1994; WANG; SAWICKI; SAWICKI, 1994).

O último domínio da nsP3 é um domínio hipervariável, com regiões conservadas ricas em prolina (STRAUSS; STRAUSS, 1994; NEUVONEN et al., 2011) que interagem com proteínas da célula hospedeira (FOY et al., 2013; GÖERTZ et al., 2018; AGBACK et al., 2019) e bloqueiam a formação de grânulos de estresse em resposta ao estresse celular (FROS et al., 2012).

A nsP4 (611 aa) é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (RUBACH et al., 2009), que catalisa a formação de RNAs virais a partir de um molde de RNA. A sua porção N-terminal interage com as proteínas do complexo replicativo cuja sequência é exclusiva de *Alphavirus* (RUPP et al., 2015). A porção restante da nsP4 atua como adenililtransferase terminal que produz a cauda poli-A na extremidade do RNA genômico (TOMAR et al., 2006). Em células infectadas pelo CHIKV, a nsP4 suprime a fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica alfa (eIF2 $\alpha$ ), que regula a via PERK e possibilita que o vírus supere atividades celulares antivirais como a resposta à proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *Unfolded Protein Response*) (RATHORE; NG; VASUDEVAN, 2013).

### 1.1.2 Proteínas estruturais

As proteínas estruturais desempenham papéis essenciais na biologia viral, provendo a estrutura viral, e participando da entrada, montagem do nucleocapsídeo, e do brotamento viral (METZ; PIJLMAN, 2016).

A Proteína C do capsídeo (PC) (261 aa) pode ser dividida em três regiões estruturais (I, II e III) (HONG; PERERA; KUHN, 2006) e é clivada autocataliticamente da poliproteína estrutural recém-traduzida (STRAUSS; STRAUSS, 1994). A região I na porção N-terminal é predominantemente básica, para a ligação inespecífica ao RNA viral (LINGER et al., 2004) e possui um trecho longo de 18 aminoácidos em  $\alpha$ -hélice, envolvido na montagem do nucleocapsídeo (PERERA et al., 2001). A região II da PC possui resíduos envolvidos na ligação específica para a encapsidação do RNA genômico recém sintetizado (OWEN; KUHN, 1996). A região III forma a estrutura dos capsômeros (HOLLAND CHENG et al., 1995) e possui uma porção homóloga à das serina proteinases do tipo quimotripsina (CHOI et al., 1991), responsável pela clivagem autoproteolítica que separa a PC da poliproteína estrutural precursora (ALIPERTI; SCHLESINGER, 1978; HAHN; STRAUSS, 1990).



A proteína E3 (64 aa) é uma pequena proteína que possui, em sua extremidade N-terminal, um peptídeo sinal fundamental para direcionar a poliproteína estrutural (E3-E2-6K-E1 ou E3-E2-TF) para o retículo endoplasmático (RE) durante o seu processamento inicial após a separação da PC (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012). A E3 interage com E2 através de forças eletrostáticas (VOSS et al., 2010) e protege o loop de fusão presente na E1 de uma fusão prematura com a membrana da célula (SJOBERG; GAROFF, 2003; UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013).

A proteína E2 (423 aa) é composta por três domínios estruturais, que consistem no domínio A no centro da proteína, ligado por uma fita  $\beta$  ao domínio B e ao domínio C (VOSS et al., 2010). A proteína E2 possui dois sítios de glicosilação nos aminoácidos 263 e 345 (KHAN et al., 2002). Uma das principais funções da glicoproteína E2 é a interação com o receptor presente na célula hospedeira susceptível ao vírus e a proteção do “loop” de fusão em pH neutro (VOSS et al., 2010). Os sítios de ligação com o receptor estão localizados nas pontas mais externas das espículas do envelope (SMITH et al., 1995). O domínio B da E2 possui uma região descrita como “região sensível ao ácido” que, em pH neutro, protege a alça de fusão em E1 (VOSS et al., 2010). Essa região, quando exposta ao pH baixo, se torna desordenada, promovendo a dissociação do dímero E2-E1, que resulta na exposição da alça de fusão (FIELDS; KIELIAN, 2013). Ainda, a E2 possui determinantes antigênicos proeminentes que interagem diretamente com anticorpos neutralizantes (KAM et al., 2012) e uma hélice transmembranar seguida de uma região citoplasmática que interage com o nucleocapsídeo e a mantém ancorada no envelope viral, o que garante a montagem correta e o brotamento das partículas virais (MUKHOPADHYAY et al., 2006a).

O gene 6k dos *Alphavirus* codifica duas proteínas estruturais, a proteína de 6-kilodalton 6K (61aa) (WELCH; SEFTON, 1980) e a sua variante, a proteína *transframe* (TF), formada devido a um deslocamento do quadro de leitura pelo ribossomo durante a tradução (FIRTH et al., 2008). A proteína 6K possui uma sequência de sinal para translocação de E1 ao lúmen do retículo endoplasmático (LILJESTRÖM; GAROFF, 1991) e por ser uma viroporina, atua como um canal iônico, se associando principalmente às membranas do retículo endoplasmático (DEY et al., 2019). A 6K também atua aumentando a permeabilidade das células para o brotamento do vírion (MELTON et al., 2002), na montagem do vírion (LOEWY et al., 1995), e promovendo o dobramento adequado de E1 no heterodímero (GAEDIGK-NITSCHKO K1, DING

MX, LEVY MA, 1990; YAO; STRAUSS; STRAUSS, 1996). A sua variante, a proteína TF, também atua como um canal iônico, semelhante à 6k, mas não é essencial para a replicação do genoma, nem para a infectividade da partícula viral (SNYDER et al., 2013).

A E1 (435 aa) é uma proteína alongada composta por um ectodomínio N-terminal e uma hélice transmembranar de 30 resíduos na extremidade C-terminal, que não penetra além da bicamada fosfolipídica interna (MUKHOPADHYAY et al., 2006a). A E1 é glicosilada na posição 141 e seu ectodomínio é dividido em três domínios estruturais DI, DII e DIII. O domínio DIII é localizado na porção mais C-terminal da proteína, enquanto o DI é central e se liga ao DII, que é localizado na região mais distal da superfície da membrana viral e contém a alça de fusão hidrofóbica (VOSS et al., 2010). A principal função da E1 é a promoção da fusão da membrana viral com a membrana endossomal da célula do hospedeiro em um processo dependente de pH (LI et al., 2010). Quando exposta ao pH ácido, a E1 sofre alterações conformacionais que alteram a sua hidrofobicidade, facilitando a sua interação com bicamadas lipídicas (OMAR; KOBLET, 1988; LESCAR et al., 2001). A estrutura das proteínas do envelope do CHIKV é mostrada na Figura 3.

**Figura 3 - Estrutura das proteínas do envelope do CHIKV**



A) Heterodímero E2-E1 em um pico trimérico; cada heterodímero é colorido em laranja, ciano e rosa, e a proteína do capsídeo em laranja claro (PDB ID: 6NK5). B) Heterodímero E2-E1 e proteína do capsídeo, destacando os domínios e a hélice transmembranar das proteínas E1 e E2.

Fonte: SILVA et al., 2021

### 1.1.3 Ciclo de replicação viral

O ciclo do CHIKV dentro da célula-alvo susceptível inicia através da interação das proteínas do envelope com receptores específicos presentes na membrana celular hospedeira (SMITH et al., 1995). A entrada do CHIKV nas células susceptíveis é baseada em uma série de eventos entre as proteínas do envelope E1 e E2 e a célula-alvo (DUIJL-RICHTER et al., 2015).

Inicialmente, as glicoproteínas E2, presentes no envelope, interagem com receptores presentes na superfície da célula hospedeira, como o MXRA8 (ZHANG et al., 2018a), iniciando a internalização do vírus através de endocitose (HELENIUS et al., 1980). Em seguida, as partículas virais são transportadas, dentro de vesículas revestidas por clatrina, para dentro dos microambientes levemente ácidos dos endossomos, o que provoca alterações conformacionais nos heterodímeros E1/E2, resultando na sua dissociação e exposição do *loop* de fusão (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015). A dissociação das proteínas E1/E2 leva ao afastamento do domínio B da E2 e à exposição do *loop* de fusão da E1 (LI et al., 2010). Em seguida, ocorre a formação de homotrímeros de E1, que direcionam o seu *loop* de fusão para a membrana endossômica e inserem as pontas distais do domínio II na bicamada lipídica (GIBBONS et al., 2003). Os homotrímeros de E1 formam o poro de fusão que é posteriormente expandido e expõem o nucleocapsídeo ao citosol (GIBBONS et al., 2004; WENGLER et al., 2004). Uma vez exposto ao citosol celular, as PC se ligam a uma subunidade ribossômica que ativa a desmontagem do nucleocapsídeo (SINGH; HELENIUS, 1992) e libera o RNA genômico no citoplasma.

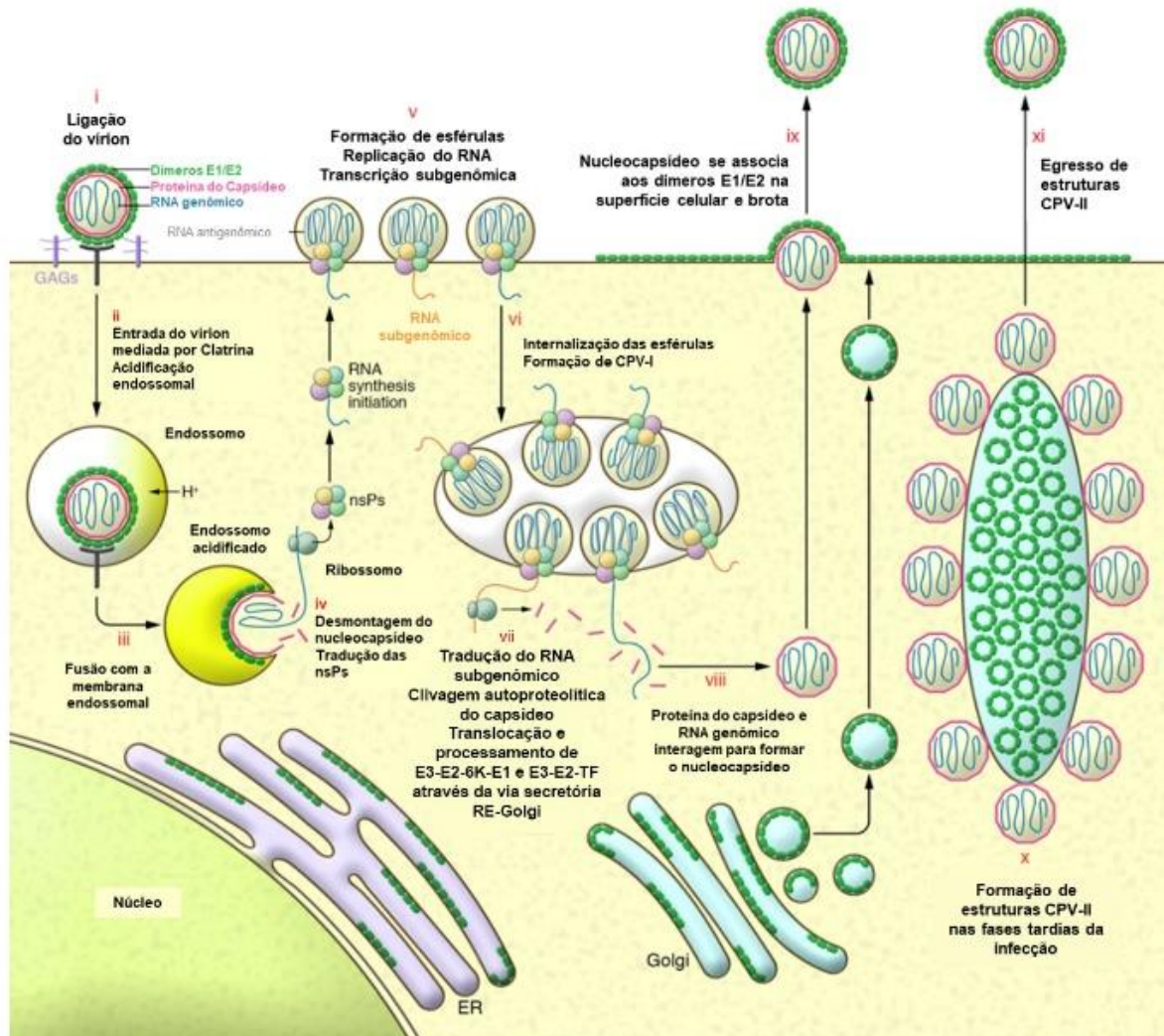
O processo de replicação do CHIKV ocorre em duas etapas distintas dentro do citoplasma da célula-alvo (SOLIGNAT et al., 2009). Após a liberação no citoplasma, o RNA genômico é traduzido, produzindo a poliproteína P1234, que é clivada autocataliticamente pela nsP2, separando a nsP4 da poliproteína precursora P123 (TAKKINEN; PERANEN; KAARIAINEN, 1991; KHAN et al., 2002; VASILJEVA et al., 2003). A nsP4 e P123 atuam como polimerase e replicase, respectivamente, e sintetizam RNA de cadeia negativa a partir do modelo de cadeia positiva de RNA genômico, formando intermediários de RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *Double-stranded RNA*) (LEMM et al., 1994; SHIRAKO; STRAUSS, 1994).

Ao serem sintetizados, os dsRNAs são empacotados em esférulas na membrana plasmática, que os protegem contra a degradação e contra o reconhecimento de receptores celulares de reconhecimento de padrões (PRRs). Essas esférulas se acumulam, formando vacúolos citopáticos do tipo I (CPV-I) (FROLOVA et al., 2010). Em seguida, a poliproteína P123 é clivada para formar nsP1 e P23, provocando mudanças irreversíveis para a síntese exclusiva de RNA de cadeia positiva (LEMM et al., 1994; SHIRAKO; STRAUSS, 1994). Posteriormente, quando as nsP2 e nsP3 são clivadas da poliproteína P23, a síntese é aprimorada para a produção de RNA subgenômico 26S (LEMM et al., 1994).

O RNA 26S produzido pelo complexo replicativo é traduzido diretamente para uma poliproteína estrutural precursora PC-pE2-6K-E1 (STRAUSS; STRAUSS, 1994). Inicialmente, a PC é liberada da poliproteína estrutural através de clivagem autoproteolítica (MELANCONT; GAROFF, 1987) e, imediatamente, interage com o RNA genômico recém-sintetizado para formar novos nucleocapsídeos (OWEN; KUHN, 1996). Simultaneamente, uma sequência sinal presente na extremidade N-terminal de PE2 (correspondente a E3) transloca o precursor das proteínas do envelope PE2-6K-E1 (ou PE2-TF) para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) (BONATTI et al., 1984), onde as peptidases de sinal dividem a poliproteína em PE2 (contendo E3 e E2), 6K ou TF, e E1 (LILJESTRÖM; GAROFF, 1991). Ainda no RE, as proteínas E1 e PE2 sofrem alterações pós-traducionais, como palmitoilação e glicosilação, e se oligomerizam de forma não-covalente, formando heterodímeros que se associam e compõem as espículas virais imaturas não-fusogênicas (RICE; STRAUSS, 1982; LOPEZ et al., 1994). No final da via secretória, a PE2 é clivada por furina para formar E2 e E3. A E3 permanece associada não-covalentemente à E2 e direciona as espículas virais maduras para a membrana plasmática através da rede trans-Golgi (GAROFF; SIMONS; RENKONEN, 1974; DE CURTIS; SIMONS, 1988; LOBIGS; ZHAO; GAROFF, 1990).

Na membrana plasmática, a cadeia carboxi-terminal das proteínas E2 se associa ao nucleocapsídeo, facilitando o brotamento da progênie viral (LOPEZ et al., 1994). Conforme a infecção progride, os vacúolos citopáticos, produzidos no início da infecção, dão origem a um segundo tipo de vacúolo citopático (CPV-II) contendo vírions maduros que são liberados da célula por exocitose antes da morte celular (CHEN et al., 2013). As etapas do ciclo de replicação do CHIKV são ilustradas na Figura 4 (p. 26).

**Figura 4 – Ciclo replicativo do CHIKV**



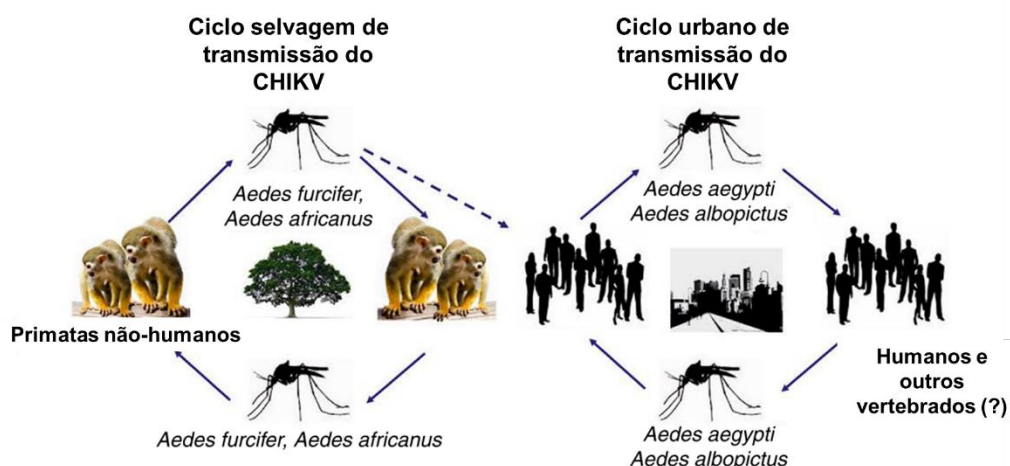
A proteína E2 se liga ao receptor (i). CHIKV entra na célula através de endocitose (ii). O envelope viral se funde à membrana endossômica e libera nucleocapsídeo no citosol (iii). A desmontagem do nucleocapsídeo libera RNA genômico e ocorre a tradução de nsPs (iv). Quatro nsPs, juntamente com o RNA genômico se reúnem na membrana plasmática e formam compartimentos de replicação viral (esférulas) (v). A internalização de esférulas permite a formação de grandes vacúolos citopáticos (CPV-1) (vi). A tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural e a autoproteólise do capsídeo libera o capsídeo no citoplasma (vii). Em seguida, ocorre a translocação de poliproteínas E3-E2-6K-E1 / E2-E2-TK através da via secretória RE-Golgi. As proteínas do capsídeo interagem com o RNA genômico leva à formação de nucleocapsídeo (viii). Os nucleocapsídeos se juntam com E2/E1 na membrana plasmática, resultando em brotamento de vírions maduros da progênie (ix). Posteriormente na infecção, os VC-II se formam, contendo redes de E2 / E1 e são cravejados com nucleocapsídeo (x). Os CPV-IIs provavelmente servem como veículos de transporte e locais de montagem de proteínas estruturais, permitindo a formação e saída de vírions maduros (xi).

Fonte: Traduzido de Silva e Dermody (2017)

## 1.4 Ciclos de transmissão do CHIKV e principais vetores

O CHIKV tem dois ciclos de transmissão interconectados na natureza, um nas florestas selvagens denominado ciclo silvestre e outro em ambientes urbanos, denominado ciclo urbano (Figura 5).

**Figura 5 - Ciclo de transmissão do vírus Chikungunya**



Painel ilustrativo dos ciclos de transmissão selvagem e urbano do CHIKV, seus principais vetores e hospedeiros. No ciclo selvagem, a transmissão do CHIKV ocorre entre NHPs e mosquitos *Aedes* primatófilos infectados. No ciclo urbano, a transmissão do CHIKV se dá por fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectados.

Fonte: Traduzido de MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016

O ciclo original de transmissão do CHIKV é silvestre enzoótico, e envolve diferentes espécies de mosquitos arbóreos primatófilos do gênero *Aedes spp.* e diversas espécies de primatas não humanos (NHP, do inglês *Non-human Primates*), como chimpanzés, macacos e babuínos, que atuam como hospedeiros reservatórios e de amplificação (DIALLO et al., 1999; ALTHOUSE et al., 2018; SILVA et al., 2018). O ciclo silvestre enzoótico ocorre na África ocidental e central, com transbordamentos esporádicos que causam pequenos surtos em humanos, com intervalos inter-epidêmicos de aproximadamente três anos (DIALLO et al., 2012). As áreas onde ocorrem esses surtos são predominantemente rurais e dependem do aumento da densidade dos mosquitos no ambiente selvagem, que aumenta em longos períodos de chuva (LUMSDEN, 1955).

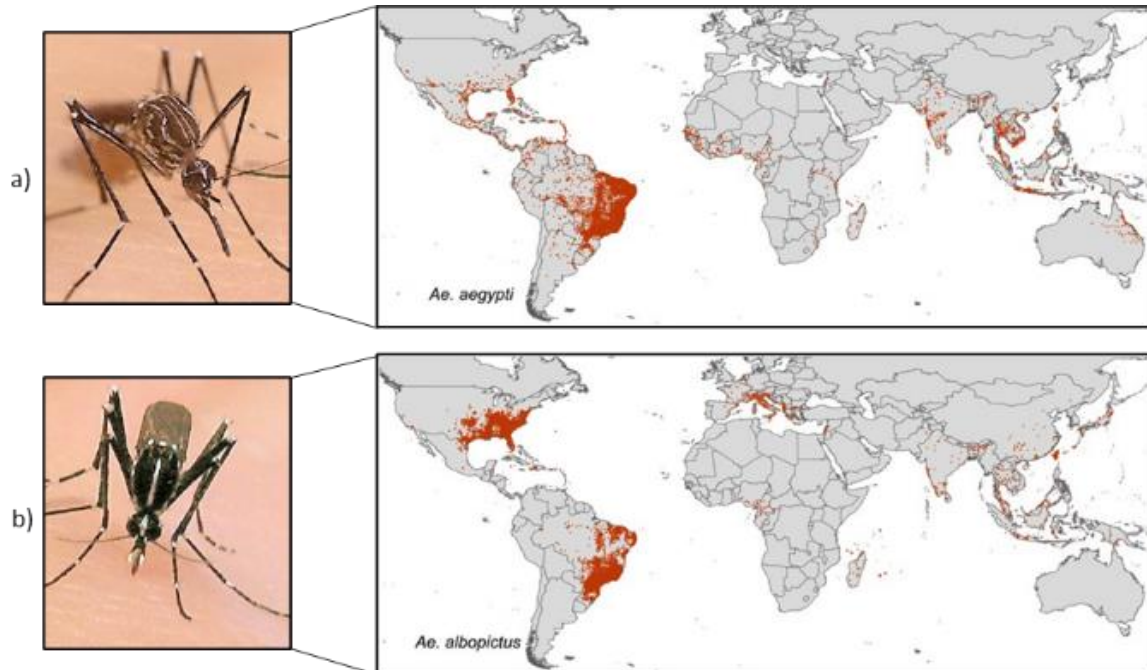
No ciclo urbano, a disseminação do CHIKV ocorre principalmente através de hospedeiros humanos infectados, que também atuam como amplificadores e infectam a fêmea da forma “doméstica” de *Aedes aegypti*, uma espécie de mosquito fortemente adaptada aos ambientes de habitação humana, que vive em estruturas residenciais e se alimenta de sangue humano (REITER; FONTENILLE; PAUPY, 2006; BROWN et al., 2014).

Evidências recentes atribuem a propagação do CHIKV principalmente à ocorrência de adaptações do vírus a vetores secundários por meio de mutações em genes codificantes das proteínas do envelope (TSETSARKIN et al., 2014). Por exemplo, o surgimento de uma única mutação, no gene codificante da proteína E1 do envelope viral, afetou a adaptabilidade do CHIKV ao *Ae. albopictus*, e aumentou o seu potencial epidêmico (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007). O *Ae. albopictus* é uma espécie altamente invasora, de origem asiática, que se espalhou pelo mundo através de remessas de pneus usados, transportados em navios (REITER; SPRENGER, 1987).

A adaptação do CHIKV para o *Ae. albopictus* aumentou consideravelmente a preocupação com a saúde pública mundial frente à grande propagação do vírus para ambientes onde o *Ae. aegypti* não estava presente. O *Ae. albopictus*, é encontrado principalmente nas áreas rurais e pode atuar como uma ponte entre o ciclo enzoótico e o urbano (GRATZ, 2004). Além disso, ao contrário de *Ae. aegypti*, que é restrito a baixas altitudes, o mosquito *Ae. albopictus* suporta altitudes maiores e seus ovos podem resistir temperaturas abaixo de 0° C, permitindo com a sua dispersão, que o CHIKV ocorra em países temperados (KNUDSEN; ROMI; MAJORI, 1996; GRATZ, 2004; AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; LINDH et al., 2019).

A distribuição geográfica do CHIKV está diretamente relacionada à de seus principais vetores urbanos (*Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*) (Figura 6). Essa relação é determinada tanto por fatores extrínsecos ou ambientais (por exemplo, temperatura e precipitação) quanto por fatores intrínsecos ou biológicos (por exemplo, genética viral e vetorial) (LOUNIBOS; KRAMER, 2016). Os fatores intrínsecos, que podem ser herdados, influenciam a competência vetorial, que se refere à capacidade do mosquito de infectar e transmitir o CHIKV (KRAMER; CIOTA, 2015).

**Figura 6 - Distribuição global do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus***



A) Os pontos laranja indicam 19.930 registros de ocorrência do mosquito *Aedes aegypti*, segundo um banco de dados global formado por dados de ocorrência de 1960 a 2013. B) Os pontos laranja indicam 22.137 registros de ocorrência do mosquito *Aedes albopictus*, segundo um banco de dados global formado por dados de ocorrência de 1960 a 2013.

Fonte: Adaptado de *Creative Commons* e KRAEMER et al., (2015)

## 1.5 Epidemiologia Clínica e Molecular

### 1.5.1 Surgimento do CHIKV

O CHIKV foi isolado pela primeira vez a partir do soro de um paciente febril, em 1953, no planalto de Newala, em Tanganyika (atual Tanzânia) na África Oriental (LUMSDEN, 1955; ROSS, 1956). O termo “Chikungunya” é originário do idioma Maconde (Bantu) e significa “aquele que se dobra”, se referindo à gravidade distinta das dores nas articulações que prejudicam a deambulação (LUMSDEN, 1955).

Após o primeiro isolamento em 1953, o CHIKV se propagou para outras regiões tropicais rurais da África (WEINBREN; HADDOW; WILLIAMS, 1958), no sul da África Central (PATERSON; MCINTOSH, 1964) e no sudeste da África, na região do



Zimbábue (RODGER, 1961; PATERSON; MCINTOSH, 1964). Na África Central, o CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1958 na República Democrática do Congo (OSTERRIETH; BLANES-RIDAURA, 1960), onde desapareceu por décadas, sendo detectado novamente somente em um surto que durou de 1998 a 2000 (PASTORINO et al., 2004). Estudos envolvendo análises filogenéticas classificam as cepas provenientes destes surtos em um único clado denominado genótipo *East-Central-South-African* (ECSA) (POWERS et al., 2001; VOLK et al., 2010).

Na África ocidental, o primeiro relato da ocorrência do CHIKV foi na Nigéria, em 1969 (MOORE et al., 1974). No Senegal, a presença do CHIKV foi detectada em mosquitos coletados em diferentes anos (de 1975-1983 e 1992) (DIALLO et al., 1999) e permaneceu circulando dentro do ciclo enzoótico (DIALLO et al., 2012). Pesquisas sorológicas detectaram anticorpos IgM anti-CHIKV em pacientes senegaleses em 1996-1997 indicando possíveis episódios de transbordamento do ciclo enzoótico para o urbano (THONNON et al., 1999). As cepas provenientes do surtos ocorridos na África Ocidental são agrupadas em um único clado independente formando o genótipo denominado *West African* (WA) (POWERS et al., 2001; VOLK et al., 2010).

Na Ásia, o CHIKV foi isolado pela primeira vez em Bangcoc, em 1958 (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960; HALSTEAD et al., 1969) e se dispersou para a Índia, atingindo primeiramente as cidades de Calcutá (atual Kolkata) (SARKAR et al., 1965) e Madras (atual Chennai) (RAO, 1966), e se propagou por outras regiões do subcontinente indiano até 1973 (SHAH; GIBBS; BANERJEE, 1964; MYERS et al., 1965; THIRUVENGADAM; KALYANASUNDARAM; RAJGOPAL, 1965; RODRIGUES et al., 1972; PADRIDRI; GNANESWAR, 1979). Depois de 1973, aparentemente o CHIKV desapareceu da Índia (PAVRI, 1986; NEOGI et al., 1995) mas continuou circulando no sudeste asiático, causando surtos na Tailândia em 1991, 1995 e 1997 (THAIKUREA et al., 1997), em Java, na Indonésia, de 2001-2003 (LARAS et al., 2005) e na Malásia 1998-1999 (LAM et al., 2001). Todas as cepas provenientes destes surtos na Ásia pertencem a um único clado do genótipo denominado *Asian* (POWERS et al., 2001; VOLK et al., 2010).

### 1.5.2 Ressurgimento do vírus Chikungunya

Desde o seu isolamento até 2004, a circulação do CHIKV se restringiu endemicamente em países da África Austral, Ocidental e Central, bem como no sul e sudeste da Ásia. No entanto, após um grande surto epidêmico no Quênia em 2004 (CHRETIEN et al., 2007; NJENGA et al., 2008), o CHIKV (do genótipo ECSA) se propagou da costa do leste africano para ilhas do Oceano Índico, atingindo inicialmente o arquipélago de Comoros (SERGON et al., 2007) e se espalhou, no fim de 2005, para as ilhas vizinhas Madagascar (RATSITORAHINA et al., 2008), Mayotte (PAROLA et al., 2006; VAZEILLE et al., 2007), Seychelles (SCHUFFENECKER et al., 2006), Maurícias (BEESON et al., 2008), e a ilha Réunion (SCHUFFENECKER et al., 2006).

A ilha Réunion foi a mais atingida, com aproximadamente 300.000 casos em uma população de 750.000 habitantes, ocorrendo diversos casos graves, atípicos e pelo menos 237 mortes por decorrência da infecção pelo CHIKV (JOSSERAN et al., 2006). O grande número de casos de infecção pelo CHIKV na ilha Réunion foi atribuído a uma microevolução ocorrida no gene codificante da proteína E1 do envelope do CHIKV (SCHUFFENECKER et al., 2006), onde análises de sequenciamento demonstraram que amostras coletadas entre março e junho de 2005 possuíam o resíduo de Alanina (A) na posição E1-226, enquanto que as amostras coletadas de setembro a dezembro de 2005 apresentaram o resíduo de Valina (V) na mesma posição, sendo associada posteriormente à adaptação ao *Ae. albopictus*, o principal vetor durante esse surto (SCHUFFENECKER et al., 2006). Análises filogenéticas alocam as cepas provenientes das ilhas do Oceano Índico em um único clado dentro da linhagem ECSA, formando a sub-linhagem do Oceano Índico (IOL do inglês *Indian Ocean Lineage*) (VOLK et al., 2010). Cepas provenientes destes surtos foram importadas para a Europa, através de viajantes na França (GRANDADAM et al., 2011a) e causaram um pequeno surto de 205 pessoas no sul da Itália, sendo o primeiro surto registrado em uma região temperada (BELTRAME et al., 2007; REZZA et al., 2007).

Na Índia, após um hiato de 32 anos (PAVRI, 1986), em 2005 foram registrados surtos generalizados, causando mais de 1,3 milhões de casos espalhados por todo o subcontinente indiano, com relatos de óbito devido à infecção pelo CHIKV

(ARANKALLE et al., 2007; NVBDCP, 2007; MAVALANKAR et al., 2008). Cerca de 13 Estados indianos relataram surtos (YERGOLKAR et al., 2006; ARANKALLE et al., 2007; SHRINET et al., 2012; TARAPHDAR; CHATTERJEE, 2015; KUMAR; SIVAPRASAD; GOPAL, 2016; SARANGAN et al., 2018). Durante o ano 2006, o Estado de Kerala foi fortemente afetado pelo CHIKV, registrando mais de 70.000 casos (KUMAR et al., 2008). O Estado de Kerala está localizado no extremo sul indiano com áreas montanhosas com abundantes plantações de borracha, configurando o habitat ideal para o *Ae. albopictus* (KUMAR et al., 2008).

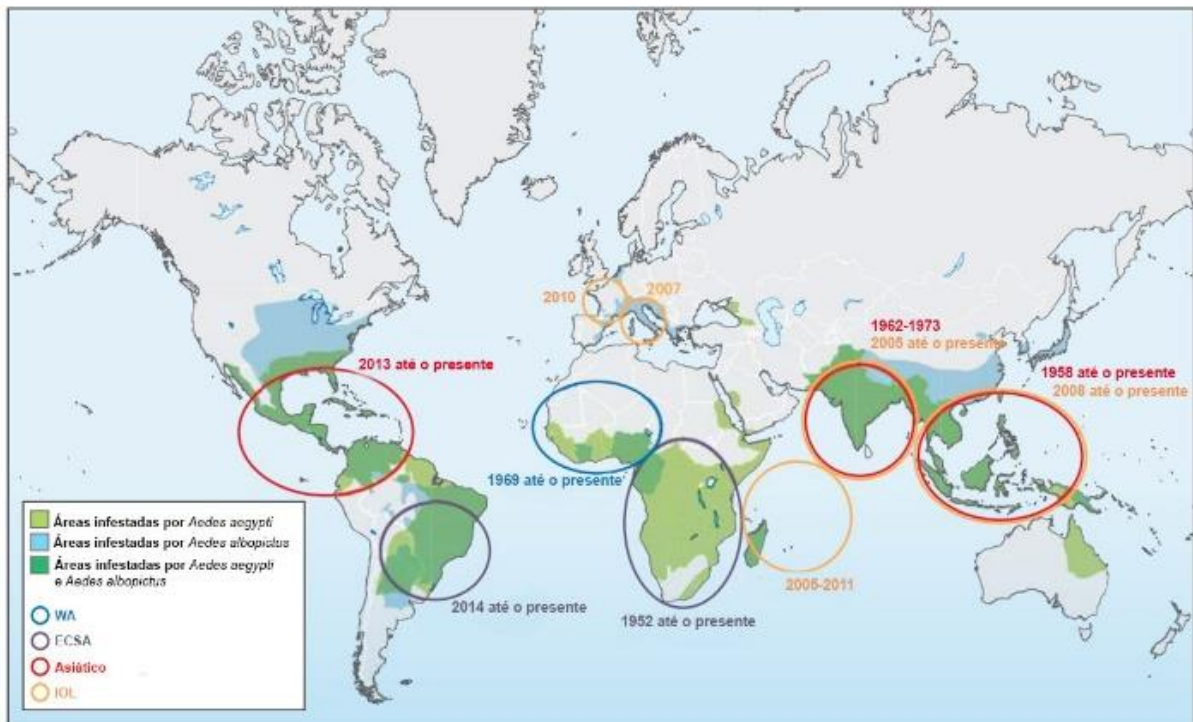
Em 2007, um novo surto ocorreu de forma mais devastadora em Kerala, com 3,6 milhões de casos suspeitos, onde foram relatados casos com características clínicas mais graves e alta mortalidade, semelhante ao que aconteceu nas Ilhas do Oceano Índico em 2005-2006 (SANTHOSH et al., 2008). Análises moleculares demonstraram que as cepas circulantes na Índia, antes de 2005, pertenciam ao genótipo Asiático, enquanto que as cepas isoladas após 2005 foram alocadas dentro do clado do genótipo ECSA e apresentaram 99% de similaridade com as cepas isoladas no surto da ilha Réunion, e a mutação adaptativa E1-A226V (YERGOLKAR et al., 2006; ARANKALLE et al., 2007). Apesar da grande dispersão do CHIKV após a mutação E1-A226V no sul da Índia (KUMAR et al., 2008), o vírus circulante no norte da Índia conservou o resíduo E1-226A e a transmissão permaneceu sendo através do mosquito *Aedes aegypti*, que é abundante nessa região (SHRINET et al., 2012).

No sudeste asiático, diversos países foram afetados pelo CHIKV, incluindo a Malásia, onde foi detectado inicialmente o genótipo Asiático e posteriormente, o ECSA (ABUBAKAR et al., 2007; SAM et al., 2009). Em Singapura, um surto inicial em janeiro de 2008 foi causado pelo CHIKV do genótipo ECSA, em regiões de ocorrência do *Aedes aegypti*; no entanto, após três meses de ausência, o CHIKV ressurgiu em áreas de ocorrência do *Aedes albopictus*, com assinatura molecular da sub-linhagem IOL e a mutação E1-A226V (NG et al., 2009a). No Sri Lanka, o sequenciamento de cepas do CHIKV a partir de amostras coletadas durante surtos entre 2006-2008, demonstrou uma predominância da cepa mutada (E1-A226V) e relação evolutiva com as cepas indianas (HAPUARACHCHI et al., 2010b; KULARATNE et al., 2012; RELLER et al., 2013). A presença da mutação E1-A226V também foi detectada em casos de infecção pelo CHIKV em Papua Nova Guiné (HORWOOD et al., 2013), Indonésia (MAHA et al., 2015), Tailândia (RIANTHAVORN et al., 2010; SASAYAMA et al., 2014) e na China (LI et al., 2012; WU et al., 2013).

Na Ásia, além da grande dispersão da sub-linhagem IOL na Índia e em países do sudeste asiático, o genótipo Asiático continuou circulando, causando pequenos surtos epidêmicos na Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2012), Filipinas (TAN et al., 2015) e nos Estados Federados da Micronésia (PASTULA et al., 2017).

A distribuição dos genótipos do CHIKV e de seus vetores foram ilustrados no mapa da Figura 7.

**Figura 7 - Locais de origem e distribuição do CHIKV e seus vetores**



O mapa mostra as origens africanas do CHIKV e os padrões de distribuição dos genótipos WA, ECSA, asiático e IOL, com base em análises filogenéticas. As distribuições dos vetores urbanos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, também são mostrados em círculos coloridos. WA se refere ao genótipo da África Ocidental, ECSA denota a África oriental, central e austral, e IOL se refere à sub-linhagem do Oceano Índico.

Fonte: Traduzido de Weaver & Lecuit (2015)

### 1.5.3 Chegada do CHIKV nas Américas, no Brasil e no Estado de Alagoas

No hemisfério ocidental, em 2006 foram notificados casos de infecção pelo CHIKV em viajantes que retornavam de áreas endêmicas (CDC, 2006; LANCIOTTI et al., 2007) mas nenhum caso resultou em transmissão local. Somente no dia 5 de dezembro de 2013 foi confirmada a primeira transmissão local do CHIKV (do genótipo

Asiático) no continente americano, na ilha de Saint Martin, localizada ao norte do mar do Caribe (FISCHER; STAPLES, 2014; LEPARC-GOFFART et al., 2014). A partir de 2014, o CHIKV se espalhou, causando surtos em diversos países e territórios situados no mar do Caribe (LANGSJOEN et al., 2016), na América do Sul, incluindo Colômbia (RODAS et al., 2016) e Venezuela (TORRES et al., 2015), e na América Central, incluindo México (DÍAZ-QUIÑONEZ et al., 2016; GALAN-HUERTA et al., 2019), Panamá (DÍAZ et al., 2015; CARRERA et al., 2017) e Nicarágua (WANG et al., 2016). Atualmente, o CHIKV está presente em mais de 50 países do hemisfério ocidental (CDC, 2020).

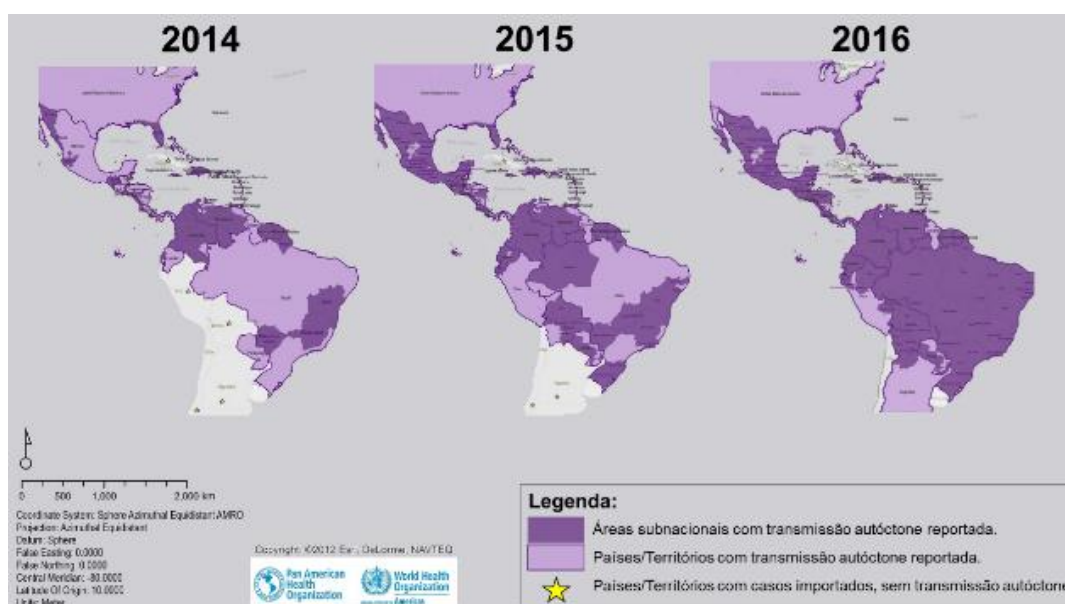
No Brasil, os primeiros casos importados ocorreram em 2010, com dois pacientes febris que retornavam de Sumatra (Indonésia) e do Rajastão (Índia) para o Rio de Janeiro-RJ e São Paulo-SP, respectivamente (CHAVES et al., 2012; DE ALBUQUERQUE et al., 2012), contudo não foi relatada transmissão local. Em 2014, o CHIKV foi detectado em amostras de viajantes retornando de Guadalupe para o Belém do Pará-PA (NUNES et al., 2015), da Indonésia para o Rio de Janeiro-RJ (CONTEVILLE et al., 2016) e da República Dominicana para o Recife-PE (NUNES et al., 2015).

Os primeiros casos autóctones do CHIKV no Brasil ocorreram somente em 13/09/2014, após a detecção do vírus em 2 indígenas em Oiapoque-AP (NUNES et al., 2015). Análises filogenéticas revelaram que a cepa isolada em Oiapoque/AP pertencia ao genótipo Asiático (NUNES et al., 2015).

Sete dias após o primeiro registro do CHIKV em Oiapoque-AP, foi relatado um surto em Feira de Santana, um município situado no Estado da Bahia, a mais de 2000 km de distância da primeira detecção (TEIXEIRA et al., 2015). Em contrapartida, o isolado de Feira de Santana/BA pertencia ao genótipo ECSA, que até 2014 não havia sido relatada a transmissão local desse genótipo no continente americano (NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2015). O caso índice de Feira de Santana foi identificado como um cidadão vivendo em Luanda (Angola) que veio visitar parentes em Feira de Santana-BA (NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2015). O município de Feira de Santana sofreu uma epidemia com duas ondas de transmissão distintas, totalizando 4.800 casos no final de 2015 (FARIA et al., 2016). Após esse surto, foram notificados casos de CHIKV em 84 cidades brasileiras diferentes durante o ano de 2015 (FARIA et al., 2016).

Em 2016, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, foram notificados 277.882 casos prováveis de CHIKV nos 26 estados brasileiros e Distrito Federal. Destes, cerca de 85% (239.714 casos) foram reportados na região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). A distribuição dos casos entre 2014 e 2016, na América do Sul e Brasil, pode ser vista na Figura 8.

**Figura 8 - Distribuição dos casos de CHIKV na América do Sul e Central nos anos de 2014-2016.**



Os casos de CHIKV se expandiram no território brasileiro durante 2015 e 2016, após os primeiros casos autóctones reportados em 2014. Em roxo, estão marcadas as áreas dentro dos países com casos de transmissão autóctone reportados. Em lilás (claro), estão marcados os países com transmissão autóctone reportada. Com estrela, estão marcados os territórios com casos importados, porém, sem casos autóctones reportados.

Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), semana epidemiológica 52 de 2014, 2015 e 2016.

Alguns locais que reportaram anteriormente casos importados do CHIKV no genótipo Asiático, como Recife (NUNES et al., 2015) e Rio de Janeiro (CONTEVILLE et al., 2016), passaram a detectar a circulação do CHIKV pertencente ao genótipo ECSA (MAGALHAES et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018). Um estudo baseado em sequenciamento de nova geração (NGS) indica a possibilidade de existir coinfeção entre genótipos do CHIKV em casos ocorridos em áreas de co-circulação de ambos os genótipos (MACHADO et al., 2019).

Em 2016, o Estado de Alagoas notificou 18.451 casos prováveis ao Ministério da Saúde, e apresentou uma taxa de incidência superior à média das taxas de incidência da região Nordeste e do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), conforme mostrado na Tabela 1

**Tabela 1 - Média da taxa de incidência dos casos de CHIKV durante o ano de 2016**

<b>Território</b>	<b>Taxa de Incidência em 2016 (casos/100.000 habitantes)</b>
<b>Brasil</b>	133,0
<b>Nordeste</b>	415,7
<b>Alagoas</b>	514,8

Fonte: Ministério da Saúde / Vigilância Epidemiológica/ Semanas epidemiológicas 1 a 52 de 2016

Estudos de análise filogenética reportaram que as cepas circulantes no Estado de Alagoas em 2016 pertenceram ao genótipo ECSA (CHARLYS DA COSTA et al., 2017; TANABE et al., 2018a). Análises de datação molecular revelaram que o surto de 2016 foi causado por uma única cepa fundadora, com chegada estimada no final de abril de 2015 e que o surto provavelmente tenha se originado de ciclos de transmissão ocorridos anteriormente no Nordeste, Brasil, porém sem identificação das autoridades em saúde (CHARLYS DA COSTA et al., 2017).

## 1.6 Febre Chikungunya

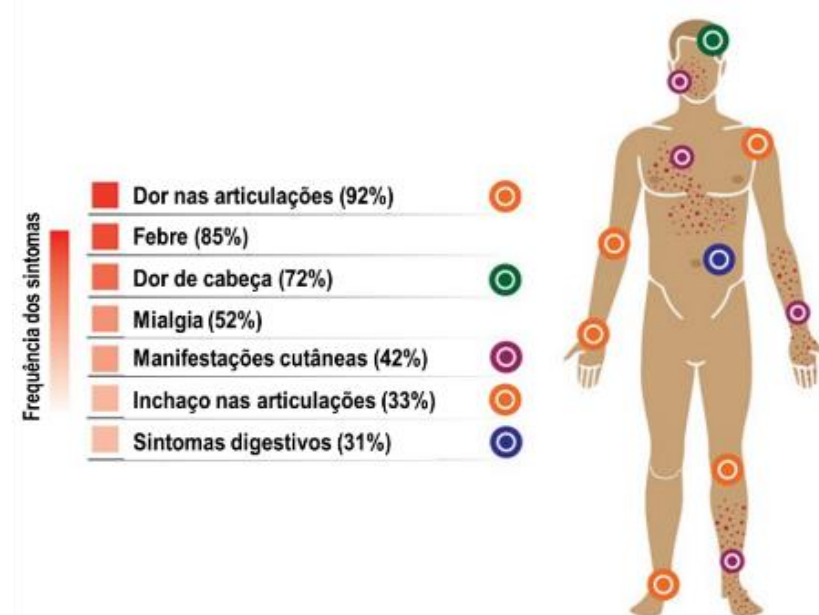
A infecção pelo CHIKV causa uma arbovirose denominada Febre Chikungunya (CHIKF). Em humanos, essa doença é caracterizada pela presença de diferentes sintomas, como fortes dores de cabeça, exantemas, febre aguda e mialgia, com possível progressão para um quadro de artralgia persistente, altamente debilitante, que desabilita o movimento e, em estágios crônicos, pode permanecer por até 72 meses (ROSS, 1956; VAN AALST et al., 2017).

Em indivíduos sintomáticos (cerca de 80% dos casos) (QUEYRIAUX et al., 2008; MORO et al., 2010), a história natural da CHIKF é classificada em três fases. A primeira fase, a fase aguda (< 14 dias após início dos sintomas), ocorre após o período

de incubação, e pode ser dividida em dois estágios: a fase virêmica e pós-virêmica (SIMON et al., 2015). Após a fase aguda, ocorre a fase pós-aguda (ou subaguda), do 15º dia ao final do terceiro mês, e após o terceiro mês, inicia-se a fase crônica, que pode durar anos e é altamente incapacitante (SIMON et al., 2015; VAN AALST et al., 2017).

Em humanos, o período de incubação do CHIKV, após a inoculação pela picada do mosquito, dura de 3-7 dias, em média, mas pode variar entre 1 e 12 dias até o início dos sintomas (RUDOLPH et al., 2014; SCOTT et al., 2017). A fase virêmica é o primeiro estágio da fase aguda (5-10 dias), que é caracterizada pela detecção do CHIKV circulando na corrente sanguínea. Os sintomas predominantes desta fase são semelhantes a outras arboviroses, como piroxia ( $\geq 38,9$  °C) de início abrupto, mialgia, dor de cabeça, fadiga e erupções cutâneas (THIBERVILLE et al., 2013). A maioria dos pacientes (acima de 90% dos casos), em estágio virêmico, apresentam dores nas articulações e poliartralgia simétrica bilateral, que afeta tanto as articulações menores, (como as articulações interfalangeanas), quanto as articulações maiores, mais frequentemente o pulso, o tornozelo e o joelho (STAIKOWSKY et al., 2009). Os sintomas mais frequentes estão apresentados na Figura 9.

**Figura 9 - Frequência dos sintomas durante a infecção aguda do CHIKV**



Esquema ilustrativo lista, de acordo com a frequência média, os sintomas tipicamente relatados durante a fase aguda da infecção por CHIKV, em casos adultos sintomáticos.

Fonte: Traduzido de TANABE et al., 2018b



A fase pós-virêmica tem início a partir do sexto dia após o início dos sintomas (SIMON et al., 2015; MARQUES et al., 2017). Essa fase é caracterizada pela presença de apirexia, exantemas com espaços de pele saudável, prurido, mialgia, fadiga e podem ocorrer problemas digestivos como náusea e anorexia, e vasculares, como sangramentos (BORGHERINI et al., 2007; STAIKOWSKY et al., 2009; SIMON et al., 2015). No entanto, uma parte dos pacientes não se recupera durante a fase aguda, e entram na fase pós-aguda ou convalescente (> 14 dias, < 3 meses), podendo apresentar dores articulares, artrite, bursite, tenossinovite, que exibem ou não progressão contínua ou intermitente (SIMON et al., 2015; MARQUES et al., 2017).

A forma crônica da doença (> 3 meses) ocorre em cerca de 60% dos pacientes (TENG et al., 2015; VAN AALST et al., 2017), e se caracteriza pela ausência da maioria dos sintomas da fase aguda, exceto pela persistência de dor nas articulações (artrite e/ou tenossinovite e/ou entesite), acompanhada ou não de dores musculares (localizadas ou difusas), e outras sequelas, como fadiga e depressão, trazendo prejuízo para a saúde e para a qualidade de vida do indivíduo por até 6 anos (SIMON et al., 2015; VAN AALST et al., 2017; ZAID et al., 2017). A progressão para a fase crônica está associada à idade acima de 60 anos, maior carga viral e problemas articulares pregressos (HOARAU et al., 2010).

Durante o ressurgimento do CHIKV no surto das ilhas do Oceano Índico, em 2005, os pacientes afetados pelo CHIKV apresentaram sintomas clínicos atípicos e graves, com grande número de complicações neurológicas e mortalidade (SCHUFFENECKER et al., 2006; LEMANT et al., 2008; ECONOMOPOULOU et al., 2009; TOURNEBIZE; CHARLIN; LAGRANGE, 2009). Na Índia, em 2006, também foram observados casos graves de encefalite em decorrência da infecção pelo CHIKV (CHANDAK et al., 2009). A gravidade dos casos dessas epidemias foi associada ao surgimento de um novo sub-genótipo ECSA contendo a mutação E1-A226V (SCHUFFENECKER et al., 2006; KUMAR et al., 2008).

### 1.6.1 Patogênese

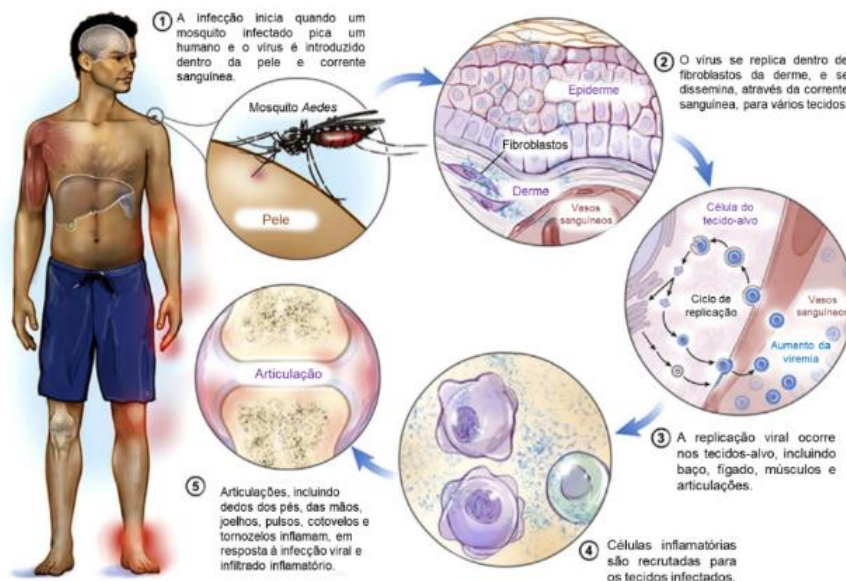
Inicialmente, após a inoculação percutânea das partículas virais no hospedeiro vertebrado, o vírus se replica em fibroblastos dérmicos e outras células susceptíveis presentes na pele (SOURISSEAU et al., 2007). O CHIKV alcança a microvasculatura

e é transportado, através da corrente sanguínea e linfática, para sítios de replicação primária, como linfonodos, baço e fígado (LABADIE et al., 2010). Em seguida, o CHIKV se dissemina para diferentes órgãos, incluindo músculos, articulações sinoviais e sistema nervoso central (COUDERC et al., 2008b; GARDNER et al., 2010; LABADIE et al., 2010; MORRISON et al., 2011). A disseminação do CHIKV provoca os sintomas agudos da CHIKF, e a carga viral atinge picos acima de  $10^9$  partículas virais por mililitros de sangue (PANNING et al., 2008).

Durante a fase aguda da CHIKF, o CHIKV se replica e provoca uma resposta inflamatória nos tecidos infectados, levando à infiltração local de diversas células imunes (LABADIE et al., 2010). O CHIKV atinge compartimentos musculares e articulares, onde infecta células musculares (OZDEN et al., 2007) e células presentes na articulação, como os sinoviócitos tipo B (PHUKLIA et al., 2013) e osteoblastos (NORET et al., 2012), causando sintomas artríticos através da produção de fatores solúveis que contribuem para o desequilíbrio da homeostase articular e provocam sintomas que podem persistir até a fase crônica.

A persistência dos sintomas articulares da CHIKF durante a fase crônica é atribuída à presença do RNA viral ou de produtos que provocam um acúmulo de mediadores inflamatórios (MORRISON et al., 2011), no entanto, esse mecanismo ainda não foi completamente elucidado devido à ausência de modelos animais que reproduzam fielmente a síndrome reumática crônica causada pelo CHIKV (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). As etapas da patogênese provocada pela infecção do CHIKV são ilustradas na Figura 10 (pág. 40).

**Figura 10 - Etapas sucessivas da infecção pelo CHIKV em humanos.**



Inoculação de CHIKV através da picada de mosquitos *Aedes* (1). Replicação viral no local da inoculação, em fibroblastos dérmicos (2). Replicação nos tecidos alvo, com recrutamento de células inflamatórias para tecidos infectados (3). Inflamação das articulações (4).

Fonte: Traduzido de COUDERC; LECUIT (2015)

### 1.6.2 Resposta Imunológica

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção pelo CHIKV se inicia no local da inoculação viral intradérmica durante a refeição de sangue do mosquito-fêmea infectado (SOURISSEAU et al., 2007). Na pele, o CHIKV é reconhecido por células residentes da epiderme, como fibroblastos (SOURISSEAU et al., 2007; COUDERC et al., 2008a) e queratinócitos (PUIPROM et al., 2013), que reconhecem o RNA genômico do CHIKV, e formas intermediárias, como o dsRNA, desencadeando a resposta imune antiviral através de PRRs, como os receptores endossômicos semelhantes ao Toll (TLR, do termo em inglês *Toll like receptors*) (TLR-3 e TLR-7), receptores de genes I indutores de ácido retinóico (RIG-1) e o antígeno 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA5) (PRIYA; PATRO; PARIDA, 2014; FOX; DIAMOND, 2016).

O reconhecimento por PRRs promove a translocação nuclear de fatores de transcrição que induzem a expressão de genes estimulados por Interferon (ISGs), citocinas e quimiocinas inflamatórias (SCHILTE et al., 2010; WHITE et al., 2011; RUDD et al., 2012). A resposta de interferon do tipo I (IFN-I) controla a patogênese causada pela replicação do CHIKV (COUDERC et al., 2008a). Diferentes estudos com pacientes mostraram uma forte resposta antiviral, com alta produção de interferon do tipo 1 (IFN-I) nas fases iniciais da infecção, que é um dos principais responsáveis pelo combate à infecção durante a fase aguda (HOARAU et al., 2010; WAUQUIER et al., 2011). As quimiocinas provocam o influxo de células inflamatórias para os tecidos infectados, como macrófagos (LABADIE et al., 2010), neutrófilos (HIROKI et al., 2020), células dendríticas e células natural killers (NK) (HOARAU et al., 2010).

Durante a infecção pelo CHIKV, diversos fatores solúveis são detectados, incluindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, MCP-1, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e quimiocinas, como CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL8/IL-8 e RANTES (NG et al., 2009b; WIN et al., 2010; CHAITHANYA et al., 2011; CHOW et al., 2011; KELVIN et al., 2011; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; LOHACHANAKUL et al., 2012; CHIRATHAWORN et al., 2013; NITATPATTANA et al., 2014; TANABE et al., 2019). Alguns desses fatores solúveis, como IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF e MCP-1, se correlacionam com a progressão da gravidade da doença ou a persistência das dores articulares (NG et al., 2009b; CHOW et al., 2011).

A imunidade adaptativa possui um papel dual na infecção pelo CHIKV, pois de um lado, é necessária para a eliminação do vírus e para a geração da memória imunológica contra infecções subsequentes, e do outro lado, contribui para a ocorrência de alterações patológicas durante a fase aguda (FOX; DIAMOND, 2016).

Linfócitos T CD8+ ativados podem ser detectados nos dias iniciais da infecção e, através da produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ), promovem a atividade de células natural-killers (NK) e aumenta a expressão de MHC-II em células apresentadoras de antígenos (APCs) (WAUQUIER et al., 2011).

A resolução da CHIKF se dá pela depuração do vírus dos órgãos-alvo e pela cessação da resposta inflamatória exacerbada nos órgãos infectados do hospedeiro (revisado em SRIVASTAVA et al., 2020). Cerca de 7 a 10 dias após o início dos sintomas, uma alta concentração de linfócitos T CD8+ ativados circula na corrente sanguínea de indivíduos infectados (MINER et al., 2015) e em tecidos músculo esqueléticos afetados em modelos murinos (TEO et al., 2013). Os estágios finais da

fase aguda são marcados por uma mudança da resposta de células T CD8+ para T CD4+, e pela produção de citocinas anti-inflamatórias (WAUQUIER et al., 2011). Estudos utilizando modelos animais indicam que células T CD4+ desempenham um papel fundamental na depuração do vírus (LUM et al., 2013; TEO et al., 2013).

Em modelos animais, a partir da primeira semana de infecção, um grande número de linfócitos T CD4+ são detectados na sinóvia e contribuem para o estabelecimento da doença crônica articular através de respostas Th1 e Th17 (TEO et al., 2013).

Células B e T possuem um papel essencial na supressão da viremia, mas não são capazes de eliminar completamente o vírus dos tecidos (HAWMAN et al., 2013). Atualmente, não existem evidências de isolamento viral a partir do tecido articular crônico, no entanto, o RNA do CHIKV foi detectado na articulação de modelos animais, com mais de 30 dias após a infecção (LABADIE et al., 2010; HAWMAN et al., 2013).

Outro estudo demonstrou a persistência do RNA viral e de proteínas do CHIKV em macrófagos perivasculares cercados de neutrófilos e linfócitos T CD4+ infiltrantes em uma biópsia do tecido sinovial, de um paciente com síndrome reumática crônica causada pelo CHIKV (18 meses após início dos sintomas) (HOARAU et al., 2010). A presença de RNA viral está associada à persistência dos sintomas articulares, como sinovite, artrite e tendinite (HAWMAN et al., 2013), e é controlada por respostas imunes adaptativas (HAWMAN et al., 2013). O estudo da biópsia de tecidos de pacientes crônicos, com presença de RNA viral na articulação, revelou hiperplasia sinovial, acentuada angiogênese, lesões teciduais, morte celular e erosão óssea, e altos níveis de CCL2/MCP-1, IL-6 e RANK-L (HOARAU et al., 2010).

Estudos em camundongos demonstraram que linfócitos B e anticorpos anti-CHIKV específicos são necessários para a depuração do vírus das articulações, no entanto, foi demonstrado que a proteína E2 possui aminoácidos determinantes de depuração e da potência de neutralização do soro de humanos e murinos e algumas cepas possuem mecanismos de escape para evitar a depuração e persistir nas articulações (HAWMAN et al., 2016).

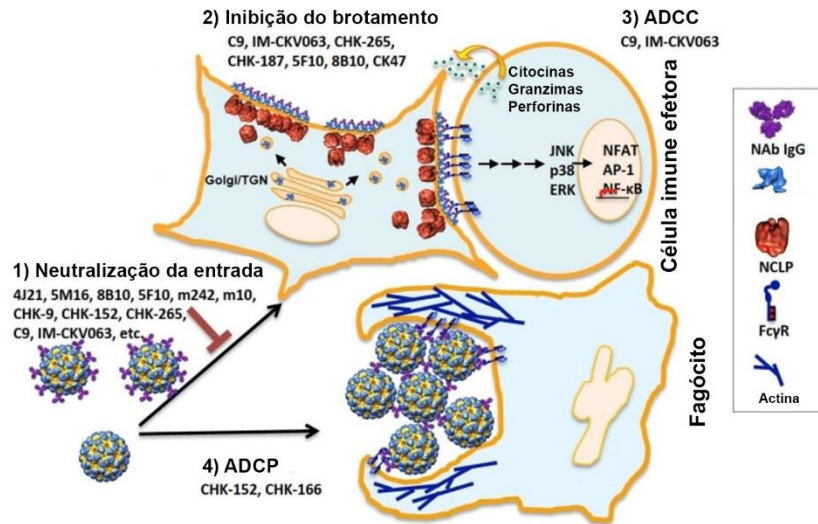
### 1.6.2.1 Resposta de anticorpos do hospedeiro

A interação de anticorpos com o CHIKV é um evento chave da imunidade adaptativa para o controle da infecção (LUM et al., 2013). Os anticorpos anti-CHIKV produzidos pelas células B são um grupo heterogêneo de IgM e IgG, que podem ser neutralizantes ou não, e durante a fase aguda podem prever um bom prognóstico ou a progressão para a fase crônica da CHIKF (NAYAK et al., 2020). Anticorpos IgM são detectáveis geralmente a partir de 4 dias após o início dos sintomas, sendo o isotipo predominante até o dia 10, fornecendo imunoproteção precoce com forte ação neutralizante associada à redução da viremia (CHUA et al., 2017). A diminuição de IgM coincide com o desenvolvimento da resposta de anticorpos IgG, que são detectáveis a partir do sétimo dia após início dos sintomas e podem durar até 21 meses após a infecção, com eficácia duradoura na neutralização do CHIKV (KAM et al., 2012). Um estudo de coorte identificou o IgG3 como o principal subtipo predominante durante a infecção pelo CHIKV (KAM et al., 2012)

Os anticorpos neutralizantes (NAbs) podem apresentar diferentes estratégias, independentes entre si, para inibir a infecção do CHIKV nas células do hospedeiro (revisado em JIN, SIMMONS, 2019). A neutralização pode ocorrer por meio da ligação ao vírus impedindo que o vírus se ligue ao receptor da célula-alvo (PORTA et al., 2016b), imobilizando proteínas para impedir que o *loop* de fusão seja exposto, bloqueando a fusão das membranas (SUN et al., 2013), através da inibição do brotamento de partículas virais da célula infectada (MASRINOUL et al., 2014) e/ou inibindo a incorporação das glicoproteínas ao nucleocapsídeo na membrana durante a montagem/brotamento (JIN et al., 2018a). Ao serem produzidos em resposta à infecção ou após a administração passiva, além da ação neutralizante, os anticorpos podem interagir com receptores de células do sistema imune e desencadear diversas respostas efetoras, como a ativação do sistema complemento, a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) (FOX et al., 2019) e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (JIN et al., 2018b). Em contrapartida, em doses subneutralizantes, a fração Fc dos NAbs interagem com receptores presentes na superfície celular de monócitos e células B, desencadeando o processo de ADE (ADE, do termo em inglês *antibody-dependent enhancement*) da infecção, como

demonstrado *in vitro* e *in vivo* (LUM et al., 2018). Os mecanismos antivirais de anticorpos estão ilustrados na Figura 11.

**Figura 11 - Mecanismos antivirais de anticorpos neutralizantes**



Os NAbs anti-CHIKV podem neutralizar a entrada do vírus nas células suscetíveis (1), inibir o brotamento da prole viral de células infectadas com CHIKV (2), ativar o ADCC para eliminar células infectadas com CHIKV (3) e ADCP para eliminar vírions (4). Siglas: NCLP, partícula semelhante a nucleocapsídeo; ADCC, citotoxicidade celular dependente de anticorpos; ADCP, fagocitose celular dependente de anticorpos.

Fonte: Adaptado de JIN; SIMMONS, 2019.

## 1.7 Uso de anticorpos na terapia

Atualmente, não existe terapia específica contra o CHIKV, no entanto, diversos estudos concentram-se na busca de anticorpos capazes de inibir a infecção viral, e que possam ser utilizados terapêuticamente (NARDIN et al., 2012; FRIC et al., 2013; FOX et al., 2015). A administração profilática e terapêutica de anticorpos neutralizantes (NAb) foi capaz de conferir proteção e de impedir a persistência do RNA viral em tecidos musculares de modelos murinos (HAWMAN et al., 2013). Adicionalmente, anticorpos isolados durante a fase convalescente de pacientes foram eficazes na prevenção e cura da CHIKF em camundongos (COUDERC et al., 2009; FRIC et al., 2013). Outro estudo demonstrou que a administração terapêutica de anticorpos monoclonais recombinantes reduziu a carga viral nos tecidos articulares em camundongo; e reduziu a viremia e a gravidade da Síndrome Reumática Crônica

(SRC) em macacos *Rhesus* (BROECKEL et al., 2017). A transferência passiva de anticorpos monoclonais (mAbs) neutralizantes protegeu modelos animais da infecção por diferentes *Alphavirus* artritogênicos, bloqueando diferentes etapas do ciclo replicativo, incluindo a entrada e a saída do vírus (SMITH et al., 2015). Em NHPs, foi demonstrada uma atividade terapêutica promissora de mAbs anti-CHIKV humano, fornecendo evidências iniciais para o possível uso terapêutico, para tratar pacientes com infecções ativas por CHIKV (BROECKEL et al., 2017). Em humanos, a administração de terapia com imunoglobulina intravenosa, associada à antibioticoterapia, mostrou-se eficaz no tratamento de um paciente com sintomas graves, e em um paciente com encefalite causada pelo CHIKV (SCOTT et al., 2017; FERNANDES et al., 2019).

## **1.8 Uso de anticorpos no diagnóstico**

A escolha do método de diagnóstico para a infecção pelo CHIKV depende do tempo de coleta da amostra em relação ao início dos sintomas, do volume de amostra e da disponibilidade dos testes. Geralmente, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo CHIKV pode ser feito através da detecção direta do vírus, como no uso do cultivo viral ou de técnicas moleculares como RT-PCR e RT-qPCR durante o início da fase aguda, e/ou pode ser feita através de ensaios sorológicos para detectar a soroconversão para IgM ou IgG, em fases mais tardias da infecção pelo CHIKV (BURDINO, CALLERI, et al., 2016a). Os testes sorológicos também podem ser úteis para determinar infecções passadas ou em pesquisas epidemiológicas para o cálculo da incidência de CHIKV em determinadas populações.

A sensibilidade do teste sorológico pode variar de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas, o genótipo viral ou devido à presença de mutações de escape no genoma do vírus, que podem estar expressas nas amostras a serem testadas ou nos antígenos utilizados para a fabricação dos testes, podendo influenciar na sensibilidade e especificidade de testes laboratoriais (BLACKSELL, TANGANUCHITCHARNCHAI, et al., 2011, BURDINO, CALLERI, et al., 2016b, TUEKPRAKHON, NAKAYAMA, et al., 2018a, YAP et al., 2010).



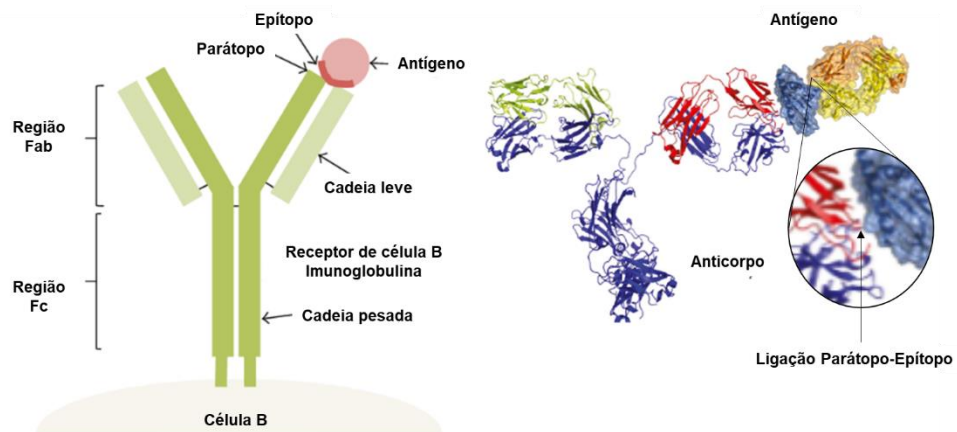
A especificidade da ligação do anticorpo ao epítopo é uma relevante ferramenta para a pesquisa e diagnóstico (SELA-CULANG; KUNIK; OFRAN, 2013). Um estudo comparando a sensibilidade e especificidade de três testes diferentes que utilizam vírus inteiros ou antígenos recombinantes, que possuem E1-A226, demonstrou que a detecção de um dos testes (um determinado kit de imunocromatografia de fluxo lateral) foi ineficaz, devido a presença da mutação E1-A226V no vírus proveniente de amostras de soro de pacientes previamente confirmados por RT-PCR (YAP et al., 2010). No mesmo estudo, a mesma mutação (E1-A226V), desta vez presente no antígeno utilizado para a construção de um MAC-ELISA, mostrou 100% de sensibilidade em relação MAC-ELISA E1-226A (YAP et al., 2010). Estes resultados sugerem que a fabricação de testes rápidos, com antígenos de vírus isolados durante um surto específico, pode melhorar a sensibilidade para detecção de anticorpos em amostras de pacientes infectados neste mesmo surto (YAP et al., 2010). Abordagens *in silico* revelaram diferenças nas configurações dos epítopos preditos, que abrangiam a posição E1-226, sugerindo que diferenças estruturais causadas por mutações podem ter impactado na sensibilidade de diferentes testes (YAP et al., 2010). Ainda, a sensibilidade e especificidade de um teste comercial, fabricado com mAbs isolados de um paciente tailandês infectado com o genótipo ECSA (OKABAYASHI et al., 2015), foram prejudicadas quando testadas para detectar CHIKV dos genótipos Asiático e WA, devido uma reatividade mais fraca entre o anticorpo e o epítopo, que foi provocada por uma diferença de aminoácidos na posição 284 da E1, onde o ácido glutâmico (E) estava presente em cepas ECSA, e o ácido aspártico (D) estava presente nas cepas asiáticas (HUIITS et al., 2018; TUEKPRAKHON et al., 2018).

Em conjunto, a literatura científica aponta que é imprescindível a avaliação detalhada dos kits e protocolos antes da implementação destas ferramentas diagnósticas para o uso na ocorrência de diferentes surtos. Esses achados ressaltam a importância de realizar análises moleculares sobre o impacto da variabilidade genética do CHIKV durante o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos, tendo em vista sua contribuição para a especificidade e sensibilidade do teste, resultando em um melhor diagnóstico possível, considerando a coocorrência de diferentes genótipos em alguns países da Ásia e da América (LANCIOTTI, VALADERE, 2014).

## 1.9 Reconhecimento dos antígenos por linfócitos B e anticorpos

A produção de anticorpos ocorre após o reconhecimento dos antígenos expostos na superfície viral, através de receptores de célula B (BCRs) presentes na superfície celular, que interagem diretamente com os epítomos presentes nos antígenos, através de resíduos de aminoácidos presentes nas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), denominadas parátomo (Figura 12) (MURPHY, 2014).

**Figura 12 - Reconhecimento de epítomos de células B**



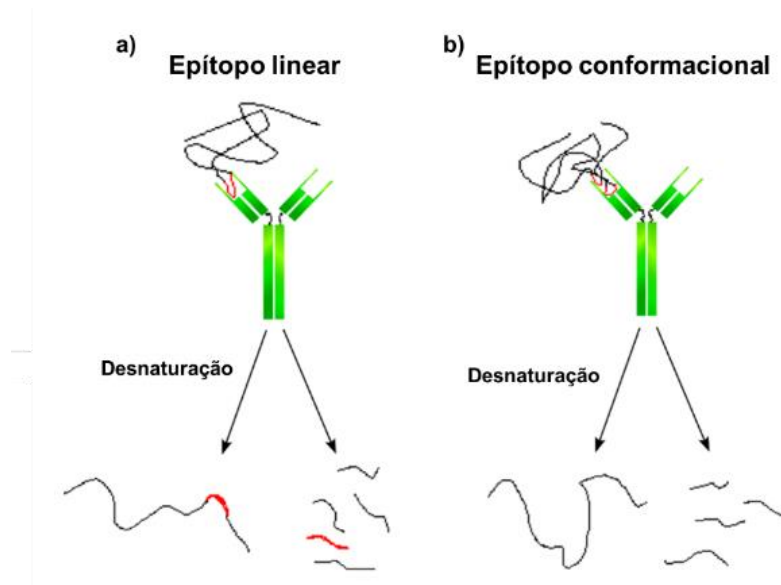
Os epítomos de células B são regiões expostas do antígeno, que se ligam a imunoglobulinas secretadas e/ou ligadas a células B. (a) Os receptores de células B abrangem imunoglobulinas ligadas a células, consistindo em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. (b) Representação molecular da interação entre um anticorpo (parátomo) e o antígeno (epítomo).

Fonte: Traduzido de SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017.

A ativação das células B provoca sua proliferação e diferenciação em plasmócito levando à secreção de anticorpos para o meio extracelular (MURPHY, 2014). A resposta de anticorpos ocorre através da interação dos domínios variáveis de suas cadeias leves e pesadas, que apresentam regiões de hiper variabilidade, que possuem sequências específicas complementares aos epítomos (MURPHY, 2014).

Os epítomos de células B podem ser classificados em lineares (contínuos) ou conformacionais (descontínuos) (Figura 13) (ATASSI; SMITH, 1978).

**Figura 13 – Classificação de epítomos de célula B**



Representação esquemática de dois anticorpos interagindo com epítomos (em vermelho) lineares e conformacionais. Os epítomos lineares (a) consistem em resíduos contínuos em uma sequência de proteína, e após a desnaturação, ainda são capazes de se ligarem a anticorpos. Os epítomos conformacionais (b) consistem em resíduos que são descontínuos na sequência da proteína, embora se aproximem para formar uma superfície antigênica na estrutura tridimensional da proteína. Após a desnaturação, os epítomos conformacionais não se ligam a anticorpos.

Fonte: Adaptado de rostlab.org

Os epítomos lineares são compostos por resíduos sequenciais formando pequenos peptídeos, enquanto os epítomos conformacionais dependem da estrutura tridimensional da proteína e a desnaturação do antígeno resulta na perda do seu reconhecimento pelos linfócitos B (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017). Estima-se que 90% dos epítomos reconhecidos por células B sejam conformacionais, enquanto que a minoria é constituída de epítomos lineares (WALTER, 1986). Acredita-se que, os epítomos contínuos sequenciais (ou lineares), na verdade, geralmente representam apenas uma parte de um epítopo descontínuo maior (VAN REGENMORTEL, 1989). Mesmo assim, os estudos de epítomos de células B lineares podem ser facilmente aplicados para o desenho de vacinas com objetivo de estimular a produção de anticorpos.

De modo geral, o conhecimento acerca dos epítomos de célula B permite o uso de anticorpos para uma maior compreensão da etiologia da doença, monitoramento

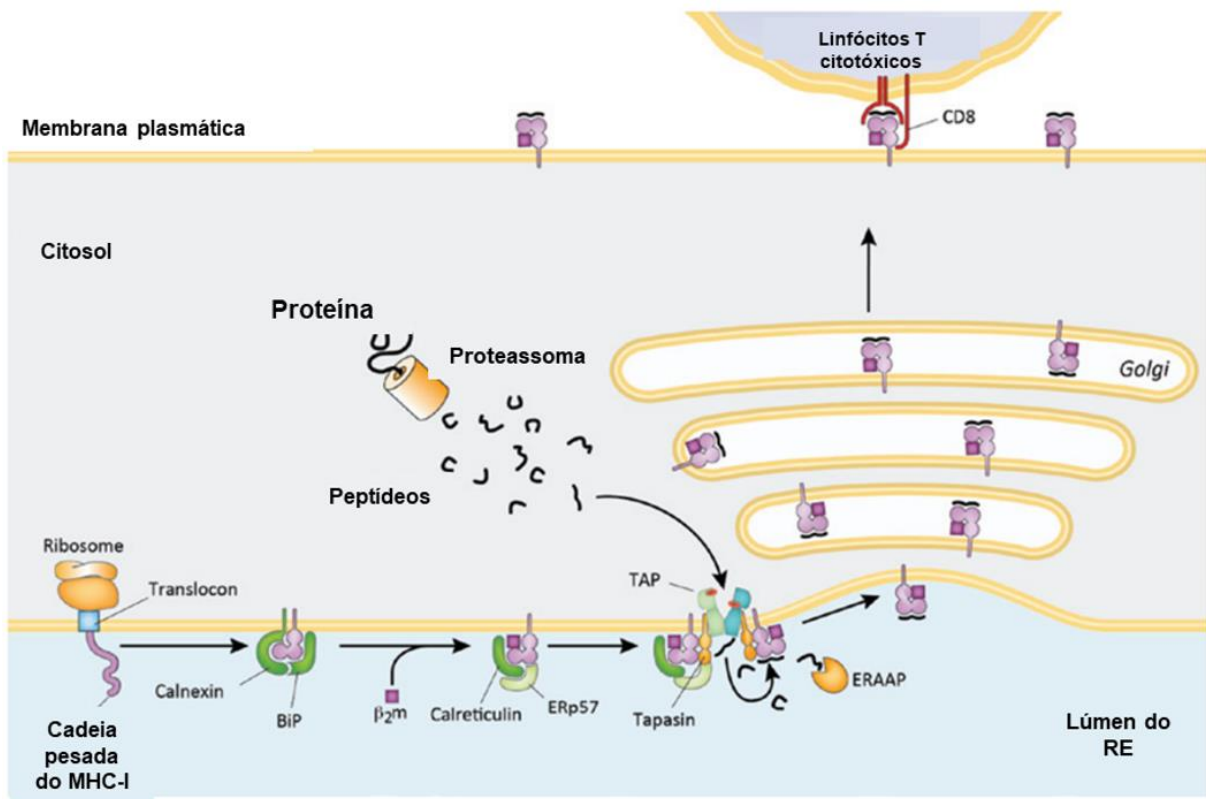
imunológico, desenvolvimento de ensaios de diagnóstico e projeto de vacinas baseadas em epítomos (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017). Mutações em regiões da superfície das proteínas do envelope viral podem impactar também o reconhecimento de anticorpos, como foi demonstrado por Kam e colaboradores (2012), onde uma mutação na proteína E2 (E2-K252Q) alterou a carga líquida da proteína e interrompeu a ligação do anticorpo anti-CHIKV a epítomos-alvo específicos (KAM et al., 2012).

### **1.10 Reconhecimento de antígenos por linfócitos T**

Diferentemente do reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B e anticorpos, que interagem diretamente com aminoácidos presentes nas superfícies de proteínas antigênicas, os linfócitos T (LT) reconhecem peptídeos oriundos de proteínas dos patógenos invasores associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Os LT citotóxicos (LTc) reconhecem antígenos sintetizados endogenamente que são processados e apresentados por moléculas de classe I (MHC-I), que são expressas em todas as células nucleadas. Os LT auxiliares (LTa) reconhecem antígenos ingeridos em compartimentos endocíticos de APCs como peptídeos ligados a moléculas do MHC de classe II (MHC-II) (MURPHY, 2014).

Para serem apresentados nas moléculas do MHC-I, antígenos proteicos citosólicos precisam ser processados gerando peptídeos, através de uma via formada por diferentes etapas seletivas, não-aleatórias e com diferentes especificidades (Figura 14).

**Figura 14 - Via de processamento de antígenos para apresentação pelo MHC-I**



Fonte: Traduzido de EGGENSPERGER; TAMPÉ, 2015

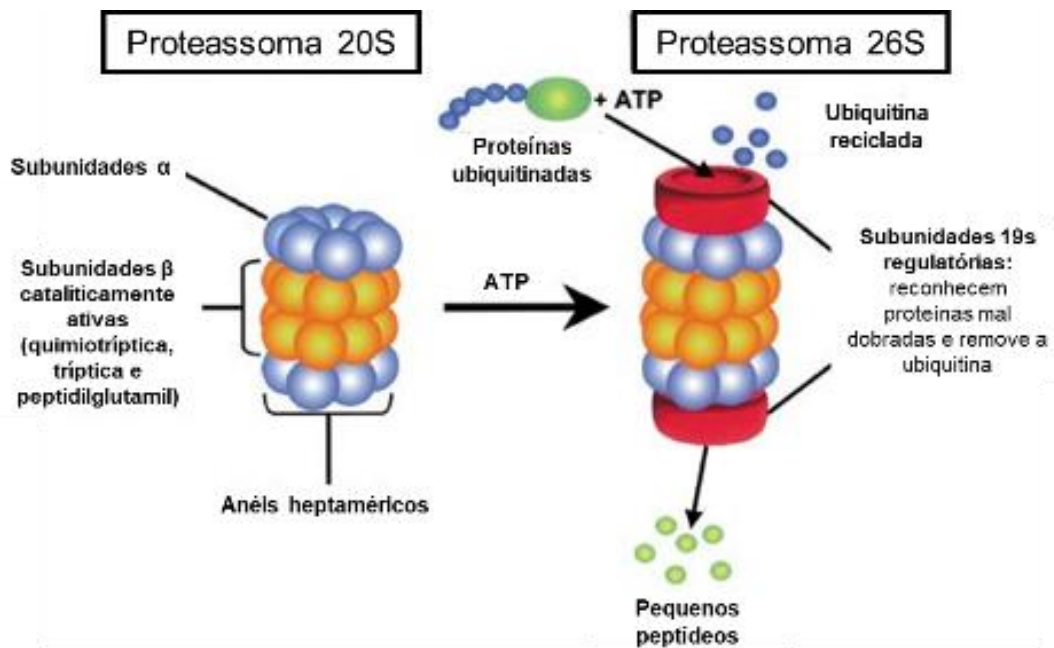
### 1.10.1. Clivagem de peptídeos pelo proteassoma e imunoproteassoma

A etapa inicial da via de processamento dos peptídeos é a clivagem pelo proteassoma, que é um processo fundamental para a homeostase celular, evitando o acúmulo de proteínas não funcionais e potencialmente tóxicas através de uma destruição seletiva e garantindo a qualidade das proteínas intracelulares (GOLDBERG, 2003).

O proteassoma é um complexo de múltiplas subunidades que está envolvido no fornecimento de fragmentos peptídicos provenientes de proteínas citoplasmáticas, que são úteis para a apresentação de antígenos, configurando-se a primeira etapa da via de processamento de antígenos para apresentação pelo MHC-I (ROCK; GOLDBERG, 1999). Esse complexo é formado por uma unidade central 20S, abundante no citoplasma e no núcleo, que possui uma estrutura oca e cilíndrica, composta por 4 anéis heptaméricos empilhados, sendo dois anéis externos idênticos,

um em cada extremidade, composto por sete subunidades  $\alpha$  e dois anéis internos idênticos composto por sete subunidades  $\beta$  (RAYNES; POMATTO; DAVIES, 2016). Os dois anéis internos formados pelas subunidades  $\beta$  formam uma câmara catalítica que desempenha as atividades quimiotríptica, tríptica e peptidilglutamil (ALMOND; COHEN, 2002) (Figura 15).

**Figura 15 - Via do proteassoma para a degradação de proteínas**

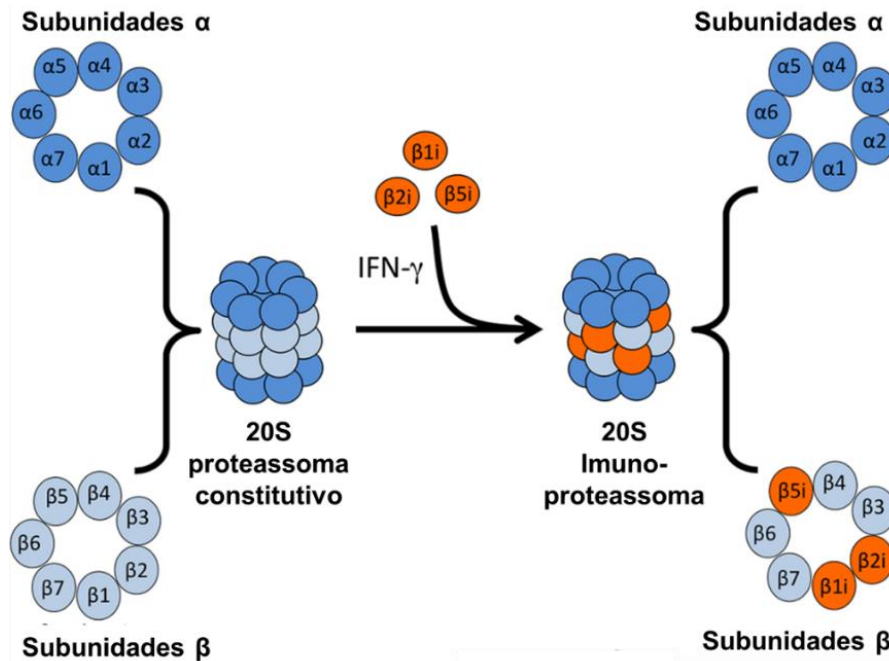


Substratos de proteína são primeiro conjugados a várias moléculas de ubiquitina. O substrato ubiquitinado é rapidamente degradado pelo proteassoma 26S, que é um complexo dependente de ATP contendo o proteassoma 20S central junto com duas subunidades regulatórias 19S.

Fonte: ALMOND; COHEN, 2002

A resposta imune adquirida pode induzir uma via alternativa à montagem do proteassoma através da estimulação por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), onde são incorporadas as subunidades alternativas  $\beta 1i$  (ou LMP2),  $\beta 2i$  (ou MECL-1) e  $\beta 5i$  (ou LMP7), e o proteassoma passa a ser denominado imunoproteassoma (Figura 16) (AKI et al., 1994; AKIYAMA et al., 1994; GROETTRUP et al., 1996). A expressão do imunoproteassoma é induzível na maioria dos tecidos e constitutiva em células hematopoiéticas, especialmente linfócitos e monócitos (HUBER et al., 2012).

**Figura 16 - Formação do imunoproteassoma**



A exposição ao IFN- $\gamma$  induz a síntese de três  $\beta$  "imunossubunidades", que são incorporadas aos proteassomas recém-formados no lugar de suas contrapartes constitutivas, formando o 20S imunoproteassoma.

Fonte: Traduzido de MCCARTHY; WEINBERG, 2015

A clivagem por esses complexos possuem algum grau de especificidade e forte efeito posicional, clivando proteínas de forma dependente ou não de ubiquitinação (EGGERS et al., 1995). O proteassoma constitutivo e o imunoproteassoma têm preferências por propriedades de aminoácidos diferentes para a clivagem (KEŞMIR et al., 2002), e ambos são competentes para o processamento de antígenos gerando peptídeos que possam se encaixar nas moléculas do MHC-I (VAN DEN EYNDE; MOREL, 2001).

Em sua câmara central, o proteassoma constitutivo contém sítios proteolíticos que preferencialmente clivam sítios após aminoácidos hidrofóbicos ou básicos ou ácidos, (NIEDERMANN et al., 1999; ROCK; GOLDBERG, 1999). No imunoproteassoma, a subunidade  $\beta 1i$  aumenta a produção de peptídeos com resíduos pequenos hidrofóbicos, aromáticos, de cadeia ramificada ou carregados na extremidade C-terminal, e antes de resíduos neutros e polares (NIEDERMANN et al.,

1999). É interessante que ambos têm preferência principal por clivagem após resíduos hidrofóbicos para possibilitar o encaixe do peptídeo na fenda do MHC-I.

Os peptídeos gerados pelos proteassomas geralmente possuem  $8 \pm 1$  resíduos, variando entre 3 e 30 resíduos de comprimento, onde aproximadamente dois terços dos produtos proteassomais são muito curtos para se associar a moléculas do MHC-I (KISSELEV; AKOPIAN; GOLDBERG, 1998). Apenas cerca de 10% dos produtos proteassomais têm comprimento adequado para se ligar à moléculas do MHC-I (KISSELEV et al., 1999).

Essa variedade de tamanho dos peptídeos gerados pelo proteassoma é resolvida através da aparagem por aminopeptidases presentes no citosol, como a leucina aminopeptidase (LAP), a aminopeptidase sensível à puromicina (PSA, do inglês *Puromycin-sensitive aminopeptidase*), a bleomicina hidrolase (BH) e a tripeptidil peptidase (TTP II), que aparam a extremidade N-terminal dos peptídeos para que alcancem o comprimento de oito a dez resíduos, o necessário para ser apresentado pelo MHC-I (STOLTZE et al., 2000). Essa complementaridade no sistema de clivagem para formação de peptídeos aumenta a eficiência da produção de peptídeos e reduz o escape imunológico de vírus que interferem no processamento realizado pelo proteassoma. Ainda assim, somente 10-15% dos peptídeos produzidos pelos proteassomas têm o comprimento ideal para se ligar ao MHC-I (KISSELEV et al., 1999).

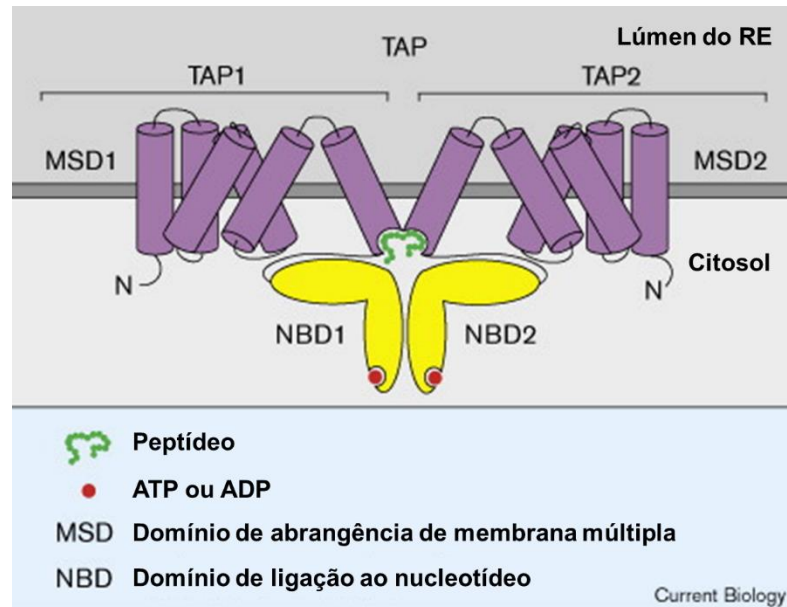
#### 1.10.2. Transporte pela proteína transportadora de antígenos (TAP)

Após o processamento de proteínas endógenas pelo complexo do proteassoma, os peptídeos são translocados para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) através do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP, do inglês *Transporter associated with antigen processing*), para então, no RE, serem associados/ligados as moléculas de MHC-I recém-sintetizadas, e após estabilização, serem transportados para a superfície celular através da via secretora. O TAP é um heterodímero formado pelas proteínas TAP1 e TAP2, que pertence à superfamília dos transportadores ABC, que transportam peptídeos de maneira dependente de ATP (NIJENHUIS et al., 1996). Os transportadores ABC são caracterizados por possuírem dois grandes domínios que abrangem várias



membranas e dois domínios menores de ligação a nucleotídeo em forma de L (Figura 17) (KARTTUNEN; TROWSDALE; LEHNER, 1999).

**Figura 17 - Organização do heterodímeros da Proteína Transportadora de Antígenos (TAP)**



Fonte: Adaptado de KARTTUNEN; TROWSDALE; LEHNER, 1999

Os domínios das membranas contém as sequências de especificidade do peptídeo, enquanto os domínios de ligação ao nucleotídeo, se ligam e hidrolisam o ATP (KARTTUNEN; TROWSDALE; LEHNER, 1999).

A TAP, assim como o imunoproteassoma, é regulada positivamente pelo IFN- $\gamma$ , o que aumenta a capacidade de transporte de peptídeos para o interior do RE (LANKAT-BUTTGEREIT; TAMPÉ, 1999). Os peptídeos translocados são semelhantes ou ligeiramente maiores em comprimento em relação ao esperado para ligação a moléculas de MHC-I. Peptídeos longos são cortados pela aminopeptidase residente no RE (ERAP1), em fragmentos contendo 8 ou 9 aminoácidos (YORK et al., 2002).

As preferências de resíduos de aminoácidos da TAP, assim como as preferências do imunoproteassoma, coevolúram com as preferências do MHC-I para uma apresentação de antígenos eficaz (UEBEL; TAMPÉ, 1999). Sabe-se que os resíduos que contribuem para a especificidade da TAP são: o aminoácido C-terminal que deve ser hidrofóbico ou básico, e os três aminoácidos N-terminais, que devem ser

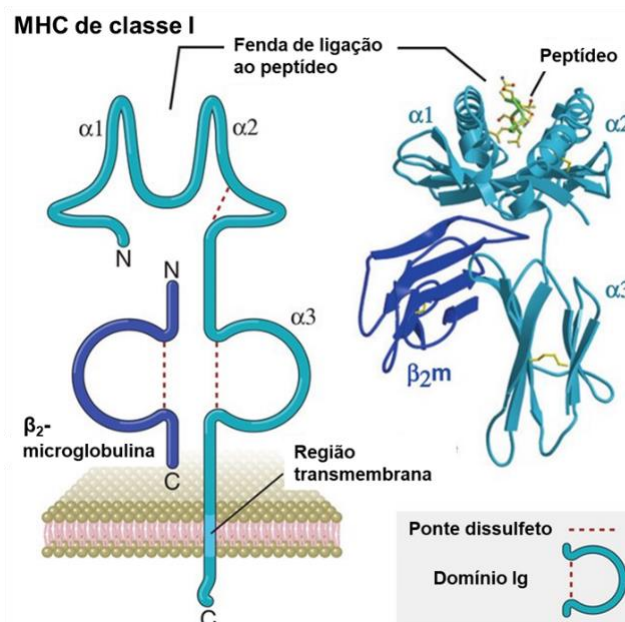
carregados positivamente nas posições P1 e P2 e aromáticos e/ou hidrofóbicos na posição P3 (HEEMELS; PLOEGH, 1994; MOMBURG et al., 1994).

### 1.10.3. Ligação dos peptídeos às moléculas do MHC-I

A molécula de MHC-I é formada por um heterodímero de cadeia  $\alpha$  (codificada pelos genes do MHC, cromossomo 6 em humanos) associada não-covalentemente à uma  $\beta$ -microglobulina (codificada no cromossomo 15 de humanos) (MURPHY, 2014).

A cadeia  $\alpha$  atravessa a membrana e se divide em três domínios externos:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . A  $\beta$ -microglobulina não atravessa a membrana e consiste em apenas um domínio que se liga não-covalentemente ao domínio  $\alpha_3$ , formando uma estrutura semelhante aos domínios constantes da imunoglobulina. Os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  se dobram em uma única estrutura consistindo em duas  $\alpha$ -hélices antiparalelas que se sobrepõem a uma folha  $\beta$  de oitos fitas  $\beta$  (Figura 18) (BJORKMAN et al., 1987; MURPHY, 2014).

**Figura 18 - Esquema da estrutura 3D do MHC-I**



Fonte: Adaptado de Abbas, Lichtman e Pillai (2012)

Em humanos, as moléculas do MHC são conhecidas como Antígeno Leucocitário Humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigen*) que são codificados

por genes, situados no *locus* 21 do braço curto do cromossomo 6, e é conhecido como a região mais variável do genoma humano (HORTON et al., 2008). Os genes MHC-I clássicos compreendem três classes em humanos (HLA-A, HLA-B e HLA-C). Os diferentes alelos do MHC-I não estão distribuídos igualmente na população humana (NEEFJES; OVAA, 2013) e podem ser determinantes para a susceptibilidade, severidade e progressão de doenças virais (MIGLIORINI et al., 2021).

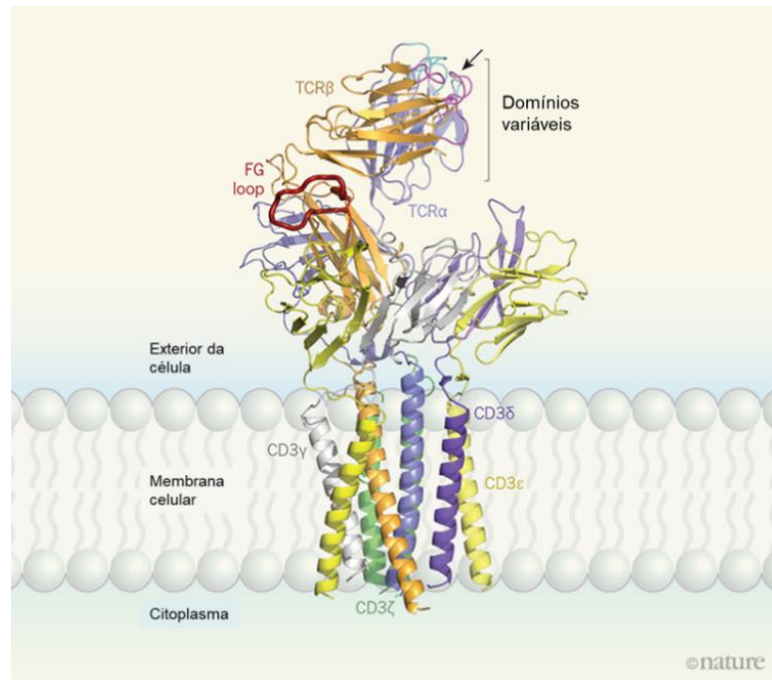
O enorme polimorfismo alélico das moléculas do MHC-I se concentra na região que interage com os peptídeos, possibilitando a ligação a uma grande diversidade de peptídeos (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). Os diferentes alelos diferem nas preferências da ligação do peptídeo, e dependem de outras moléculas que compõem o complexo de carregamento do peptídeo (PLC, do inglês *peptide-loading complex*), como a Tapasina, para a seleção ideal do peptídeo.

A maioria dos peptídeos ligantes ao MHC-I compreendem de 8 a 10 aminoácidos de comprimento, com predileção mais prevalente para 9 resíduos de comprimento, onde os principais resíduos-âncora localizam-se na posição 2 (P2) e C-terminal do peptídeo, com predileção para resíduos hidrofóbicos, alifáticos ou carregados na extremidade C-terminal (RAMMENSEE; FALK; RÖTZSCHKE, 1993).

### 1.11. Reconhecimento Pelo TCR

Os linfócitos T reconhecem os fragmentos de peptídeos associados ao MHC através de seus receptores de célula T (TCR do inglês *T cell receptor*) presentes na sua superfície celular. O complexo do TCR é formado pelas cadeias TCR $\alpha$  e TCR $\beta$ , e mais seis proteínas que são conhecidas como CD3 (duas CD3 $\epsilon$ , uma CD3 $\gamma$ , uma CD3 $\delta$  e duas CD3 $\zeta$ ) (Figura 19) (REINHERZ, 2019).

**Figura 19 - Estrutura do complexo TCR**



O complexo do TCR contém uma cadeia TCR $\alpha$  (roxo claro), uma cadeia TCR $\beta$  (laranja), dois CD3 $\epsilon$  (amarelo), um CD3 $\gamma$  (branco), um CD3 $\delta$  (roxo escuro) e dois CD3 $\zeta$  (verde). TCR $\alpha$  e TCR $\beta$  tem um domínio variável com laços de ligação (ciano e magenta, respectivamente) que reconhecem um complexo de um peptídeo ligado ao MHC (não mostrada). O TCR liga o pMHC de uma maneira seletiva na direção no local indicado pela seta. O loop FG (vermelho) da região constante do TCR $\beta$  está envolvida na ativação da célula T.

Fonte: Adaptado de (REINHERZ, 2019)

O TCR possui regiões determinantes de complementaridade (CDR, do inglês *Complementarity Determining Regions*), que formam a região de ligação ao antígeno (CHOTHIA; BOSWELL; LESK, 1988), e se ligam especificamente a um complexo formado por um peptídeo ligado não-covalentemente à uma molécula do MHC (p-MHC) (BONILLA; OETTGEN, 2010), para serem ativados e desencadear suas funções efetoras. Alguns complexos pMHC são mais imunogênicos e os fatores determinantes de imunogenicidade não foram completamente elucidados, contudo, sabe-se que as posições centrais do peptídeo (P4 a P6) são importantes, e que aminoácidos com cadeias laterais grandes e aromáticas parecem ser mais bem reconhecidas por linfócitos T (CALIS et al., 2013).

## 1.11 Imunoinformática

A imunologia computacional ou imunoinformática (uma junção das grandes áreas da Imunologia e bioinformática) é um novo campo que surgiu devido à enorme quantidade de dados imunológicos gerados pelo avanço da tecnologia de sequenciamento e proteômica, seguido do advento de técnicas de biologia molecular de alto rendimento para mapeamento de epítomos capazes de estimular a resposta imune de células B e T (RAOUFI et al., 2020). A imunoinformática inclui diferentes abordagens, incluindo a predição de epítomos e a vacinologia reversa, que se refere ao emprego de algoritmos computacionais para a predição de potenciais epítomos que podem ser reconhecidos por receptores de células B e T, e que podem ser bons candidatos para elaboração de vacinas ou agentes utilizados em testes diagnósticos de diversas patologias (TOMAR; DE, 2010; SHEN et al., 2013; JIANG et al., 2015, 2017; YIN et al., 2016; SHEY et al., 2019).

Diferentes recursos de imunoinformática estão disponíveis na *Word Wide Web*, fornecendo dados relevantes para a imunologia. A Tabela 2 menciona alguns dos bancos de dados imunológicos disponíveis.

**Tabela 2 – Base de dados de imunoinformática disponíveis na *Word Wide Web***

<b>Base de Dados</b>	<b>Descrição</b>	<b>Endereço eletrônico</b>
<b>IPD-IMGT / HLA</b>	Banco de dados com 25.958 sequências de alelos HLA	<a href="http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla">www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla</a>
<b>ANTIGENDB</b>	Informações abrangentes sobre uma ampla gama de antígenos validados experimentalmente	<a href="http://crdd.osdd.net/raghava/antigenadb">crdd.osdd.net/raghava/antigenadb</a>
<b>Allele Frequency Net Database</b>	Repositório para o armazenamento de frequências de genes imunológicos em diferentes populações mundiais com dados de 10.723.669 indivíduos.	<a href="http://www.allelefrequencies.net">www.allelefrequencies.net</a>
<b>Pattern Recognition Receptor Database (PRRDB)</b>	Banco de dados abrangente de receptores de reconhecimento de padrões e seus ligantes e conta com 500 padrões que reconhecem receptores de 77 organismos distintos.	<a href="http://crdd.osdd.net/raghava/prddb">crdd.osdd.net/raghava/prddb</a>
<b>Immune Epitope Database (IEDB)</b>	Repositório de ferramentas baseadas na web para a previsão e análise de epítomos imunológicos, que possui um catálogo de epítomos de células B e T caracterizados experimentalmente e dados sobre a ligação do MHC. Contém dados de 180.978 experimentos selecionados manualmente da literatura, cobrindo 99% de todas as informações disponíveis publicamente e	<a href="http://www.iedb.org">www.iedb.org</a>

	com 129.186 experimentos submetidos diretamente	
<b>INNATEDB</b>	Banco de dados de genes, proteínas, interações verificadas experimentalmente e vias de sinalização envolvidas na resposta imune inata de humanos, camundongos e bovinos à infecção microbiana	<a href="http://www.innatedb.com">www.innatedb.com</a>
<b>BCIpep</b>	Coleção com 3031 entradas de peptídeos que atuam na imunidade humoral.	<a href="http://crdd.osdd.net/raghava/bcipep">crdd.osdd.net/raghava/bcipep</a>
<b>AlgPred</b>	Ferramenta de previsão de proteínas alergênicas com base na semelhança de epítomos conhecidos e de mapeamento da posição de epítomos IgE na proteína	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/algpred">www.imtech.res.in/raghava/algpred</a>
<b>SYFPEITH</b>	Base de dados que compreende mais de 7000 sequências de peptídeos conhecidas por se ligarem a Moléculas MHC de classe I e classe II compilados de relatórios publicados	<a href="http://www.syfpeithi.de">www.syfpeithi.de</a>

### 1.11.1 Predição de epítomos lineares de célula B através de imunoinformática

Diversos parâmetros físico-químicos se correlacionam com a localização de epítomos lineares, permitindo que a posição de epítomos seja predita a partir de características da sequência primária da proteína. Os cálculos de predição são baseados em escalas de propensão para cada um dos 20 aminoácidos, e descrevem a tendência de cada resíduo ser associado a propriedades como hidrofiliicidade/hidrofobicidade, acessibilidade ao solvente e flexibilidade (PELLEQUER; WESTHOF; VAN REGENMORTEL, 1991).

As predições de epítomos lineares de célula B basearam-se, inicialmente, nas interações eletrostáticas e na busca de maiores pontos de hidrofiliicidade advinda dos resíduos que compunham a sequência do antígeno, sugerindo que os aminoácidos carregados são provavelmente antigênicos, por se localizarem principalmente na superfície de proteínas (HOPP; WOODS, 1981, 1983). Parker e colaboradores determinaram experimentalmente uma escala de hidrofiliicidade, derivada de dados de retenção de peptídeos sintéticos (correspondendo a cada um dos 20 aminoácidos), através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PARKER; GUO; HODGES, 1986). A predição da estrutura secundária das proteínas também pode ser utilizada para a predição de epítomos, como a escala de Chou e Fasman (CHOU; FASMAN, 1978), que prediz voltas  $\beta$ , e se baseia na evidência de que epítomos geralmente estão

presentes em regiões de voltas  $\beta$  (PELLEQUER; WESTHOF; VAN REGENMORTEL, 1993).

Adicionalmente, a estrutura tridimensional das proteínas pode fornecer informações sobre regiões antigênicas. Por exemplo, sabendo que a acessibilidade ao solvente é um fator fundamental para a imunogenicidade de um epítopo, escalas de acessibilidade podem auxiliar na predição de epítopos, como a escala de acessibilidade de Emini, que calcula a acessibilidade do resíduo à superfície baseando-se em dados da estrutura tridimensional de 28 proteínas, e considera um resíduo acessível se sua estrutura estiver acessível à superfície acima de  $20 \text{ \AA}^2$  ( ou  $2 \text{ nm}^2$ ) (EMINI et al., 1985). Outra escala de propensão, a escala de flexibilidade de Karplus e Schulz, prevê a flexibilidade do segmento utilizando a estrutura de 31 proteínas para prever segmentos flexíveis de uma determinada sequência de aminoácidos, onde a mobilidade, de segmentos proteicos, baseada nos fatores de temperatura conhecida dos carbonos  $\alpha$ , é indicativa para um determinante antigênico (KARPLUS; SCHULZ, 1985).

Em 1990, Kolaskar & Tongaonkar (KeT) publicaram um algoritmo que utiliza dados experimentais de epítopos já descritos e as propriedades físico-químicas dos aminoácidos, sendo capaz de prever epítopos com 75% de precisão (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). O algoritmo de KeT calcula a média da hidrofiliidade, acessibilidade e flexibilidade para cada heptapeptídeo sobreposto na sequência da proteína e compara com a frequência dos resíduos em 156 epítopos experimentalmente determinados em 34 proteínas diferentes (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990).

O BepiPred 1.0 utiliza as escalas de Parker (PARKER; GUO; HODGES, 1986) e Levitt (LEVITT; LEVITT, 1978) combinado com o modelo de Markov oculto para prever epítopos (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006). Em contrapartida, o BepiPred 2.0 é baseado em um algoritmo "*Random Forest*" treinado em epítopos anotados de estruturas cristalinas proteicas de antígeno-anticorpo (JESPERSEN et al., 2017).

#### 1.11.2 Predição de epítopos conformacionais de células B

Os métodos de predição de epítopos conformacionais de células B se baseiam na estrutura tridimensional (3D) da proteína, e consideram a localização na superfície

como favorável ou não para a ligação de anticorpos, sendo possível ser aplicado na pesquisa de epítomos em qualquer antígeno proteico com estrutura tridimensional conhecida (KOLASKAR; KULKARNI-KALE, 1999).

Existe uma variedade de ferramentas de imunoinformática para a predição de epítomos conformacionais baseados na estrutura 3D da proteína, tais como Conformational Epitope Prediction server (CEP) (KULKARNI-KALE; BHOSLE; KOLASKAR, 2005) e MapiTope (BUBLIL et al., 2007). Outros métodos recentes têm utilizado modelos de aprendizagem de máquinas, como o EPSVR e EPMeta, que utilizam o método de Support Vector Regression (SVR) para integrar seis fatores: propensão de epítomo residual, pontuação de conservação, pontuação de energia da cadeia lateral, número de contato, pontuação de planaridade de superfície e composição da estrutura secundária (LIANG et al., 2010). O DiscoTope 1.2 (HASTE ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006) atua combinando características químicas dos aminoácidos, exposição de superfície e propriedades estruturais tridimensionais de uma estrutura de proteína (proximidade espacial baseada no número de contatos com o carbono  $\alpha$ ). Uma versão melhorada, o DiscoTope 2.0, redefine a vizinhança espacial de aminoácidos para somar os escores de propensão e a medida de exposição à superfície, inclui dados de toda a “unidade biológica”, em vez de usar apenas as cadeias de antígeno-anticorpo (Ag-Ac) e redefine a configuração de *benchmark* para acomodar múltiplos epítomos, melhorando assim o desempenho preditivo (KRINGELUM et al., 2012).

### 1.11.3 Predição de epítomos de linfócitos T

O principal objetivo da predição de epítomos de célula T é selecionar peptídeos curtos dentro de um antígeno que sejam capazes de estimular a resposta de linfócitos T (citotóxico ou auxiliar), ou seja, que sejam imunogênicos. A seleção de epítomos de células T são úteis principalmente para a orientação do desenho racional de vacinas e para a compreensão das respostas de células T (AHMED; MAEURER, 2009). A imunogenicidade é uma propriedade complexa que depende do processamento dos peptídeos na célula, da afinidade para ligação à molécula do MHC e do reconhecimento do TCR cognato, sendo a ligação à molécula do MHC a etapa mais



seletiva e a etapa mais preditiva para seleção de peptídeos através de imunoinformática (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017). Contudo, a combinação de predição das diferentes etapas do processamento de peptídeos, como a clivagem pelo proteassoma, a afinidade pela TAP e ligação ao MHC podem melhorar o desempenho preditivo (DÖNNES; KOHLBACHER, 2005)

Existem vários métodos para a previsão da ligação dos peptídeos às moléculas do MHC que podem ser classificados entre métodos baseados em dados ou métodos baseados em estrutura. Os métodos baseados em dados utilizam sequências de peptídeos que se ligam à moléculas do MHC disponíveis em bancos de dados especializados como o IEDB (VITA et al., 2019) e o AntiJen (TOSELAND et al., 2005). Existem diferentes algoritmos que utilizam tais dados, e podem ser orientados por matriz BLOSUM (HUANG; DAI, 2006), por modelagem de Markov oculto (HMM, do inglês *Hidden Markov model*) (ZHANG et al., 2006), por modelos de redes neurais artificiais (ANN, do inglês *artificial neural network*) (NIELSEN; ANDREATTA, 2016), ou aprendizado de máquina de vetores de suporte (SVM, do inglês *support-vector machine*) (BHASIN, 2004).

Os métodos baseados em estrutura dependem da modelagem da estrutura pMHC e de métodos de dinâmica molecular (DESAI; KULKARNI-KALE, 2014). Os modelos atuais são baseados na afinidade de ligação do peptídeo ao MHC para a predição. A grande vantagem dos métodos baseados em estrutura é o fato de não necessitar de dados experimentais. Porém, estes exibem desempenho preditivo inferior do que os métodos orientados a dados (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2012).

Um dos maiores desafios na predição de peptídeos epítomos de célula T é o polimorfismo de MHC, que possui centenas de variantes alélicas. Além disso, para o desenvolvimento de vacinas, o polimorfismo do MHC tem frequência variável e é determinante para a cobertura nos diferentes grupos étnicos (TERASAKI, 2007).

### **1.12 Epítomos-alvo de anticorpos anti-CHIKV**

A maioria dos epítomos alvo de anticorpos, durante a infecção do CHIKV, está presente nas proteínas do envelope (KAM et al., 2012; PAL et al., 2013; SELVARAJAH et al., 2013a; FOX et al., 2015; CHUA et al., 2016, 2017). A maior parte acessível das espículas virais maduras corresponde às subunidades de proteína E2 (VOSS et al.,

2010; YAP et al., 2017). Isso explica o seu papel de ligação ao receptor celular, como foi demonstrado com o receptor MXRA8, que se insere na fenda entre E1 e E2 e interage com os domínios A e B da E2 e o loop de fusão da E1, permitindo a entrada do vírus (BASORE et al., 2019). Os domínios A e B da E2 concentram os principais determinantes antigênicos para o reconhecimento do CHIKV pela maioria dos mAbs humanos neutralizantes, sendo potenciais candidatos no desenvolvimento de terapias profiláticas e no desenho racional de vacinas baseadas em epítomos (LEE et al., 2011; SELVARAJAH et al., 2013b; FONG et al., 2014a; SMITH et al., 2015). Os domínios A e B da E2 também estão envolvidos na transmissão direta célula-célula, indicando um possível mecanismo envolvido na persistência viral em tecidos, que escapa de anticorpos neutralizantes presentes no meio extracelular (LEE et al., 2011; PORTA et al., 2015).

As interações de mAbs com epítomos conformacionais podem perturbar a estrutura tridimensional das proteínas, comprometendo a função da proteína, ou abranger mais de uma subunidade proteica, causando a reticulação de diferentes domínios e impedindo alterações conformacionais que expõem resíduos essenciais para o ciclo de replicação viral, como no caso do IM-CKV063, que abrange 2 subunidades de E2 e impedem a exposição do loop de fusão na E1 (FONG et al., 2014a). Ao examinarem um painel de mAbs humanos e murinos neutralizantes, foi visto que diferentes mAbs reconhecem epítomos presentes no domínio B da E2, o que provoca o reposicionamento do domínio A da E2 e permite a reticulação das espículas adjacentes (FOX et al., 2015). Um estudo utilizando microscopia eletrônica criogênica demonstrou que a porção Fab de dois anticorpos (4J21 e 5M16) se ligam nos domínios A e B e no conector de fita beta no domínio B da E2, impedindo o movimento do domínio B para fora do loop de fusão subjacente a E2, e conseqüentemente, bloqueando a fusão do envelope do vírus (LONG; HEISE, 2015).

O potencial de neutralização de um mAb é determinado pela exposição do epítomo-alvo, sendo ele pertencente à E1 ou E2 (FONG et al., 2014a). Diferentes mAbs neutralizantes possuem como alvo a face externa exposta da parte superior do trímero, enquanto que mAbs não-neutralizantes são direcionados para regiões oclusas entre E1 e E2, voltadas para o interior do trímero (FONG et al., 2014b). Um potente mAb humano, denominado IM-CKV063, se liga a um epítomo conformacional no domínio A da E2 (resíduos G55, W64, K66, R80, E24 e I121) presente na região exposta do trímero (FONG et al., 2014a). Outros mAbs caracterizados em diferentes

estudos, como CHK152, CHK263, CHK102, 5F10, C9, KJ21 e 5M16, também possuem como epítipo-alvo, diferentes resíduos presentes em regiões acessíveis ao solvente dentro dos domínios A e B da E2 (WARTER et al., 2011; PAL et al., 2013; SELVARAJAH et al., 2013b; FONG et al., 2014b; LONG et al., 2015). Em contrapartida, outros mAbs, incluindo CHK166 e CK47, são direcionados para epítipos presentes no domínio II e III da E1, respectivamente, inibindo a fusão ou liberação de partículas virais no final da replicação (PAL et al., 2013; LONG; HEISE, 2015).

### **1.13 Utilização de epítipos para desenho de vacinas**

O uso de múltiplos epítipos específicos para o desenvolvimento de vacinas tem se tornado uma estratégia promissora por várias vantagens: não exige o cultivo do patógeno *in vitro*, são seguras, demanda um baixo custo para a produção em larga escala, permite o direcionamento específico da resposta imune e pode ser liofilizado, o que permite o transporte e armazenamento em temperatura ambiente. Além disso, a resposta induzida por epítipos pode ser mais eficaz do que a resposta induzida por toda a proteína, devido a presença de peptídeos não imunogênicos na sequência proteica (KAO; HODGES, 2009). Diferentes estudos têm sido direcionados para projetar e produzir vacinas de peptídeos imunogênicos que possam induzir respostas mais diretas e eficazes do sistema imune. As vacinas baseadas em múltiplos epítipos (VME) devem ser projetadas para incluir epítipos capazes de estimular linfócitos B, células T citotóxicas e células T *helper* e induzir resposta imune inata contra o vírus (ZHANG, 2018). Um dos principais desafios no desenvolvimento de VME é a seleção apropriada de antígenos candidatos e seus epítipos imunodominantes (ZHANG, 2018). Camundongos vacinados com epítipos de células T citotóxicas mostraram diminuição do inchaço das articulações induzida por CHIKV após o desafio (BROECKEL et al., 2019). Contudo, um dos grandes desafios é que vírus de RNA, como o CHIKV, que sofrem mutações rapidamente, exigem vacinas que proporcionem ampla cobertura populacional, e que proteja contra diferentes variantes (TOUSSAINT et al., 2011).

#### 1.14. Justificativa

Os estudos de epidemiologia molecular, que determinem a variabilidade genética do CHIKV em diferentes surtos, são fundamentais para gerar dados que devem ser considerados durante a investigação da resposta imune e da cobertura populacional para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico baseados em imunoenaios. Assim, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a ocorrência de mutações na região do envelope viral do CHIKV circulante em Alagoas.

Os vírus de RNA sofrem rápida evolução, o que leva ao surgimento de diferentes mutações que podem ter grande impacto no seu potencial epidêmico e na antigenicidade viral, tornando o vírus melhor adaptado contra a ação de anticorpos neutralizantes, como foi descrito anteriormente com o CHIKV (TUEKPRAXHON et al., 2018) e mais recentemente com o vírus SARS-CoV-2 (LI et al., 2020).

Dentro desse contexto, sabendo que as proteínas do envelope são o principal alvo de anticorpos neutralizantes, e que medeiam a ligação ao receptor, a entrada na célula hospedeira e a fusão entre o vírus e a membrana celular, é imperativo que haja uma atenção maior sobre os possíveis efeitos de mutações ocorridas em domínios importantes dessas proteínas.

Diante disso, a hipótese desse estudo é que o CHIKV circulante em Alagoas possui mutações em regiões de epítomos das proteínas do envelope do CHIKV e que essas mutações podem impactar no seu reconhecimento pelas células da imunidade adaptativa, destacando-se os linfócitos B e os linfócitos T CD8+ (citotóxicos).

Para verificar essa hipótese, o presente estudo foi norteado pelas seguintes questões:

- 1) Existem mutações nos genes codificantes das proteínas do envelope do CHIKV circulante no Estado de Alagoas, durante o surto de 2016?
- 2) As mutações detectadas podem ter impacto na resposta imune humoral, relativa ao reconhecimento por linfócitos B?
- 3) As mutações detectadas podem ter impacto na resposta imune celular, relativa ao processamento de peptídeos, apresentação pelo MHC-I e reconhecimento de linfócitos T CD8+ citotóxicos?

Tais questões foram respondidas através de análises moleculares e *in silico* e pela utilização de ferramentas de imunoinformática que, embora tenham sido

convencionalmente utilizadas para projetar vacinas (BAPPY et al., 2020) e terapias baseadas em peptídeos (HASAN et al., 2015), podem ser utilizadas também para prever a imunogenicidade de patógenos emergentes (XU et al., 2020; AMBROSE et al., 2021).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular de regiões do genoma do vírus Chikungunya circulantes em Alagoas codificantes para as proteínas do envelope viral e a prospecção de mutações localizadas em potenciais epítomos reconhecidos por linfócitos B e T CD8+ citotóxicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter o RNA viral a partir de amostras de soro de pacientes infectados com CHIKV na fase virêmica da infecção;
- Obter a sequência nucleotídica das regiões codificantes para proteínas do envelope viral (E3, E2 e E1);
- Definir o(s) genótipo(s) do CHIKV circulante no Estado de Alagoas por análise filogenética viral;
- Investigar a existência de mutações não-sinônimas presentes nos genes codificantes para as proteínas E1, 6k, E2 e E3;
- Investigar mutações não-sinônimas que tenham impacto biológico previamente relatado na literatura;
- Localizar mutações na E1, E2, 6K e E3 dentro de regiões de epítomos lineares e conformacionais de linfócitos B e T CD8+ experimentalmente demonstrados e depositados em bases de dados públicas;
- Avaliar o impacto das mutações detectadas na predição de epítomos lineares e conformacionais de células B, através de diferentes ferramentas de imunoinformática;
- Investigar o impacto das mutações no processamento de antígenos pelo proteassoma, através de imunoinformática e na ligação ao transportador TAP, através de imunoinformática;

- Predizer a influência das mutações para a ligação de peptídeos a moléculas de MHC de classe I;
- Analisar o efeito das mutações na probabilidade de peptídeos serem reconhecidos por linfócitos T CD8+, através de ferramentas de imunoinformática.

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este projeto está integrado ao PPSUS/2016 (processo número 60030000841/2016) que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alagoas (C.A.A.E. 59229716.9.0000.5013).

#### **3.2 Local do estudo**

O presente estudo foi realizado no Estado de Alagoas, localizado na região Nordeste do Brasil, que tem em seus limites, o Estado de Pernambuco ao norte e nordeste, o Estado de Sergipe ao sul, o Estado da Bahia ao sudoeste e o Oceano Atlântico ao leste. Possui uma área territorial de 27.843,295 km<sup>2</sup> e 102 municípios (IBGE, 2010). A população é composta por 3.120.494 habitantes, no entanto, cerca de um terço reside na capital Maceió, município mais populoso do Estado (IBGE, 2010).

A capital Maceió tem extensão territorial de 509,320 km<sup>2</sup> e 932.748 habitantes, que são atendidos por 148 estabelecimentos do Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>1</sup>. Possui 99% de área urbanizada e alta densidade demográfica (1.854,10 hab/km<sup>2</sup>), no entanto, apenas 47,1% da população possui esgotamento sanitário adequado<sup>1</sup>. A região litorânea do Estado de Alagoas, onde Maceió está situada, possui médias pluviométricas anuais de aproximadamente 1.600 mm (EMBRAPA et al., 2012). Maceió possui um clima quente e úmido, o bioma é de Mata Atlântica e está inserida dentro do sistema costeiro-marinho do Brasil (EMBRAPA et al., 2012).

---

<sup>1</sup> <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/maceio/panorama>



### 3.3 Amostras coletadas na população de estudo

As amostras de soro utilizadas neste estudo foram provenientes de pacientes atendidos pelo SUS/AL, durante o ano de 2016, com diagnóstico molecular positivo (RT-qPCR) para a presença da nsP4 do CHIKV, confirmado pelo Laboratório de Central de Alagoas (LACEN/AL), instituição coexecutora do projeto relacionado a este estudo. Alíquotas destas amostras foram enviadas para o Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia (LAPEVI/ICBS/UFAL), onde foram armazenadas em ultra freezer, na temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do processamento e das análises posteriores de biologia molecular.

### 3.4 Análise do genoma do chikv

#### 3.4.1 Desenho de iniciadores específicos para o CHIKV

Para o desenho de iniciadores (ou no inglês “*primers*”), foi realizado um rastreamento de sequências nucleotídicas do CHIKV depositadas no banco de dados GenBank do NCBI<sup>2</sup>, para a obtenção da sequência codificadora de cada uma das proteínas de interesse. Em seguida, foram alinhadas diferentes sequências provenientes de diferentes surtos e locais através do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)<sup>3</sup> para comparação, a fim de detectar regiões de maior variabilidade no genoma viral. Diversas mutações previamente caracterizadas e descritas na literatura foram consideradas para definição da região genômica de interesse a ser amplificada para estudo. Assim, foram selecionadas as regiões genômicas codificadoras das proteínas estruturais E1, 6K, E2 e E3, específicas para o genoma viral do CHIKV. A partir da delimitação destas regiões, foram desenhados pares de iniciadores no software Primer3<sup>4</sup>.

Para o desenho dos iniciadores, foram levados em consideração alguns parâmetros, como comprimento de 18-24 bases, 40-60% de conteúdo de Guanina/Citosina e temperatura de fusão ( $T_m$ , do inglês “*Temperature melting*”) de

---

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

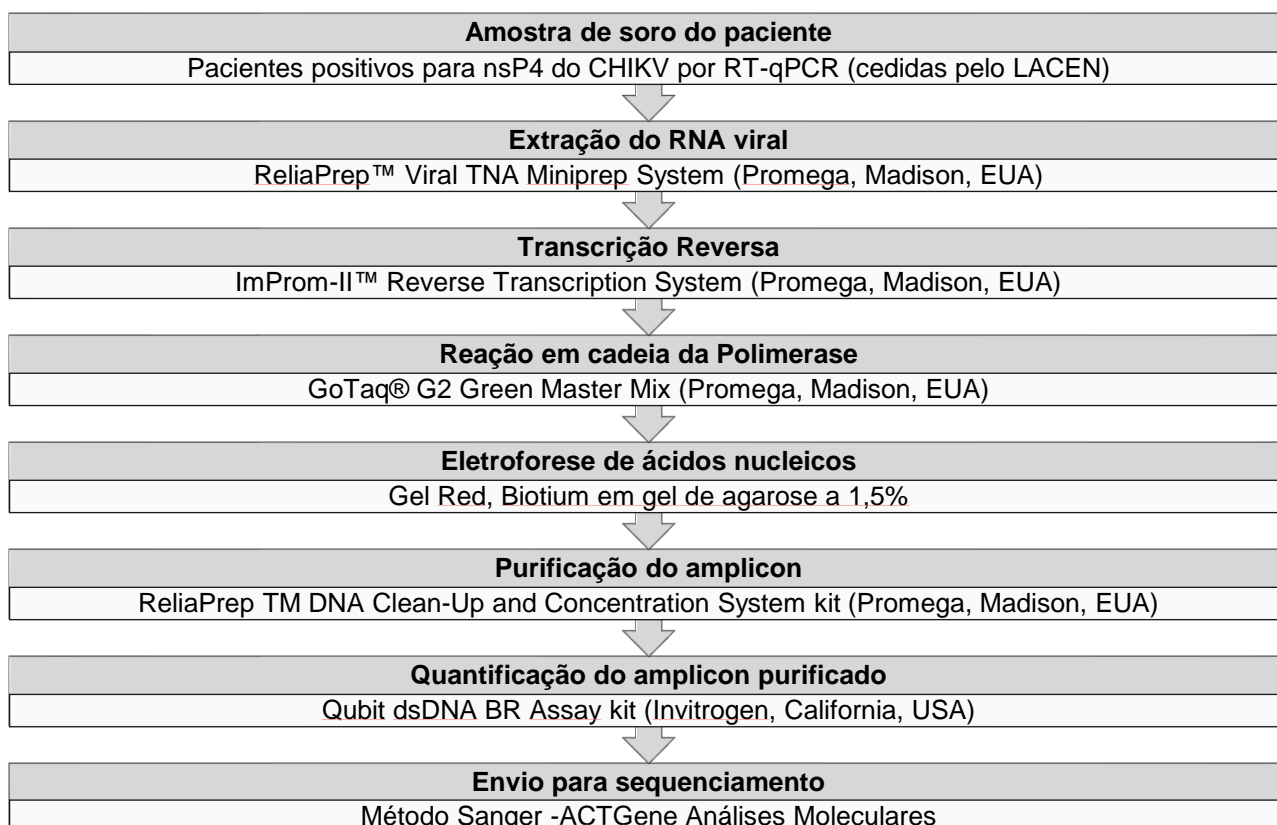
<sup>3</sup> <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>4</sup> <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

50-60 °C. Além disso, os pares de iniciadores não deveriam ter regiões complementares maiores que 3 nucleotídeos consecutivos. O produto (amplicon) previsto ao final da reação de RT-PCR correspondeu a um tamanho de aproximadamente 900 pares de base cada. Em seguida, a sequência nucleotídica foi enviada para a empresa Exxtend Solução em Oligos® (Paulínia, São Paulo, Brasil) para que os iniciadores fossem sintetizados e purificados por purificação por coluna de fase reversa.

Após o recebimento dos oligonucleotídeos, o presente estudo seguiu um processo de seis etapas que consistem na extração do RNA viral, síntese da fita de DNA complementar (cDNA) ou transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase, eletroforese em gel de agarose, purificação do amplicon, quantificação do amplicon e envio para o sequenciamento (Figura 20).

**Figura 20 - Fluxo de experimentos de biologia molecular realizados.**



Fluxo de experimentos realizados utilizando biologia molecular para o envio do sequenciamento através de um serviço terceirizado.

Fonte: Autora, 2021

### 3.4.2 Extração de RNA viral a partir do soro de amostras de pacientes

A extração do RNA viral foi realizada utilizando 200  $\mu\text{L}$  de amostra de soro de pacientes, através do kit comercial ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Este Kit realiza a purificação do RNA viral através de sistema de utiliza colunas de rotação para o processamento rápido, baseado em centrifugação. Ao final, o RNA viral foi eluído em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  e armazenado em ultra freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até os experimentos seguintes.

### 3.4.3 Transcrição reversa (RT)

A transcrição reversa para a síntese da fita única de cDNA foi realizada através do kit comercial ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Primeiramente, foram adicionados em cada tubo os reagentes descritos na Tabela 3, para desnaturação dos primers e da fita-molde através do calor.

**Tabela 3 - Reagentes utilizados na 1ª etapa da transcrição reversa**

Reagente	Volume (1 reação)
RNA extraído das amostras de pacientes (fita-molde de RNA)	2 $\mu\text{L}$
Oligonucleotídeo ( <i>primer</i> ) antisense para a região de interesse	1 $\mu\text{L}$ (20 pmol)
Água livre de nucleases	2 $\mu\text{L}$

Fonte: Autora, 2021

Os tubos foram incubados no termociclador durante 5 minutos a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e resfriados em gelo por 5 minutos. Em seguida, os reagentes e volumes descritos na Tabela 4 foram adicionados em cada tubo.

**Tabela 4 - Reagentes utilizados na 2ª etapa da transcrição reversa**

Reagente	Volume (1 reação)
Inibidor de ribonucleases (RNAsin Recombinant RNasin®)	0,5 $\mu\text{L}$
Mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs)	1 $\mu\text{L}$ (0,5 mM de cada)

Enzima Transcriptase reversa (ImProm-II™ Reverse Transcriptase)	1 µL
Cloreto de Magnésio (MgCl <sub>2</sub> )	1,2 µL (1,5 mM)
Tampão (ImProm-II™ 5X Reaction Buffer)	4 µL
Água livre de nucleases	7,3 µL

Fonte: Autora, 2021

Foi produzida uma reação com volume final de 20 µL. Os tubos foram incubados durante 5 minutos a 25 °C para o anelamento, 42 °C por 1 hora para a extensão e 70 °C durante 15 minutos para a inativação da enzima no termociclador. Os tubos foram armazenados a -20 °C, até os experimentos posteriores.

#### 3.4.4 Reação em cadeia da polimerase

O cDNA sintetizado foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. A reação enzimática da Taq DNA polimerase foi realizada utilizando a solução comercial GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega, Madison, EUA), que exibe atividade de exonuclease no sentido 5' → 3' e contém a enzima Taq DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e tampões de reação em concentrações ideais para a amplificação do cDNA. Para cada reação com um produto com volume de 50 µL, foram adicionados os reagentes e volumes descritos na Tabela 5.

**Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase**

Reagente	Volume (1 reação)
GoTaq® G2 Green Master Mix, 2x (Promega, Madison, EUA)	25 µL
Solução contendo iniciadores específicos eluidos (senso/antiseno) para a região de interesse	1 µL (0,8 µM de cada)
Água livre de nucleases	16 µL
Solução de cDNA	8 µL

Fonte: Autora, 2021

Em seguida, os tubos foram incubados segundo as condições de termociclagem descritas na Tabela 6.

**Tabela 6 - Condição de termociclagem para PCR**

<b>Condição</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	95 °C	5 minutos	1 ciclo
<b>Desnaturação</b>	94 °C	30 segundos	
<b>Anelamento</b>	60 °C	45 segundos	35 ciclos
<b>Extensão</b>	72 °C	1 minuto	
<b>Extensão final</b>	72 °C	5 minutos	1 ciclo

Fonte: Autora, 2021

#### 3.4.5 Eletroforese de ácidos nucleicos

Para a confirmação da amplificação do produto de interesse através da classificação das moléculas com base no tamanho, foram misturados 5 µL de cada produto da PCR com 1 µL de solução intercalante de DNA (GelRed®, Biotium) e dispensados em um poço de uma matriz sólida e porosa (gel de agarose), previamente preparada na concentração de 1,5% de agarose livre de nucleases. Em um poço paralelo aos dos amplicons testados, foi adicionado um marcador de tamanho de peso molecular, que contém uma mistura de moléculas de peso conhecido, para determinação do tamanho do amplicon através de comparação.

Em seguida, foi adicionado tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) para o fornecimento de íons e manutenção do pH e o sistema foi submetido à eletroforese, utilizando uma cuba horizontal a 90V por 40 minutos. Ao final, o gel de agarose foi visualizado em um transiluminador ultravioleta (UV).

#### 3.4.6 Purificação do produto da PCR

Para a remoção dos produtos inespecíficos da PCR e impurezas gerais, o produto da PCR foi purificado. Para esse procedimento, todo o produto amplificado

durante a PCR foi submetido à eletroforese conforme descrito no tópico 3.5.5, e após análise no transluminador, as bandas contendo os amplicons de interesse foram cortadas diretamente do gel de agarose com o auxílio de lâminas de bisturi, e transferidos para um tubo de microcentrifugação, para realização dos procedimentos seguintes, conforme orientações do fabricante, utilizando-se o kit comercial ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System kit (Promega, Madison, EUA). Para avaliar a purificação, o produto da PCR purificado foi misturado e submetido à eletroforese em gel de agarose segundo descritos na seção 3.4.5.

#### 3.4.7 Quantificação do produto da PCR purificado

O produto da PCR purificado foi quantificado por espectroscopia de fluorescência no fluorômetro Qubit 4 (Invitrogen, California, USA), que detecta a fluorescência gerada por um fluoróforo que se liga especificamente à dupla fita de DNA e converte os dados de fluorescência em concentração de DNA na amostra. O ensaio foi realizado com o kit comercial Qubit dsDNA BR Assay kit (Invitrogen, California, USA), seguindo as orientações do fabricante.

#### 3.4.8 Sequenciamento das amostras

Após a quantificação, foram feitas alíquotas das amostras de forma que garantisse a quantidade de 60 ng do produto da PCR seguido da secagem em estufa a 60 °C para serem enviadas para sequenciamento, que foi feito através da metodologia de Sanger, na empresa especializada ACTGene Análises Moleculares<sup>5</sup>, localizada no município de Alvorada/RS. Após o recebimento das sequências obtidas, foram realizadas as análises *in silico*.

---

<sup>5</sup> <https://actgene.com.br/>

### 3.5 Análises *In Silico* de mutações no chikv

Após o recebimento das sequências nucleotídicas das amostras, os resultados do sequenciamento foram analisados através do software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5<sup>6</sup> (HALL, 1999). As sequências nos sentidos senso e antisenso de cada amostra foram sobrepostas para formar *Contigs*, que foram aparados na região 5' e 3' para a retirada dos trechos de baixa qualidade do sequenciamento. As sequências resultantes foram utilizadas para todas as análises *in silico* e foram depositadas no Genbank (MN864707-MN864742).

#### 3.5.1.1 Análise filogenética

Com o objetivo de estabelecer relações filogenéticas entre as amostras sequenciadas no presente estudo com outras sequências de amostras provenientes de surtos no Brasil e no mundo, foi realizada uma análise filogenética através do alinhamento da sequência parcial do gene codificante da glicoproteína E1. Foram selecionadas 79 sequências disponíveis na base de dados GenBank do NCBI<sup>7</sup> para compor a análise filogenética. Foram incluídas sequências representativas dos genótipos existentes do CHIKV, provenientes de diferentes surtos, de diversas localidades e em anos distintos. Cada sequência selecionada foi nomeada de forma padrão (número de acesso do GenBank \_ localidade \_ ano de isolamento). As cepas incluídas estão disponíveis no Apêndice 1.

O alinhamento foi realizado através do algoritmo MUSCLE disponível no Instituto Europeu de Bioinformática<sup>8</sup> (EMBL-EBI do inglês "*European Bioinformatics Institute*"). Em seguida, foi selecionado o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as sequências através do MEGA7, e em seguida foi realizada a reconstrução filogenética através do método estatístico UPGMA. O modelo escolhido foi o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura-2) para estimar distâncias

---

<sup>6</sup> <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

<sup>7</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<sup>8</sup> <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

evolutivas (KIMURA, 1980). Para avaliar o nível de confiança dos clados foi utilizado o método de *Bootstrap* com 1000 repetições (EFRON; HALLORAN; HOLMES, 1996). Como grupo externo, foi utilizada a sequência do vírus O'nyong nyong (ONNV) (GenBank AF079456).

### 3.5.1.2 Análise da variabilidade genética dos CHIKV

As sequências *contigs* obtidas após a remontagem dos fragmentos de DNA sequenciados foram alinhadas com uma cepa de referência, representando uma sequência ancestral às analisadas no presente estudo. A cepa de referência utilizada foi isolada na Tanzânia, em 1953, com histórico de baixo número de passagens para minimizar a ocorrência de mutações ocorridas em laboratório (cepa Ross low-psg, GenBank: HM045811). O alinhamento foi realizado através do algoritmo MUSCLE<sup>9</sup> implementado no software MEGA7.

A detecção de mutações nucleotídicas foi realizada através da ferramenta InSites<sup>10</sup> após o alinhamento das sequências deste estudo com a sequência da cepa de referência, através do MUSCLE<sup>9</sup>.

### 3.5.1.3 Mapeamento tridimensional de mutações

As sequências de aminoácidos das proteínas E1, 6k, E2 e E3 da cepa de Alagoas/2016 e Tanzânia/1953 (GenBank: HM01855) foram usadas como alvos para modelagem de homologia usando o servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018). O servidor SWISS-MODEL<sup>11</sup> executou inicialmente o alinhamento da sequência do modelo alvo após pesquisar modelos obtidos através de cristalografia de raios-X, disponíveis no Protein Data Bank (PDB)<sup>12</sup>, para gerar os modelos 3D para todas as sequências alvo. Os melhores modelos estruturais obtidos por homologia

---

<sup>9</sup> <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>

<sup>10</sup> <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/DIVEIN/insites.html>

<sup>11</sup> <https://swissmodel.expasy.org/interactive#structure>

<sup>12</sup> <https://www.rcsb.org/>



foram selecionados baseados na melhor cobertura das proteínas e aminoácidos analisados no estudo e de acordo com a maior resolução da estrutura no PDB, o maior valor QMEAN DiscoGlobal, os valores de escore Z para as propriedades estruturais mais elevados, melhor adequação aos modelos de estruturas de proteínas determinadas experimentalmente e nos valores de QMEAN mais elevados para os resíduos de interesse. Os modelos foram obtidos a partir dos seguintes *templates*: 3n41.1.C (3.01 Å) para a E1, 3n41.1.B (3.01 Å) para a E2 e 3n40.1.A (2.17 Å) para a E3. As avaliações dos modelos obtidos estão disponíveis no Apêndice 2. Nenhum modelo de qualidade suficiente para construir um modelo de homologia foi encontrado para a sequência da 6K.

Para verificar os resíduos mutados expostos ao solvente, as mutações não sinônimas foram mapeadas na estrutura tridimensional modelada, por meio do PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0 (SCHRÖDINGER, 2015).

#### 3.5.1.4 Análises de imunoinformática

##### 3.5.1.4.1 Detecção de mutações presentes em epítomos experimentalmente testados

Para verificar se as mutações detectadas neste estudo estão presentes em regiões de epítomos já validados experimentalmente, foram rastreados todos os epítomos presentes nas proteínas estruturais do CHIKV disponíveis na base de dados *Immune Epitope Database* (IEDB)<sup>13</sup>. Os critérios de busca foram: estar presentes nos organismos *Chikungunya virus* (ID: 37124) e *Chikungunya virus strain S27 prototype* (ID:371094), sem especificar hospedeiro, tipo de ensaio ou molécula do MHC na base de dados do IEDB.

##### 3.5.1.4.2 Predição de epítomos lineares de células B

---

<sup>13</sup> <https://www.iedb.org/>

Com o objetivo de verificar se as mutações detectadas afetam o potencial de antigenicidade de resíduos preditos como parte de epítomos lineares, foram realizadas predições de epítomos utilizando a sequência da cepa de referência (Ross low-psg, GenBank: HM045811). As predições foram realizadas utilizando diferentes escalas<sup>14</sup> de propensão que calculam a antigenicidade (escala de Kolaskar & Tongaonkar), a propensão de estar presente em voltas  $\beta$  (escala de Chou & Fasman), a acessibilidade à superfície (escala de Emini), a flexibilidade (escala Karplus & Schulz) e a hidrofiliçidade (escala de Parker). A predição de epítomos também foi realizada através do algoritmo preditor de epítomos sequenciais em células B (BepiPred 2.0), que prediz epítomos lineares de células B que determina as propriedades antigênicas baseados nas propriedades de estruturas cristalizadas, com os parâmetros padrão.

Em seguida, os resíduos mutados foram substituídos manualmente na sequência da cepa de referência e foram realizadas novas predições de epítomos para comparação do escore relativo ao potencial para estarem localizados em epítomos lineares de células B.

#### 3.5.1.4.3 Predição de epítomos conformacionais de células B

Com o objetivo de verificar se as mutações detectadas afetam o potencial de antigenicidade de resíduos preditos como parte de epítomos conformacionais, foi realizada a predição na ferramenta DiscoTope 2.0 (HASTE ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006), disponível no IEDB<sup>15</sup> (PETERS et al., 2005), utilizando como entrada as proteínas E3, E2 e E1 modeladas (Ver tópico 3.5.1.3). Resíduos com a pontuação superior a -3,7 foram considerados parte de epítomos conformacionais, com base no número de contatos e na pontuação de propensão (KRINGELUM et al., 2012).

#### 3.5.1.4.4 Predição do processamento de peptídeos pelo proteassoma

---

<sup>14</sup> <http://tools.iedb.org/bcell/>

<sup>15</sup> <http://tools.iedb.org/discotope/>

A predição da clivagem pelo proteassoma foi realizado através do servidor NetChop 3.1<sup>16</sup> (NIELSEN et al., 2005). O NetChop foi treinado em dados humanos, utilizando um novo esquema de codificação de sequência através de redes neurais (KEŞMIR et al., 2002).

A predição de clivagem pelo imunoproteassoma foi predita pelo método “C term 3.0”, que foi treinado no local de clivagem C-terminal de 1260 ligantes de MHC-I disponíveis publicamente (NIELSEN et al., 2005).

A predição de clivagem pelo proteassoma constitutivo foi predita pelo método 20S 3.0, que foi treinado em dados de degradação *in vitro* (NIELSEN et al., 2005). O limiar adotado para ambos os métodos foi de 0.5.

As predições para a sequência das proteínas da cepa de referência (Ross low-psg, GenBank: HM045811) foram comparadas às predições realizadas com a sequência das proteínas de Alagoas, 2016, contendo as mutações detectadas.

#### 3.5.1.4.5 Predição da afinidade pela proteína TAP

A predição da afinidade pela proteína TAP foi realizada através do servidor disponível na web TAPPRED<sup>17</sup> (BHASIN, 2004), através da abordagem de Máquina de Vetor de Suporte (SVM, do inglês “*support vector machine*”) em cascata, que se baseia na sequência e nas características dos aminoácidos.

As predições para a sequência das proteínas da cepa de referência (Ross low-psg, GenBank: HM045811) foram comparadas às predições realizadas com a sequência das proteínas de Alagoas, 2016, contendo as mutações detectadas.

#### 3.5.1.4.6 Predição de peptídeos ligantes ao MHC-I

A predição da ligação de peptídeos antigênicos ao MHC-I foi realizada através do servidor NetMHCpan 4.1<sup>18</sup> (REYNISSON et al., 2020), que prevê a ligação de peptídeos a qualquer molécula MHC de sequência conhecida utilizando redes neurais

---

<sup>16</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>

<sup>17</sup> <https://webs.iitd.edu.in/raghava/tappred/index.html>.

<sup>18</sup> <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1/>

artificiais (ANNs, do inglês “*artificial neural networks*”), treinadas em uma combinação de mais de 850.000 peptídeos detectados de ligantes eluidos em espectrometria de massa.

Foram analisadas a afinidade dos peptídeos em relação a um conjunto de referência com cobertura populacional máxima, que abrange os 27 alelos mais frequentes na população mundial, que corresponde a uma cobertura acima de 97% (WEISKOPF et al., 2013). Os alelos testados foram: HLA-A01:01, HLA-A02:01, HLA-A02:03, HLA-A02:06, HLA-A03:01, HLA-A11:01, HLA-A23:01, HLA-A24:02, HLA-A26:01, HLA-A30:01, HLA-A30:02, HLA-A31:01, HLA-A32:01, HLA-A33:01, HLA-A68:01, HLA-A68:02, HLA-B07:02, HLA-B08:01, HLA-B15:01, HLA-B35:01, HLA-B40:01, HLA-B44:02, HLA-B44:03, HLA-B51:01, HLA-B53:01, HLA-B57:01 e HLA-B58:01.

As predições incluíram os peptídeos detectados pelos treinamentos em ligantes eluidos, e foram considerados aglutinantes fortes, moderados ou fracos com base na pontuação %Rank, conforme recomendado por REYNISSON e colaboradores (2020):

<b>Classificação</b>	<b>Valor de %Rank</b>
<b>Forte</b>	$< 0.5$
<b>Moderado</b>	$0.5 < X < 2$
<b>Fraco</b>	$> 2$

As predições para a sequência das proteínas da cepa de referência (Ross low-psg, GenBank: HM045811) foram comparadas às predições realizadas com a sequência das proteínas de Alagoas, 2016, contendo as mutações detectadas.

#### 3.5.1.4.7 Predição da imunogenicidade de peptídeos ligantes ao MHC-I

A potencial imunogenicidade dos peptídeos com potencial ligação ao MHC-I localizados em regiões que abrangiam as mutações detectadas nesse estudo foi investigada através da ferramenta Class I Immunogenicity<sup>19</sup> (CALIS et al., 2013), que usa as propriedades dos aminoácidos, bem como sua posição dentro do peptídeo, para prever a imunogenicidade de um complexo de pMHC. Foram utilizados todos os peptídeos preditos com potencial moderado ou forte de se ligar às moléculas de MHC-I (ver tópico anterior). As posições P1, P2 e C-terminal foram mascaradas por serem

<sup>19</sup> <http://tools.iedb.org/immunogenicity/>

posições âncora da maioria das moléculas HLA de classe I (UEBEL et al., 1997). A parte intermediária (P4-P6) é a parte mais importante para a interação com o TCR (CALIS et al., 2013). A pontuação de imunogenicidade é derivada da soma das pontuações de enriquecimento logarítmico de aminoácidos que são encontrados em posições não mascaradas, ponderadas pela importância dessa posição (CALIS et al., 2013). Peptídeos com pontuação acima de zero são considerados imunogênicos. Peptídeos com pontuação abaixo de zero, são considerados não-imunogênicos.

## 4 RESULTADOS

Foram obtidas 13 amostras de soro de pacientes com diagnóstico molecular positivo (RT-qPCR) para CHIKV, coletadas durante o surto do ano de 2016. Na Tabela 7 é possível observar as características das amostras, segundo o município de residência e o sexo do paciente.

**Tabela 7 - Resumo das características das amostras de pacientes positivos com CHIKV durante o surto de 2016 em Alagoas, Brasil.**

	Amostra	Cidade/Estado	Sexo
1	IR58	Maceió-AL	Feminino
2	IR65	Barra de Santo Antônio-AL	Feminino
3	IR66	Maceió-AL	Masculino
4	IR67	Maceió-AL	Masculino
5	IR88	Maceió-AL	Feminino
6	IR93	Maceió-AL	Feminino
7	IR95	Marechal Deodoro – AL	Masculino
8	IR118	Maceió-AL	Feminino
9	IR121	Maceió-AL	Feminino
10	IR122	Maceió-AL	Feminino
11	IR134	Maceió-AL	Feminino
12	IR140	Maceió-AL	Feminino
13	IR141	Maceió-AL	Feminino

Fonte: Autora, 2021

Todas as amostras do estudo foram coletadas entre janeiro e agosto de 2016, com residência em Maceió-AL (n=11; 84,6%) ou na região metropolitana (n=2; 15,3%). A maioria dos pacientes pertenceram ao sexo feminino (n = 9; 69,2%).

### 4.1 Análise das sequências de CHIKV e mutações

#### 4.1.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para abranger regiões codificantes das proteínas E1, E2 e E3, que compõem o envelope viral e da proteína 6k (Figura 21). Estas regiões foram selecionadas para este estudo devido à

variabilidade observada nas sequências nucleotídicas após o alinhamento em comparação com diferentes genomas de CHIKV descritos na literatura, e permitiu a caracterização genotípica do vírus circulante em Alagoas, e o rastreamento de mutações presentes nestas regiões. Na Tabela 8 é possível observar a região da proteína amplificada, a sequência nucleotídica dos iniciadores e o tamanho do amplicon gerado (em pares de base).

**Tabela 8 - Iniciadores usados para transcrição de cDNA, amplificação e sequenciamento da PCR.**

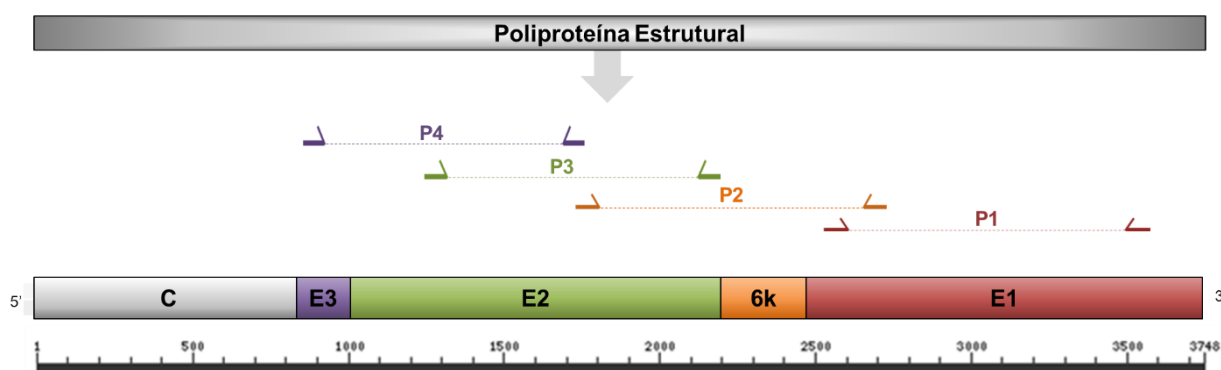
Iniciador	Região-alvo	Sequência 5'-3'	Amplicon (pb)
<i>P1_Foward</i>	E1: 132-424	CAGCAGAGTGCAAGGACAAA	882
<i>P1_Reverse</i>		CCGTCGAGAAAGAGATTTGC	
<i>P2_Foward</i>	E1: 251-403	AACATGCAGGGTGCCTAAAG	855
<i>P2_Reverse</i>	E2: 1-137	GTACCGCAGCATTTCACGTA	
<i>P3_Foward</i>	E2: 93-393	ACTCTGACGGTGGGATTTCAC	891
<i>P3_Reverse</i>		AGCTCCTGGTGTTCAGTTCGT	
<i>P4_Foward</i>	E2: 1-236	AGTCTTGCCATCCCAGTCAT	943
<i>P4_Reverse</i>	E3: 6-64	GGTCCCAAGTTCAGCATTA	

A região da proteína coberta pelo par de iniciadores é indicada com o número da posição dos aminoácidos. O tamanho do amplicon obtido para cada reação está em pares de bases (pb)

Fonte: Autora, 2021

As regiões da anelamento foram ilustradas na Figura 21

**Figura 21 – Regiões de anelamento dos iniciadores**



Esquema ilustrativo das regiões das proteínas do envelope demonstrando as regiões de cobertura dos iniciadores utilizados para transcrição de cDNA, amplificação e sequenciamento de PCR. A barra superior grafite representa a poliproteína estrutural. A meia-seta direcionada para a direita representa o iniciador no sentido senso, enquanto a meia-seta direcionada para a esquerda representa o iniciador anti-senso. As linhas pontilhadas representam o produto esperado. A barra preta ilustra as posições dos aminoácidos. As caixas coloridas representam as proteínas do envelope viral: E3 (roxo), E2 (verde), 6K (laranja) e E1 (vermelho)

Fonte: Autora, 2021

#### 4.1.2 Análise filogenética

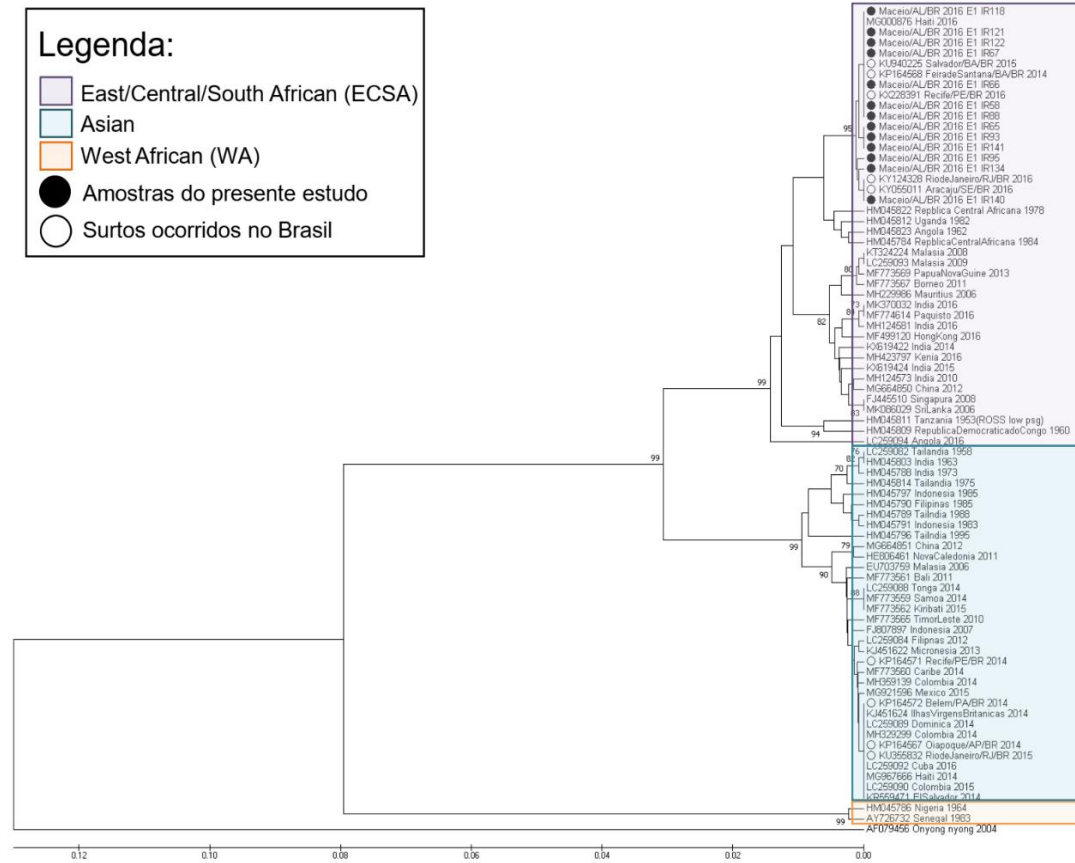
Após o sequenciamento de DNA das amostras obtidas, foi realizada a análise filogenética que permite determinar o genótipo viral e compreender as relações evolutivas entre as cepas presentes nas amostras deste estudo com outras cepas provenientes de outros surtos de diferentes partes do mundo. Na árvore filogenética realizada (Figura 22), foi possível identificar os três diferentes genótipos do CHIKV: Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático (*Asian*) e Oeste Africano (WA). Todas as cepas do presente estudo se agruparam dentro de um clado do genótipo ECSA, junto a outras cepas isoladas em surtos ocorridos no Brasil e de um isolado do Haiti, porém todas do continente americano.

Dentro do clado da linhagem ECSA americana, os subclados sugerem uma origem evolutiva em comum entre o isolado da amostra IR 140 e os isolados do Rio de Janeiro-RJ (2016) e Aracaju-SE (2016). As amostras IR 95, 134 e 140 se agruparam em um clado distinto das demais cepas do subclado ECSA Americano.

As sequências foram depositadas no banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos do NCBI (GenBank) e podem ser acessadas através dos códigos MN864707 a MN864742.



Figura 22 – Árvore filogenética com as sequências adquiridas no presente estudo



A história evolutiva foi inferida pelo método UPGMA. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de auto inicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos, quando superiores a 70%. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura. A análise envolveu 79 sequências nucleotídicas, que estão nomeadas com o número de acesso, local e ano de coleta. Todas as posições que contêm lacunas e dados ausentes foram eliminadas. O grupo externo utilizado na análise foi o vírus O'nyong nyong.

Fonte: Autora, 2021

#### 4.1.3 Variabilidade genética das proteínas do envelope viral

O alinhamento das sequências das amostras do presente estudo com uma cepa ancestral do CHIKV, permitiu que fossem reveladas um total de 82 substituições de nucleotídeo em toda a região amplificada, distribuídas nas sequências codificantes das proteínas E3, E2, 6K e E1. Das 82 substituições nucleotídicas, 16 mutações foram não-sinônimas, resultando em 14 mutações de aminoácidos, como pode ser observado na Tabela 9.

**Tabela 9 - Mutações presentes nas amostras sequenciadas provenientes do surto de Alagoas/BR em 2016.**

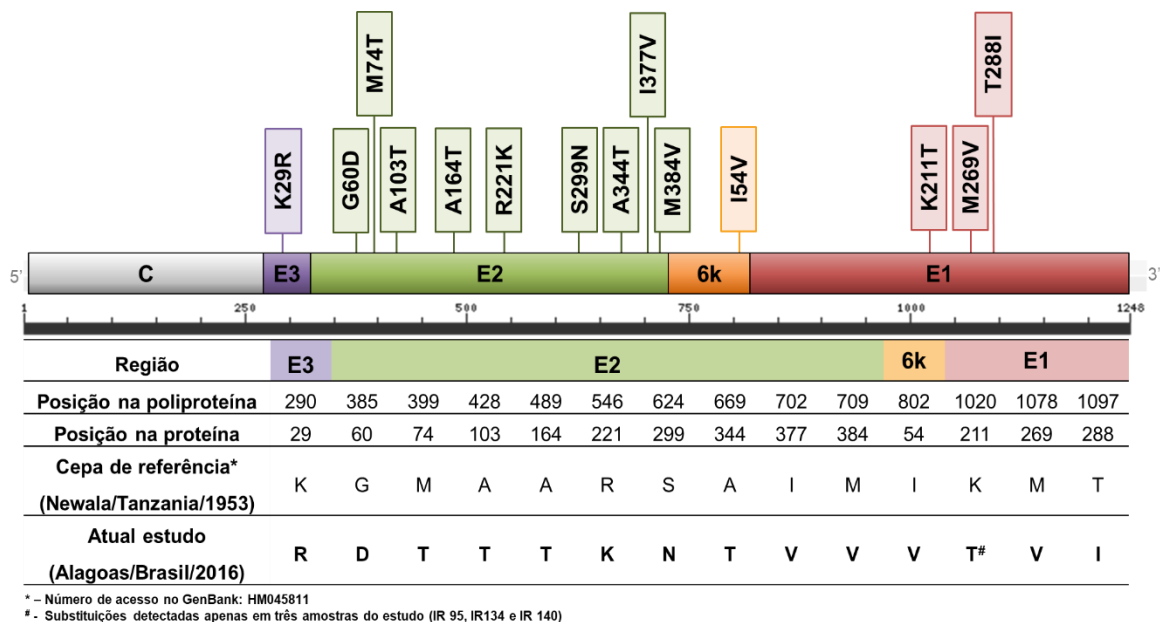
Mutações nucleotídicas no gene da poliproteína estrutural*			Proteína	Newala (Tanzânia) 1953	Posição na proteína	Alagoas (Brasil) 2016	Amostras com mutações detectadas /amostras analisadas**
Códon	NT	AA					
AAG → AGG	869	290	E3	K	29	R	1/1
GGT → GAT	1154	385		G	60	D	
ATG → ACG	1196	399		M	74	T	6/6
GCC → ACC	1282	428		A	103	T	
GCC → ACC	1465	489		A	164	T	7/7
AGG → AAA	1637 1638	546	E2	R	221	K	5/5
AGT → AAC	1871 1872	624		S	299	N	
GCA → ACA	2005	669		A	344	T	13/13
AAT → GTA	2104	702		I	377	V	
ATG → GTG	2125	709		M	384	V	12/12
ATC → GTC	2487	802	6K	I	54	V	
AAA → ACA	3059	1020	E1	K	211	T	3/13
ATG → GTG	3232	1078		M	269	V	13/13
ACT → ATT	3290	1097		T	288	I	

Na primeira coluna, o nucleotídeo (NT) mutado está destacado em vermelho, dentro do códon. Nas colunas seguintes estão descritas as posições na poliproteína estrutural, a proteína, o aminoácido (AA) selvagem, a posição na proteína, o aminoácido mutante e a amostra que possui a mutação. \* - Número de acesso ao GenBank: HM045811 (Tanzânia, 1953). \*\* - Número de amostras analisadas considerando dados de sequenciamento de alta qualidade no trecho da mutação.

Fonte: Autora, 2021

Das 14 mutações detectadas, três mutações de aminoácido foram identificadas na região da glicoproteína E1: de Lisina (K) para Treonina (T) na posição 211, de Metionina (M) para Valina (V) na posição 269, e de Treonina para Isoleucina na posição 288. Na região da víporina 6K, foi detectada uma mutação do aminoácido Isoleucina para Valina na posição 54. Na região da glicoproteína E2, foram detectadas 9 mutações de aminoácidos: De uma glicina (G) para um ácido aspártico (D) na posição 60, de metionina (M) para treonina (T) na posição 74, de alanina (A) para treonina (T) nas posições 103 e 164, de Arginina (R) para lisina (K) na posição 221, de serina (S) para asparagina (N) na posição 299, de A para T na posição 344, de Isoleucina (I) para valina (V) na posição 377 e de M para V na posição 384. Na região da proteína E3, foi detectada somente uma mutação de Lisina (K) para uma arginina (R) na posição 29. A Figura 23 ilustra a posição da mutação na sequência da poliproteína estrutural e refere as posições na proteína e na poliproteína.

**Figura 23 – Mutações não-sinônimas identificadas nas sequências de glicoproteínas estruturais do CHIKV.**



As mutações de aminoácidos estão posicionadas na poliproteína e em cada proteína estrutural em comparação com o aminoácido da cepa de referência. As mutações detectadas na proteína E3 está em roxo, na E2 estão em verde, na 6K está em laranja e na E1, está em vermelho. A tabela indica na sequência de linhas: a região (proteína), a posição na poliproteína estrutural, a posição na proteína, o aminoácido presente na cepa de referência e o aminoácido mutado, encontrado na cepa deste estudo.

#### 4.1.4 Localização das mutações na estrutura da proteína

A visualização tridimensional da localização dos resíduos mutados demonstrou que as cepas de CHIKV analisadas possuem mutações em domínios estruturais importantes para a função da proteína. Cinco mutações estão localizadas na superfície da proteína em regiões expostas indicado pelas esferas verdes na Figura 24.

**Figura 24 - Mapeamento das mutações detectadas na estrutura 3D das glicoproteínas do envelope.**

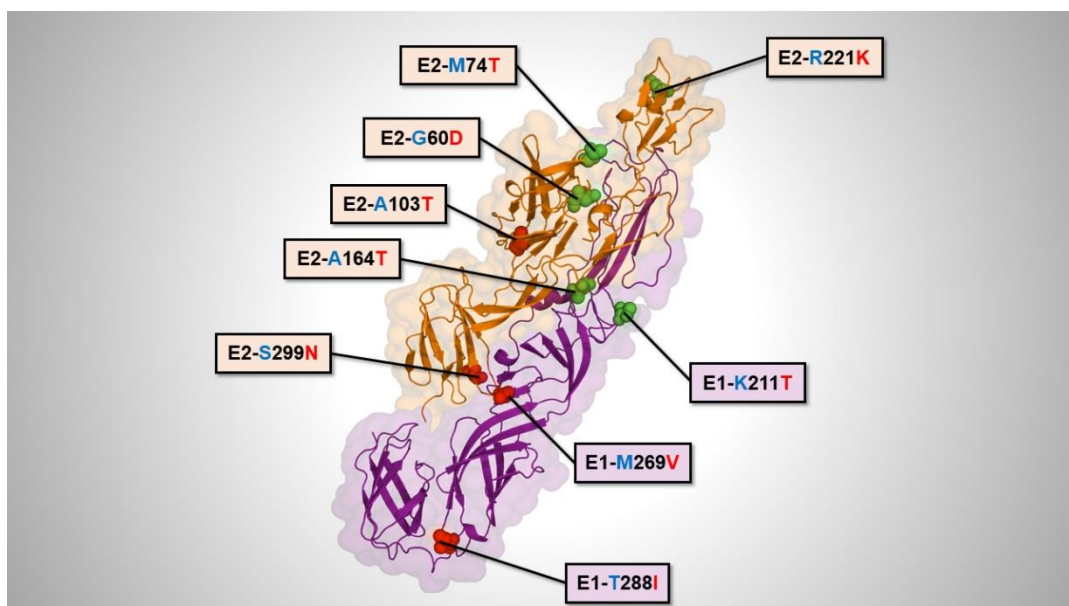


Figura ilustrativa destacando os resíduos mutados encontrados na sequência genômica do CHIKV utilizando a estrutura do PBB: 3n41.1.C (E1), 3n41.1.B (E2), 3n40.1.A (E3). Os resíduos mutados que se localizam nas regiões acessíveis da superfície do dímero E1-E2 estão destacadas em esferas verdes. As caixas em lilás correspondem aos resíduos mutados na glicoproteína E1 (em roxo) e as caixas em vermelho claro correspondem aos resíduos mutados na glicoproteína E2 (em laranja).

Fonte: Autora, 2021

Na proteína E2, foram detectadas quatro mutações no domínio A (G60D, M74T, A103T e A164T), uma mutação no domínio B (R221K) e quatro mutações no domínio C (S299N, A344T, I377V e M384V). Os resíduos mutados presentes nos domínios A e B estão no ectodomínio de E2, enquanto as mutações E2-S299N e A344T estão em

uma região que forma uma haste antes de entrar na bicamada lipídica. As mutações E2-I377V e E2-M384V estão localizadas em uma região de hélice alfa formada por 30 aminoácidos, interagindo com a membrana lipídica, enquanto E2-I377V está dentro do folheto lipídico externo da bicamada (MUKHOPADHYAY et al., 2006b).

## 4.2 Potencial impacto das mutações no reconhecimento imunológico

### 4.2.1 Rastreamento de mutações em epítomos experimentalmente testados

A pesquisa de epítomos experimentais do CHIKV depositadas no IEDB apontou 153 epítomos selecionados em ensaios positivos e presentes na poliproteína estrutural. Nove alterações de aminoácidos detectadas em nosso estudo estão em locais correspondentes a 8 epítomos lineares e 8 epítomos descontínuos (Tabela 10).

**Tabela 10 - Epítomos experimentalmente testados e depositados no banco de dados IEDB, cuja sequências abrangem posições das mutações detectadas neste estudo.**

Mutação	ID/tipo	Resíduos do epítopo	Hospedeiro/Célula /Ensaio	Referência
<b>E2-G60D</b>	462266 Descontínuo	N7; V8; K10; A11; D59; <b>D60</b> ; H62; E166; V169; M171; G194; T212; H232; K234; W235; R251; K252; G253; K254; I255	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Estrutura 3D, neutralização e ligação qualitativa	(LONG et al., 2015)
	462515 Descontínuo	F6; N7; V8; Y9; K10; T12; T58; D59; <b>D60</b> ; S61; H62; N193; G194; Q195; H232; K234	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Estrutura 3D	(PORTA et al., 2016a)
	462267 Descontínuo	N7; V8; K10; A11; R13; K57; T58; D59; <b>D60</b> ; S61; D63; K66; H73; M74; P75; A76; D77; V169; M171; N193; G194; Q195; V229; N231; H232; K233; K234; W235; G253	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Estrutura 3D, neutralização e ligação qualitativa	(LONG et al., 2015)
	434425 Descontínuo	<b>D385*</b> ; R393; G423; H495; M496; K558; K559	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Neutralização e ligação qualitativa	(SMITH et al., 2015)
	434439 Descontínuo	T383; D384; <b>D385*</b> ; R393; D396; I399; D402; T516; N518; K559	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Neutralização e ligação qualitativa	(SMITH et al., 2015)
<b>E2-M74T</b>	462267 Descontínuo	N7; V8; K10; A11; R13; K57; T58; D59; D60; S61; D63; K66; H73; <b>M74</b> ; P75; A76;	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B	(LONG et al., 2015)

Mutação	ID/tipo	Resíduos do epítopo	Hospedeiro/Célula /Ensaio	Referência
		D77; V169; M171; N193; G194; Q195; V229; N231; H232; K233; K234; W235; G253	- Estrutura 3D, neutralização e ligação qualitativa	
	434421 Descontínuo	A11; D59; <b>M74</b> ; N193; G194; T212; H232; W235	- <i>Mus musculus</i> - Célula B - Imunomarcção, Neutralização e ligação qualitativa	(SMITH et al., 2015)
	236399 Descontínuo	H398; <b>I399*</b> ; H424; M496; Q520; T521; Y524; C526; G534; T537; N556; K558	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Neutralização, ligação qualitativa, constante de dissociação, taxa on e off	(FONG et al., 2014a)
<b>E2-A103T</b>	558231 Linear	CTITGTMGHFIL <b>A</b> RC + <i>AMID(C15)</i>	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(CHUA et al., 2016)
<b>E2-A164T</b>	226466 Linear	AT <b>I</b> EEIEVHMPPDTPDRT	- <i>Macaca fascicularis</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(KAM et al., 2014)
<b>E2-R221K</b>	558343 Linear	VINNC <b>K</b> VVDQCHAAVT + <i>AMID(T15)</i>	- <i>Homo sapiens</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(CHUA et al., 2016)
<b>E2-S299N</b>	237912 Linear	R <b>N</b> MGEPPNYQEEWVMHKK	- <i>Mus musculus</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(HER et al., 2015)
<b>E2-A344T</b>	993482 Linear	PTEGLEVTWGNNEPYKYWP QLS <b>T</b> NGT	- <i>Mus musculus</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(BASU et al., 2020)
<b>E2-I377V</b>	993379 Linear	LLSMVG <b>M</b> AAGMCMCARRRC ITPYELTPGATVPFL	- <i>Mus musculus</i> - Célula B - Ligação qualitativa	(BASU et al., 2020)
<b>6K-I54V</b>	737808 Linear	TLAFLAVMS <b>V</b>	- <i>Homo sapiens</i> - Célula T CD8+ - Ensaio de ligante de MHC, liberação de Interferon-gama	(LORENTE et al., 2017)
	737939 Linear	VMS <b>V</b> GAHTV	- <i>Homo sapiens</i> - Célula T CD8+ - Ensaio de ligante de MHC, liberação de Interferon-gama	(LORENTE et al., 2017)

A primeira coluna apresenta a mutação detectada nesse estudo e as seguintes mostram o ID do epítopo, o tipo de epítopo, a sequência de aminoácidos, os parâmetros do ensaio e a referência na literatura. Na coluna dos resíduos do epítopo, os aminoácidos destacados em verde são iguais aos resíduos da cepa de Alagoas (2016). Os aminoácidos em vermelho são diferentes da cepa de Alagoas (2016). \* - Posição na poliproteína estrutural.

Fonte: Autora, 2021

Todos os epítomos rastreados que abrangem a posição 74 da E2 possuem aminoácidos diferentes da cepa desse estudo, sendo eles Metionina (M) e Isoleucina (I). Semelhantemente, foi detectado que a posição 103 da E2 pertence a um epítomo validado experimentalmente com o resíduo selvagem de Alanina (A). Em contrapartida, os epítomos validados experimentalmente que compreendem as posições E2-164, E2-221, E2-299, E2-344 e 6K-54 possuíam os resíduos de aminoácidos encontrados neste estudo.

#### 4.2.2 Predição de epítomos lineares para célula B

A predição *in silico* dos epítomos lineares revelou diferenças na predição de epítomos entre a cepa de referência e as variantes do presente estudo (Tabela 11).

A predição de epítomos de célula B revelou que algumas mutações alteraram o potencial antigênico do resíduo após a troca de aminoácidos. A grande maioria das posições foram preditas para fazerem parte de epítomos em pelo menos uma escala ou algoritmo, exceto a posição E2-384. A escala de antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar (KT) sugeriu o total de 30 epítomos para a sequência das proteínas do envelope da cepa de referência, contudo, para o envelope da cepa isolada nesse estudo, foram preditos 28 epítomos. Em contrapartida, segundo o algoritmo BepiPred 2.0, foram preditos 35 epítomos para as sequências de ambas as cepas, sendo 13 na sequência da E2 e 17 na sequência da E1 da cepa de referência, mas na cepa deste estudo foram preditos 14 epítomos na E2 e 16 epítomos na proteína E1. Em conjunto, estes resultados indicam que a presença de mutações na sequência de proteínas pode alterar propriedades físico-químicas que se correlacionam com regiões de determinantes antigênicos.

**Tabela 11 - Previsão de epítomos lineares com aminoácidos da cepa de referência Tanzânia (1953) e com as substituições de aminoácidos detectadas neste estudo em Alagoas (2016).**

Proteína	Posição	Chou e Fasman		Emini		Karplus e Schulz		Parker		Kolaskar e Tongaonkar		BepiPred 2.0	
		Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)	Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)	Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)	Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)	Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)	Tanzânia (1953)	Alagoas (2016)
E3	29	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
	60	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
	74	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
	103	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-
	164	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
E2	221	✓	✓	-	-	-	✓	✓	✓	-	-	-	-
	299	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓
	344	✓	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
	377	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	-
	384	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6K	54	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-
	211	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	✓	✓
E1	269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-
	288	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓

As colunas da tabela estão dispostas, da esquerda para a direita, apresentando a proteína investigada, a posição onde ocorreu a mutação e o resultado (✓ = positivo; - = negativo) de cada teste, de acordo com a predição utilizando a sequência da cepa de referência (azul), e em seguida com a cepa do presente estudo (vermelho).

Fonte: Autora, 2021



Na proteína E3, a posição E3-29 foi predita como epítopo segundo as escalas Emini, Karplus e Schulz, Parker e BepiPred 2.0, independente do resíduo selvagem ou mutado. Contudo, a mutação E3-K29R fez um epítopo desaparecer, de acordo com a escala de Chou e Fasman e não foi predita em epítopo segundo a escala de KT.

Na proteína E2, a posição E2-60 foi predita nas escalas Chou e Fasman, Emini, Karplus e Schulz, Parker e pelo algoritmo BepiPred 2.0. A mutação de Glicina para Ácido Aspártico não alterou as predições de epítopos, apesar da troca de um aminoácido de cadeia apolar por um aminoácido polar ácido. A posição E2-74, independentemente da mutação, foi predita pela escala Chou e Fasman, Emini, Parker e pelo BepiPred 2.0, que sugeriu uma região de epítopo contendo 20 aminoácidos de comprimento (<sup>57</sup>KTDG/DSHDWTKLRYMDNHM/TPAD<sup>77</sup>), que abrangeu as posições E2-60 e E2-74, independentemente da mutação. Contudo, a escala Karpluz e Shulz só previu epítopo na posição E2-74 após a mutação de Metionina para Treonina.

Ainda dentro da sequência da proteína E2, o resíduo selvagem E2-103A foi predito como antigênico pela escala de KT (<sup>100</sup>FILARC<sup>105</sup>), no entanto, a mutação anulou a antigenicidade desse resíduo segundo esse método. Vale ressaltar que, segundo as demais escalas de propensão aplicadas, essa posição não foi determinada como parte de um epítopo.

De forma contrária, a posição E2-164, contendo Alanina ou Treonina, foi predita como pelas escalas de Karplus e Schulz, Parker e pertencente a epítopo linear de célula B, segundo o BepiPred 2.0. No entanto, os epítopos preditos que continham essa posição foram diferentes entre as sequências analisadas. O resíduo E2-221 foi predito pelas escalas Chou e Fasman e Parker, e após a mutação E2-R221K foi predito pela escala Karplus e Schulz. O resíduo E2-299 foi predito por todas as escalas utilizadas, exceto a escala KT. Contudo, essa posição só foi predita como epítopo pelo algoritmo BepiPred 2.0 (<sup>299</sup>NMGEEPNYQEEWVTHK<sup>314</sup>), após a mutação E2-S299N.

A posição E2-344 foi predita pelas escalas Chou e Fasman, Karplus e Schulz e Parker, bem como em região de epítopo (<sup>330</sup>WGNNEPYKYWPQLSA/TNGTAHG<sup>350</sup>), independentemente da substituição de Alanina por Treonina. De forma contrária, a posição E2-377 foi predita como antigênica apenas através da escala de KT, com epítopos diferentes para cada sequência analisada, predizendo o epítopo <sup>365</sup>TMTVVVSVASFILLSM<sup>381</sup> na sequência da cepa de referência e um epítopo contendo mais aminoácidos, <sup>364</sup>TMTVVVSVASFVLLSMVGVAVGMCMCARR<sup>394</sup>,

para a cepa isolada no presente estudo. A posição E2-384 não foi positiva em nenhum dos métodos de predição aplicados.

Na proteína 6K, o resíduo 54, contendo o aminoácido selvagem ou mutante, foi predito somente pelas escalas Chou e Fasman e Parker.

Em relação à proteína E1, a posição E1-211 foi predita por todas as escalas, exceto a escala de antigenicidade KT, e como pertencente ao epítipo <sup>183</sup>DVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESK/TDVYAN<sup>216</sup>, que contém 34 aminoácidos de comprimento. A posição E1-269 foi predita em região de epítipo apenas segundo o algoritmo BepiPred 2.0, e somente quando apresentava o resíduo de Metionina (<sup>266</sup>VRAMNC<sup>271</sup>). Finalmente, a posição E1-288 foi predita como epítipo pelo algoritmo BepiPred 2.0 (<sup>285</sup>AAFT/IRVVDAPSL<sup>296</sup>) e pela escala de antigenicidade de KT (<sup>288</sup>TRVVDAP<sup>294</sup> e <sup>287</sup>FIRVVDAP<sup>294</sup>), independentemente da ocorrência da mutação detectada no presente estudo. As demais escalas (Chou e Fasman, Emini, Karplus e Schulz e Parker) não predisseram epítopos nas posições E1-269 e E1-288.

#### 4.2.3 Predição de mutações em epítopos conformacionais de célula B

Um total de 9 epítopos conformacionais na glicoproteína E1, 155 epítopos na proteína E2 e 4 resíduos na proteína E3 da cepa ancestral foram previstos, enquanto 7 epítopos foram previstos em E1, 156 epítopos na E2 e 4 resíduos na E3 da cepa de Alagoas, demonstrando que as mutações afetaram o número de epítopos conformacionais preditos. A mutação E2-G60D induziu que a posição E2-63 fizesse parte de um epítipo conformacional na cepa de AL. Na E1, a mutação E1-K211T aboliu os epítopos nas posições E1-206 e E1-212.

Dos epítopos detectados, 3 epítopos foram observados em resíduos mutados da glicoproteína E2 da cepa de referência e de Alagoas. Quando comparada a predição de epítopos conformacionais entre a cepa de referência com a cepa de Alagoas, não foi possível identificar alterações nas predições referentes às posições com resíduos mutados (Tabela 12, pág. 96).

Tabela 12 - Comparação entre os epítomos conformacionais previstos (em negrito) nos sítios de mutação, para a cepa referência (azul) e a cepa de Alagoas (vermelho) (2016). A tabela mostra a proteína mutada, posição, resíduo e pontuação no DiscoTope, onde resíduos com uma pontuação acima de -3,7 são considerados epítomos.

	Tanzania, 1953			Alagoas, 2016	
	Protein position	Residue	DiscoTope Score	Residue	DiscoTope Score
<b>E3</b>	29	K	-11.023	R	-10.995
<b>E2</b>	<b>60</b>	<b>G</b>	<b>2.386</b>	<b>D</b>	<b>2.683</b>
	<b>74</b>	<b>M</b>	<b>-0.111</b>	<b>T</b>	<b>-0.661</b>
	103	A	-21.458	T	-20.010
	164	A	-6.303	T	-4.796
	221	R	-5.178	K	-5.230
	<b>299</b>	<b>S</b>	<b>-0.607</b>	<b>N</b>	<b>0.613</b>
	344	-	-	-	-
	377	-	-	-	-
	384	-	-	-	-
	<b>E1</b>	<b>211</b>	<b>K</b>	<b>-2.979</b>	<b>T</b>
269		M	-19.605	V	-21.335
288		T	-11.709	I	-12.302

Fonte: Autora, 2021

#### 4.2.4 Predição da clivagem pelo proteassoma

As predições de clivagem pelo proteassoma alteraram a quantidade de clivagens ao longo da sequência proteica (Tabela 13).

**Tabela 13 - Número de clivagens previstas nas sequências das proteínas E3, E2, 6K e E1**

Proteína	Proteassoma constitutivo (20S)		Imunoproteassoma	
	Tanzânia, 1953	Alagoas, 2016	Tanzânia, 1953	Alagoas, 2016
<b>E3</b>	33	35	16	17
<b>E2</b>	208	200	140	145
<b>6K</b>	38	38	19	20
<b>E1</b>	206	207	133	134

Fonte: Autora, 2021

As predições de clivagem pelo proteassoma constitutivo demonstraram que a mutação E3-K29R formou um local de clivagem após a Arginina (R), e a mutação E2-G60D formou um local de clivagem após o Ácido Aspártico (D). O mesmo ocorreu com as mutações E1-K211T e E1-T288I, fazendo surgir locais de clivagem após a Treonina

211 e a Isoleucina 288. Em contrapartida, as mutações E2-A164T, E2-R221K e E2-A344T aboliram o local de clivagem após essas posições (Tabela 14).

**Tabela 14 - Predição de clivagem pelo proteassoma constitutivo**

Proteína	Posição	Proteassoma Constitutivo					
		Cepa ancestral			Cepa AL		
		AA Ross	Clivagem	Score	AA AL	Clivagem	Score
<b>E3</b>	29	K	.	0.146	R	✓	0.564
<b>E2</b>	60	G	.	0.345	D	✓	0.875
	74	M	.	0.161	T	.	0.045
	103	A	✓	0.889	T	✓	0.512
	164	A	✓	0.521	T	.	0.173
	221	R	✓	0.713	K	.	0.078
	299	S	✓	0.657	N	✓	0.600
	344	A	✓	0.818	T	.	0.448
	377	I	.	0.411	V	.	0.495
	384	M	✓	0.958	V	✓	0.921
<b>6K</b>	54	I	✓	0.593	V	✓	0.669
<b>E1</b>	211	K	.	0.413	T	✓	0.553
	269	M	✓	0.798	V	✓	0.681
	288	T	.	0.329	I	✓	0.781

Fonte: Autora, 2021

As predições de clivagem pelo imunoproteassoma demonstraram que as mutações E2-M74T, E2-A103T e E2-A164T aboliram o local de clivagem após o resíduo de Treonina nessas posições (Tabela 15).

**Tabela 15 - Predição de clivagem pelo imunoproteassoma**

Proteína	Posição	Imunoproteassoma					
		Cepa ancestral			Cepa AL		
		AA Ross	Clivagem	Score	AA AL	Clivagem	Score
<b>E3</b>	29	K	.	0.422	R	.	0.194
	60	G	.	0.038	D	.	0.030
	74	M	✓	0.582	T	.	0.032
<b>E2</b>	103	A	✓	0.921	T	.	0.352
	164	A	✓	0.690	T	.	0.160
	221	R	.	0.079	K	.	0.229
	299	S	.	0.389	N	.	0.270
	344	A	✓	0.886	T	✓	0.563
	377	I	.	0.344	V	.	0.485

	384	M	.	0.199	V	.	0.237
<b>6K</b>	54	I	✓	0.912	V	✓	0.944
	211	K	.	0.455	T	.	0.037
<b>E1</b>	269	M	✓	0.889	V	✓	0.878
	288	T	.	0.033	I	.	0.227

Fonte: Autora, 2021

#### 4.2.5 Predição do transporte pela TAP

Sabendo que os resíduos localizados nas posições P1 (N-terminal), P2, P3 e C-terminal dos peptídeos são críticos para a afinidade com a TAP, foram analisados os efeitos das mutações apenas nessas posições (LEHNERT et al., 2016)

A análise da afinidade dos peptídeos pela TAP demonstrou que a mutação E3-K29R aumentou a afinidade do peptídeo, quando localizada na posição C-terminal do peptídeo <sup>21</sup>PCTPCCYEK/R<sup>29</sup>, e passou de alta para intermediária, quando localizada na posição N-terminal do peptídeo <sup>21</sup>K/REPEETLRM<sup>29</sup>.

Na proteína E2, a mutação E2-G60D alterou a afinidade pela TAP quando localizada na posição P2 do peptídeo <sup>59</sup>DG/DSHDWTKL<sup>67</sup>, de baixa para intermediária. A mutação E2-M74T na posição N-terminal do peptídeo <sup>74</sup>M/TPADAERAG<sup>82</sup> reduziu a afinidade da TAP de intermediário para baixo. A mutação E2-A164T aumentou a afinidade de intermediária para alta, quando localizada na posição P2 do peptídeo <sup>163</sup>TA/TEEIEVHM<sup>171</sup>. De modo semelhante, a mutação E2-R221K aumentou a afinidade de intermediária para alta, quando localizada na posição C-terminal do peptídeo <sup>213</sup>TDKVINNCR/K<sup>221</sup>.

A mutação E2-A344T reduziu a afinidade pela TAP quando localizada na posição P2 do peptídeo <sup>343</sup>SA/TNGTAHGH<sup>351</sup>. Em contrapartida, a mutação E2-I377V aumentou pronunciadamente a afinidade pela TAP, quando localizada na posição N-terminal do peptídeo <sup>377</sup>I/VLLSMVGMA<sup>385</sup>.

Na proteína E1, a mutação E1-K211T alterou a predição da afinidade pela TAP de intermediária para alta, quando localizada na posição P2 do peptídeo <sup>210</sup>SK/TDVYANTQ<sup>218</sup>.

Os efeitos das mutações nas predições de afinidade à TAP podem ser observados na Tabela 16.

**Tabela 16 – Efeitos das mutações na afinidade da proteína TAP, quando localizadas nas posições N-terminal, P2, P3 e C-terminal dos peptídeos preditos.**

Proteína	Mutação	PP	Tanzânia, 1953		Alagoas, 2016		Efeito
			Peptídeo	Afinidade	Peptídeo	Afinidade	
<b>E3</b>	K29R	P1	KEPEETLRM	Alto	REPEETLRM	Intermediário	↓
		P2	EKEPEETLR	Alto	EREPEETLR	Alto	-
		P3	YEKEPEETL	Intermediário	YEREPEETL	Intermediário	-
		P9	PCTPCCYEK	Baixo/Indetectável	PCTPCCYER	Alto	↑↑
	G60D	P1	GSHDWTCLR	Intermediário	DSHDWTCLR	Intermediário	-
		P2	DGSHDWTCL	Baixo/Indetectável	DDSHDWTCL	Intermediário	↑
		P3	TDGSHDWTCL	Intermediário	TDDSHDWTCL	Intermediário	-
		P9	LQIGIKTDG	Alto	LQIGIKTDD	Alto	-
	M74T	P1	MPADAERAG	Intermediário	TPADAERAG	Baixo/Indetectável	↓
		P2	HMPADAERA	Baixo/Indetectável	HTPADAERA	Baixo/Indetectável	-
		P3	NHMPADAER	Intermediário	NHTPADAER	Intermediário	-
		P9	KLRYMDNHM	Intermediário	KLRYMDNHT	Intermediário	-
<b>E2</b>	A103T	P1	ARCPKGETL	Intermediário	TRCPKGETL	Intermediário	-
		P2	LARCPKGET	Alto	LTRCPKGET	Alto	-
		P3	ILARCPKGE	Baixo/Indetectável	ILTRCPKGE	Baixo/Indetectável	-
		P9	GTMGHFILA	Intermediário	GTMGHFILT	Intermediário	-
	A164T	P1	AEEIEVHMP	Alto	TEEIEVHMP	Alto	-
		P2	TAEIEVHM	Intermediário	TTEEIEVHM	Alto	↑
		P3	ATAEIEVH	Alto	ATTEEIEVH	Alto	-
		P9	YVQSTAATA	Alto	YVQSTAATT	Alto	-
	R221K	P1	RVDQCHAAV	Alto	KVDQCHAAV	Alto	-
		P2	CRVDQCHAA	Intermediário	CKVDQCHAA	Intermediário	-
		P3	NCRVDQCHA	Alto	NCKVDQCHA	Alto	-

		P9	TDKVINNCR	Intermediário	TDKVINNCK	Alto	↑
	S299N	P1	SMGEEPNYQ	Alto	NMGEEPNYQ	Alto	-
		P2	RSMGEEPNY	Intermediário	RNMGEEPNY	Intermediário	-
		P3	YRSMGEEP	Baixo/Indetectável	YRNMGEEP	Baixo/Indetectável	-
		P9	HPTLLSYRS	Baixo/Indetectável	HPTLLSYRN	Baixo/Indetectável	-
	A344T	P1	ANGTAHGHP	Alto	TNGTAHGHP	Alto	-
		P2	SANGTAHGH	Alto	STNGTAHGH	Intermediário	↓
		P3	LSANGTAHG	Baixo/Indetectável	LSTNGTAHG	Baixo/Indetectável	-
		P9	YKYWPQLSA	Intermediário	YKYWPQLST	Intermediário	-
	I377V	P1	ILLSMVGMA	Baixo/Indetectável	VLLSMVGVA	Alto	↑↑
		P2	FILLSMVG	Alto	FVLLSMVGV	Alto	-
		P3	SFILLSMVG	Alto	SFVLLSMVG	Alto	-
		P9	VVSVASFI	Alto	VVSVASFV	Alto	-
	M384V	P1	MAVGMCMCA	Intermediário	VAVGMCMCA	Intermediário	-
		P2	GMAVGMCMC	Alto	GVAVGMCMC	Alto	-
		P3	VGMAVGMCM	Alto	VGVAVGMCM	Alto	-
		P9	FILLSMVG	Alto	FVLLSMVGV	Alto	-
<b>6K</b>	I54V	P2	SIGAHTVSA	Intermediário	SVGHTVSA	Intermediário	-
		P3	MSIGAHTVS	Intermediário	MSVGAHTVS	Intermediário	-
		P9	LAFLAVMSI	Intermediário	LAFLAVMSV	Intermediário	-
<b>E1</b>	K211T	P1	KDVYANTQL	Alto	TDVYANTQL	Alto	-
		P2	SKDVYANTQ	Intermediário	STDVYANTQ	Alto	↑
		P3	ESKDVYANT	Baixo/Indetectável	ESTDVYANT	Baixo/Indetectável	-
		P9	IQSRTPEK	Alto	IQSRTPEST	Alto	-
	M269V	P1	MNCAVGNMP	Baixo/Indetectável	VNCAVGNMP	Baixo/Indetectável	-
		P2	AMNCAVGNM	Baixo/Indetectável	AVNCAVGNM	Baixo/Indetectável	-
		P3	RAMNCAVGN	Alto	RAVNCAVGN	Alto	-
		P9	IATNPVRAM	Intermediário	IATNPVRAV	Intermediário	-

T288I	P1	TRVVDAPSL	Intermediário	IRVVDAPSL	Intermediário	-
	P2	FTRVVDAPS	Baixo/Indetectável	FIRVVDAPS	Baixo/Indetectável	-
	P3	AFTRVVDAP	Intermediário	AFIRVVDAP	Intermediário	-
	P9	IDIPDAAFT	Baixo/Indetectável	IDIPDAAFI	Baixo/Indetectável	-

Legenda: PP = Posição no peptídeo, P1 = Posição 1 (n-terminal), P2 = Posição 2, P3 = Posição 3, P9 = Posição 9 (c-terminal), ↓ baixou um nível, ↓↓ baixou dois níveis, ↑ aumentou um nível, ↑↑ aumentou dois níveis. - = não teve efeito

Fonte: Autora, 2021



#### 4.2.6 Impacto das mutações na ligação dos peptídeos a moléculas de MHC-I

Ao avaliar o impacto das mutações na ligação de peptídeos às 27 moléculas do MHC-I testadas, foi possível observar que as mutações podem afetar a predição, abolindo ou induzindo a ligação, a depender da sua posição dentro do peptídeo, principalmente em relação às posições P1-P3 e P9, que são locais de resíduos âncora para a maioria dos alelos (Tabela 17).

**Tabela 17 - Potencial efeito das mutações na ligação de peptídeos aos 27 alelos do MHC-I mais frequentes na população mundial**

Mutação	Início	Fim	PP	Tanzânia, 1953	Alelos	Alagoas, 2016	Novos alelos	Alelos que permaneceram	Alelos abolidos
E3-K29R	27	35	3	YEKEPEETL	HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03	YEREPEETL	HLA-B*07:02	HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03	nsa
	29	37	1	KEPEETLRM	HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03	REPEETLRM	nsa	HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03	nsa
E2-G60D	56	64	5	IKTDGSHDW	não ligante	IKTDDSHDW	HLA-B*58:01	nsa	nsa
	60	68	1	GSHDWTKLR	HLA-A*33:01, HLA-A*68:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*31:01,	DSHDWTKLR	HLA-A*26:01	HLA-A*33:01, HLA-A*68:01	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*31:01,
E2-M74T	66	74	9	KLRYMDNHM	HLA-A*30:01, HLA-B*15:01	KLRYMDNHT	nsa	nsa	HLA-A*30:01, HLA-B*15:01
	68	76	7	RYMDNHMPA	HLA-A*30:01	RYMDNHMPA	nsa	HLA-A*30:01	nsa

<b>Mutação</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>PP</b>	<b>Tanzânia, 1953</b>	<b>Alelos</b>	<b>Alagoas, 2016</b>	<b>Novos alelos</b>	<b>Alelos que permaneceram</b>	<b>Alelos abolidos</b>
	72	80	3	NHMPADAER	HLA-A*33:01	NHTPADAER	nsa	nsa	HLA-A*33:01
	74	82	1	MPADAERAG	HLA-B*35:01	TPADAERAG	nsa	nsa	HLA-B*35:01
E2-A103T	95	103	9	GTMGHFILA	HLA-A*02:06, HLA-A*30:01, HLA-A68:02, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	GTMGHFILT	nsa	HLA-A*02:06, HLA-A*30:01, HLA-A68:02	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03
	96	104	8	TMGHFILAR	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*31:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01	TMGHFILTR	nsa	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*31:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01	nsa
	99	107	5	HFILARCPK	HLA-A*30:01, HLA-A*31:01, HLA-A*33:01	HFILTRCPK	nsa	HLA-A*30:01, HLA-A*31:01, HLA-A*33:01	nsa
E2-A164T	156	164	9	YVQSTAATA	HLA-A*02:06, HLA-A*68:02	YVQSTAATT	nsa	nsa	HLA-A*02:06, HLA-A*68:02
	159	167	6	STAATAEEI	HLA-A*68:02	STAATTEEI	HLA-A*02:06	HLA-A*68:02	nsa
	162	170	3	ATAEEIEVH	HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02	ATTEEIEVH	nsa	nsa	HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02
	163	171	2	TAEIEVHM	HLA-A*01:01, HLA-A*68:02, HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01	TTEEIEVHM	HLA-A*26:01	HLA-A*01:01, HLA-A*68:02, HLA-B*35:01	HLA-B*51:01, HLA-B*53:01
E2-R221K	221	229	1	RVDQCHAAV	HLA-A*02:06	KVDQCHAAV	HLA-A*02:01	HLA-A*02:06	nsa

Mutação	Início	Fim	PP	Tanzânia, 1953	Alelos	Alagoas, 2016	Novos alelos	Alelos que permaneceram	Alelos abolidos
E2-S299N	298	306	2	RSMGEEPNY	HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*32:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	RNMGEEPNY	nsa	HLA-A*30:02	HLA-A*01:01, HLA-A*11:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*32:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01
E2-A344T	343	351	2	SANGTAHGH	HLA-A*30:02	STNGTAHGH	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*26:01, HLA-A*68:01	HLA-A*30:02	nsa
E2-I377V	369	377	9	VVSVASFI	HLA-A*68:02	VVSVASFV	HLA-A*02:03, HLA-A*02:06	HLA-A*68:02	nsa
	370	378	8	VVSVASFIL	não ligante	VVSVASFVL	HLA-A*32:01	nsa	nsa
	372	380	6	SVASFILLS	HLA-A*68:02	SVASFVLLS	nsa	HLA-A*68:02	nsa
	373	381	5	VASFILLSM	HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	VASFVLLSM	nsa	HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	nsa
	374	382	4	ASFILLSMV	HLA-A*02:06, HLA-A*68:02	ASFVLLSMV	nsa	HLA-A*02:06, HLA-A*68:02	nsa
E2-M384V	376	384	2	FILLSMVG	não ligante	FVLLSMVGV	HLA-A*02:01, HLA-	nsa	nsa

Mutação	Início	Fim	PP	Tanzânia, 1953	Alelos	Alagoas, 2016	Novos alelos	Alelos que permaneceram	Alelos abolidos
	378	386	7	LLSMVGMAV	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	LLSMVGVAV	A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*68:02 nsa	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	nsa
	380	388	5	SMVGMAVGM	não ligante	SMVGVAVGM	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*26:01, HLA-B*15:01	nsa	nsa
6K-154V	46	54	9	LAFLAVMSI	HLA-B*51:01	LAFLAVMSV	HLA-A*02:06	HLA-B*51:01	nsa
	48	56	7	FLAVMSIGA	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	FLAVMSVGA	nsa	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	nsa
	49	57	6	LAVMSIGAH	não ligante	LAVMSVGAH	HLA-A*68:02	nsa	nsa
	51	59	4	VMSIGAHTV	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*32:01	VMSVGAHTV	nsa	HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*32:01	nsa
	53	61	2	SIGAHTVSA	HLA-A*02:03, HLA-A*02:06	SVGHTVSA	HLA-A*30:01, HLA-A*68:02	nsa	nsa
E1-K211T	203	211	9	IQSRTPEK	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*30:01	IQSRTPEST	nsa	nsa	HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*30:01

Mutação	Início	Fim	PP	Tanzânia, 1953	Alelos	Alagoas, 2016	Novos alelos	Alelos que permaneceram	Alelos abolidos
	206	214	6	RTPESKD VY	HLA-A*01:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02, HLA-B*15:01, HLA-B*58:01	RTPESTDVY	HLA-A*32:01, HLA-B*35:01	HLA-A*01:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02, HLA-B*15:01, HLA-B*58:01	nsa
	209	217	3	ESKD VYANT	HLA-A*68:02	ESTD VYANT	nsa	HLA-A*68:02	nsa
	210	218	2	SKD VYANTQ	não ligante	STD VYANTQ	HLA-A*01:01	nsa	nsa
	211	219	1	KD VYANTQL	HLA-B*40:01	TD VYANTQL	nsa	HLA-B*40:01	nsa
E1-M269V	261	269	9	IATNPV RAM	HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01	IATNPV RAV	HLA-A*68:02	HLA-B*51:01	HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*53:01
E1-I288T	281	289	8	DIPDAAFTR	HLA-A*26:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01	DIPDAAFIR	nsa	HLA-A*33:01, HLA-A*68:01	HLA-A*26:01
	282	290	7	IPDAAFTRV	HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01	IPDAAFIRV	nsa	HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01	nsa

PP = Posição no peptídeo; nsa = não se aplica.

Fonte: Autora, 2021

Na proteína E3, a mutação E3-K29R na posição P3 do peptídeo <sup>27</sup>YEK/REPEETL<sup>35</sup> aumentou a sua cobertura alélica.

Na proteína E2, a mutação E2-G60D na posição P1 induziu a ligação do peptídeo <sup>60</sup>G/DSHDWTKLR<sup>68</sup> ao alelo HLA-A\*26:01, contudo, aboliu a ligação desse peptídeo aos alelos HLA-A\*03:01, HLA-A\*11:01 e HLA-A\*31:01.

Quando presente na posição P9 dos peptídeos, as substituições por treonina das mutações E2-M74T, E2-A103T e E2-A164T aboliram a ligação de peptídeos a diferentes alelos do MHC-I. Em contrapartida, a mutação E2-A164T na posição P2 induziu a ligação ao alelo HLA-A\*26:01, mas teve efeito abolitivo na ligação aos alelos HLA-B\*51:01 e HLA-B\*53:01.

Quando presente na posição P2 dos peptídeos, a mutação E2-R221K induziu a ligação do peptídeo <sup>221</sup>R/KVDQCHAAV<sup>229</sup> ao alelo HLA-A\*02:01 e a mutação E2-A344T induziu a ligação do peptídeo <sup>343</sup>SA/TNGTAHGH<sup>351</sup> aos alelos HLA-A\*03:01, HLA-A\*11:01, HLA-A\*26:01, HLA-A\*68:01. De forma contrária, mutação de serina para asparagina na posição 299 da E2 aboliu a ligação do peptídeo <sup>298</sup>RSMGEEPNY<sup>306</sup> a nove alelos diferentes. Se apresentadas no mesmo peptídeo, as mutações E2-I377V em P2 e E2-M384V em P9, induziram a ligação aos alelos HLA-A\*02:01, HLA-A\*02:03, HLA-A\*02:06 e HLA-A\*68:02.

Na proteína 6K, a mutação I54V não aboliu nenhuma ligação do peptídeo, apenas induziu a ligação de peptídeos a moléculas do MHC, quando presente nas posições P9, P6 e P2.

Na proteína E1, a mutação E1-K211T na posição P9 aboliu a ligação do peptídeo aos alelos HLA-A\*03:01, HLA-A\*11:01, HLA-A\*30:01 e na posição P2, induziu a ligação do peptídeo ao HLA-A\*01:01. A mutação E1-M269V na posição P9 aboliu a ligação do peptídeo aos alelos HLA-B\*07:02, HLA-B\*35:01, HLA-B\*53:01 e induziu a ligação ao alelo HLA-A\*68:02.

Em resumo, esses resultados sinalizam que mutações em resíduos âncora podem afetar a afinidade de ligação de peptídeos a diversos alelos do MHC-I.

#### 4.2.7 Impacto das mutações na imunogenicidade

Todos os peptídeos preditos como ligantes fortes ou moderados ao MHC-I que abrangiam mutações foram analisados *in silico* quanto a sua imunogenicidade, permitindo constatar que dos 39 peptídeos testados, apenas 15% dos peptídeos (n=6) tiveram sua imunogenicidade alterada devido à mutação. As mudanças na imunogenicidade dependeram diretamente da posição da mutação no peptídeo.

A mutação E2-I377V anulou a imunogenicidade de três peptídeos diferentes, quando presente nas posições P5, P6 e P8 dos peptídeos. A mutação E2-M74T, quando na posição P7, induziu a imunogenicidade no peptídeo <sup>68</sup>RYMDNHTPA<sup>76</sup>, que se liga moderadamente aos HLA-A24:02 e HLA-A30:01. De forma semelhante, as mutações E2-M384V e E1-K211T induziram a imunogenicidade, quando localizadas nas posições P5 e P6 dos peptídeos, respectivamente (Tabela 18).

**Tabela 18 - Potencial imunogenicidade dos peptídeos preditos com ligação aos alelos do MHC-I**

Mutação	Início	Fim	PP	Tanzânia, 1953	Imunogênico	Alagoas, 2016	Imunogênico	Efeito
E3-K29R	27	35	3	YEKEPEETL	Sim	YEREPEETL	Sim	=
	29	37	1	KEPEETLRM	Sim	REPEETLRM	Sim	=
E2-G60D	56	64	5	IKTDGSHDW	Não	IKTDDSHDW	Não	=
	60	68	1	GSHDWTKLR	Sim	DSHDWTKLR	Sim	=
E2-M74T	66	74	9	KLRYMDNHM	Não	KLRYMDNHT	Não	=
	68	76	7	RYMDNHMPA	Não	RYMDNHTPA	Sim	↑
	72	80	3	NHMPADAER	Sim	NHTPADAER	Sim	=
	74	82	1	MPADAERAG	Sim	TPADAERAG	Sim	=
E2-A103T	95	103	9	GTMGHFILA	Sim	GTMGHFILT	Sim	=
	96	104	8	TMGHFILAR	Sim	TMGHFILTR	Sim	=
	99	107	5	HFILARCPK	Sim	HFILTRCPK	Sim	=
E2-A164T	156	164	9	YVQSTAATA	Não	YVQSTAATT	Não	=
	159	167	6	STAATAEEI	Sim	STAATTEEI	Sim	=
	162	170	3	ATAEEIEVH	Sim	ATTEEIEVH	Sim	=
	163	171	2	TAAEIEVHM	Sim	TTEEIEVHM	Sim	=
E2-R221K	221	229	1	RVDQCHAAV	Não	KVDQCHAAV	Não	=
E2-S299N	298	306	2	RSMGEEPNY	Sim	RNMGEEPNY	Sim	=
E2-A344T	343	351	2	SANGTAHGH	Sim	STNGTAHGH	Sim	=
	369	377	9	VVSVASFI	Não	VVSVASFV	Não	=
	370	378	8	VVSVASFIL	Sim	VVSVASFVL	Não	↓
	372	380	6	SVASFILLS	Sim	SVASFVLLS	Não	↓
	373	381	5	VASFILLSM	Sim	VASFVLLSM	Não	↓
E2-M384V	374	382	4	ASFILLSMV	Não	ASFVLLSMV	Não	=
	376	384	2	FILLSMVGM	Não	FVLLSMVGV	Não	=
	378	386	7	LLSMVGMAV	Não	LLSMVGVAV	Não	=
	380	388	5	SMVGMVAVGM	Não	SMVGVAVGM	Sim	↑
	46	54	9	LAFLAVMSI	Não	LAFLAVMSV	Não	=
6K-I54V	48	56	7	FLAVMSIGA	Não	FLAVMSVGA	Não	=
	49	57	6	LAVMSIGAH	Não	LAVMSVGAH	Não	=
	51	59	4	VMSIGAHTV	Sim	VMSVGAHTV	Sim	=
	53	61	2	SIGAHTVSA	Sim	SVGAHTVSA	Sim	=

	203	211	9	IQSRTPESEK	Sim	IQSRTPEST	Sim	=
	206	214	6	RTPESEKDVY	Não	RTPESTDVY	Sim	↑
<b>E1-K211T</b>	209	217	3	ESKDVYANT	Sim	ESTDVYANT	Sim	=
	210	218	2	SKDVYANTQ	Sim	STDVYANTQ	Sim	=
	211	219	1	KDVYANTQL	Sim	TDVYANTQL	Sim	=
<b>E1-M269V</b>	261	269	9	IATNPVRAM	Sim	IATNPVRAV	Sim	=
	281	289	8	DIPDAAFTR	Sim	DIPDAAFIR	Sim	=
<b>E1-I288T</b>	282	290	7	IPDAAFTRV	Sim	IPDAAFIRV	Sim	=

Fonte: Autora, 2021

Em conjunto, os resultados demonstram que a cepa de Alagoas circulante em 2016, pertence ao genótipo ECSA, e possui mutações em regiões expostas da proteína. Além disso, essas mutações têm potencial para influenciar no reconhecimento de antígenos pelos linfócitos B, na ligação de anticorpos e no processamento e apresentação de peptídeos no MHC-I a linfócitos T citotóxicos.



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou a caracterização molecular de regiões do genoma viral codificantes para as proteínas do envelope do CHIKV circulante em Alagoas/BR, durante o surto de 2016. Através de análises de biologia molecular junto a uma abordagem *in silico* e de imunoinformática, foi possível detectar mutações nas proteínas do envelope do vírus e prever o seu potencial impacto no reconhecimento por linfócitos B, apresentação pelo MHC-I e reconhecimento por linfócitos T citotóxicos.

Estudos pregressos, como o de CHARLYS DA COSTA e colaboradores (2017) e TANABE e colaboradores (2018a), que utilizaram amostras de pacientes do Estado de Alagoas/BR, detectaram que o CHIKV circulante durante o surto de 2016 pertence ao genótipo ECSA, o que foi corroborado pelo presente estudo. Contudo, este é o primeiro estudo a relatar e descrever detalhadamente a ocorrência de mutações no genoma codificante para as proteínas do envelope do CHIKV circulante durante o surto de 2016 no Estado de Alagoas.

A utilização de ferramentas computacionais para análises *in silico* e de imunoinformática permitiu que fosse realizada a predição do possível impacto das mutações detectadas, visto que a literatura relata diferentes efeitos das mutações na que podem impactar a interação do vírus com o vetor e com o hospedeiro, inclusive com o sistema imune, conferindo-lhe vantagem seletiva para contornar os desafios impostos pela resposta imune adaptativa.

A análise da variabilidade genética dentro das amostras estudadas revelou a mutação E3-K29R. Sabe-se que a proteína E3 está envolvida no direcionamento de proteínas estruturais durante a replicação, na estabilização da espícula viral no envelope do CHIKV e na proteção da E1 contra a fusão prematura durante a biogênese do vírus (SJOBORG; GAROFF, 2003; SOLIGNAT et al., 2009; UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013; LUM; NG, 2015; YAP et al., 2017) e, apesar das interações entre a E3 com outras proteínas envolverem o resíduo E3-47 (UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013), a substituição pode possivelmente alterar o dobramento da proteína. Através da análise de imunoinformática foi possível prever que a mutação E3-K29R está presente em potenciais epítomos lineares de célula B, exceto segundo a escala

de Chou e Fasman, que prevê voltas  $\beta$ , onde a mutação aboliu o epítopo, sinalizando que as alterações estruturais podem influenciar na antigenicidade desse resíduo. Esse fato é importante pois, no vírus da Encefalite Equina (VEEV), um outro *Alphavirus*, a proteína E3 foi alvo de anticorpos monoclonais específicos, e a imunização passiva com mAbs murinos anti-E3 protegeu camundongos da progressão da doença, demonstrando que a E3 possui epítotos protetores (PARKER et al., 2010).

A proteína E2 presente nas amostras desse estudo teve alta variabilidade genética, apresentando 9 mutações de aminoácidos. A troca obrigatória entre vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados é uma das principais características que tornam essencial a alta adaptabilidade do vírus através de mutações, pois a sua principal função consiste na interação com receptores celulares (SIMIZU et al., 1984). A literatura reporta diferentes mutações detectadas na E2 com efeito biológico na interação do vírus com o vetor ou hospedeiro (TSETSARKIN et al., 2014; HAWMAN et al., 2017).

Diferentes estudos evidenciaram que a E2 é a principal proteína-alvo para a resposta de anticorpos anti-CHIKV em todas as fases da doença, em murinos, primatas não-humanos e humanos (KAM et al., 2012; LONG et al., 2015; SMITH et al., 2015; PORTA et al., 2016c). Isso pôde ser demonstrado também através do rastreamento de epítotos experimentalmente validados, onde foram detectados diferentes epítotos-alvo do CHIKV na proteína E2, abrangendo diferentes posições com mutações detectadas nesse estudo.

Dentre as mutações detectadas, a mutação E2-G60D merece destaque devido ao seu impacto biológico já descrito na literatura. Experimentos de genética reversa constataram que a presença dessa mutação aumenta a infectividade do CHIKV em células do intestino de mosquitos *Aedes aegypti*, e quando combinada com E2-I211T, atuam sinergicamente para aumentar a infectividade do CHIKV em mosquitos *Aedes albopictus* (TSETSARKIN et al., 2009). Efeitos semelhantes foram demonstrados em outros *Alphavirus*, onde mutações com propriedades compartilhadas e localizadas em regiões genômicas próximas (E2-H55Q e E2-K70E) aumentaram a infectividade do Sindbis vírus (SINV) para o *Ae. aegypti* (PIERRO; POWERS; OLSON, 2007). Estes resultados merecem atenção, visto que o *Aedes aegypti* é o principal vetor do CHIKV no Brasil (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2015).

A mutação E2-G60D está localizada numa região chamada de *Wings*, situada no topo do domínio A da glicoproteína E2 (VOSS et al., 2010). O domínio A é

conhecido por estar envolvido na ligação com o receptor e com a proteção do circuito de fusão em pH neutro. A sua cadeia lateral do resíduo selvagem não é acessível à superfície, mas forma uma ponte salina com o resíduo altamente conservado E2-68D, que está enterrado na proteína e forma uma rede de ligações de hidrogênio (VOSS et al., 2010). O domínio A possui uma região antigênica, entre os resíduos 58 e 80, que contém o domínio de ligação ao receptor putativo (RBD), que projeta-se para fora do envelope viral e se localiza no ápice dos trómeros (VOSS et al., 2010). O RBD abrange as posições E2-60 e E2-74, onde foram detectadas mutações. O resíduo mutante E2-60D foi detectado como parte de epítomos conformacionais, se ligando fortemente a anticorpos (3N23 e 1H12) que são capazes de neutralizar completamente cepas do CHIKV pertencentes a diferentes genótipos (IOL, WA e Asiático), quando administrados de forma profilática em camundongos (SMITH et al., 2015). O mAb 8B10, um anticorpo neutralizante que inibe a ligação do vírus ao receptor celular, também se liga a um epítomo conformacional contendo o resíduo E2-60D (PORTA et al., 2016c). Adicionalmente, o resíduo E2-60D foi detectado por crio-microscopia eletrônica e através de abordagem de mutagênese de varredura de alanina como alvo dos mAbs 4J21 e 5M16 (LONG et al., 2015), que exercem atividade terapêutica em camundongos imunodeficientes e inibem a fusão viral com as membranas das células alvo (SMITH et al., 2015).

Em relação à mutação E2-M74T, não existem relatos na literatura da ocorrência dessa mutação em estudos de caracterização molecular de cepas provenientes de surtos, porém ela está presente em outras cepas do Brasil. O impacto dessa mutação não é conhecido e precisa ser investigada, visto que também está localizada na região de *Wings* do domínio A (VOSS et al., 2010). Quanto à imunogenicidade, o resíduo selvagem E2-M74 foi detectado como parte de um epítomo conformacional alvo do anticorpo murino CHK-152 (SMITH et al., 2015), cujo mecanismo baseia-se no bloqueio da fusão viral, exercendo ação neutralizante contra todos os três genótipos de CHIKV *in vitro* (PAL et al., 2013). As funções efetoras desse mAb foram demonstradas através da proteção de camundongos de uma infecção letal, e da redução da carga viral em camundongos após transferência passiva (PAL et al., 2013). Em relação a estudos com anticorpos humanos, o resíduo E2-M74 faz parte do epítomo-alvo dos anticorpos 1H12 e 5M16, que também se ligam ao resíduo E2-G60D (LONG et al., 2015; SMITH et al., 2015). Ainda, a posição E2-74 foi detectada como alvo do anticorpo neutralizante humano IM-CK063, no entanto a partícula viral

utilizada no estudo apresentava uma isoleucina nessa posição (FONG et al., 2014b). Esses resultados demonstram que esse resíduo é importante na ligação e na neutralização do CHIKV, tornando necessário que sejam realizados estudos experimentais que investiguem se a presença da mutação E2-M74T pode alterar o reconhecimento, a ligação e a ação efetora dos mAbs.

Corroborando com os achados experimentais (LONG et al., 2015; SMITH et al., 2015; PORTA et al., 2016a), a predição de epítomos realizada no presente estudo revelou que os resíduos E2-60D e E2-M74 apresentam alto potencial de fazer parte de epítomo descontínuo e linear, segundo diferentes propriedades físico-químicas que se correlacionam com determinantes antigênicos. Outros estudos também detectaram essas posições como parte de epítomos lineares de célula B, segundo a flexibilidade e antigenicidade (HASAN et al., 2015).

Outra mutação detectada nesse estudo, a mutação E2-A103T, também pertencente ao domínio A (VOSS et al., 2010), foi relatada anteriormente em isolados de pacientes do Rio de Janeiro-RJ durante o surto de 2016 e está presente em todos os isolados do Brasil (CUNHA et al., 2017). O resíduo selvagem E2-A103 pertence a um epítomo linear de anticorpos humanos sugerido como candidato potencial para ensaios sorológicos, por demonstrar ligação aos genótipos ECSA e Asiático, ou como candidato vacinal, por sua forte ação neutralizante (CHUA et al., 2016). Dessa maneira, a presença de uma mutação nessa posição deve ser considerada, pois a substituição pode alterar as propriedades antigênicas dessa região.

Em relação às mutações pertencentes ao domínio B e domínio C da E2, estudos de assinatura molecular realizados com isolados da Índia incluíram a mutação E2-A164T como componente da assinatura molecular das cepas indianas, pois essa mutação foi detectada em isolados de mosquito de 2000, em Yawat; em isolados de pacientes durante o surto indiano de 2006, em Karnakata, Andhra Pradesh, Maharashtra, Tamil Nadu e Rajastão; em isolados de Reunião, junto à mutação E1-M269V que também foi detectada nesse estudo (ARANKALLE et al., 2007). Além disso, a mutação E2-A164T foi detectada conjuntamente às mutações E1-M269V, E2-S299N e E2-A344T, também detectadas nesse estudo, em isolados de Nova Delhi, em 2010 (SHRINET et al., 2012), sugerindo um possível similaridade entre o vírus das amostras desse estudo com as cepas indianas. Fora do continente indiano, as mutações E2-A164T e E1-M269V foram detectadas durante um surto na região de Lázio, na Itália, em 2017 (CARLETTI et al., 2017). Contudo, apesar de ter sido

detectada em diferentes surtos, o mecanismo molecular implicado na ocorrência da mutação E1-A164T ainda não foi caracterizado.

As mutações E2-I377V e M384V foram detectadas em isolados indianos de Kolkata (1963) e Barsi (1973) pertencentes ao genótipo Asiático, porém não existem evidências claras de recombinação entre os genótipos ECSA e Asiático (ARANKALLE et al., 2007). Em relação ao seu impacto no reconhecimento do sistema imune, um recente estudo demonstrou que camundongos imunizados com diferentes peptídeos de E2 correspondentes a epítomos produzem altos níveis de anticorpos anti-CHIKV, e dois desses epítomos abrangem essas duas posições separadamente (BASU et al., 2020), no entanto os epítomos continham, nessas posições, resíduos diferentes dos detectados nesse estudo.

A imunização de camundongos com diferentes peptídeos preditos e sintetizados, abrangendo os resíduos E2-60D, E2-M74, E2-S299, E2-A164, E2-221K e E2-A344, foram capazes, separadamente, de gerar imunorreatividade, altos títulos de anticorpos, e indução de células B de memória após desafio com a proteína E2, demonstrando que as predições de epítomos são úteis e válidas para pesquisa de peptídeos imunógenos eficazes (NAGAR et al., 2016). Contudo, vale ressaltar que alguns dos peptídeos utilizados continham o resíduo selvagem, e estudos experimentais são necessários para elucidar se as mutações encontradas nesse estudo poderiam alterar os aspectos funcionais resultantes das imunizações com esses epítomos.

Poucos são os estudos que realizam a caracterização molecular da proteína 6K, porém, a mutação 6K-I54V foi detectada em cepas provenientes de nativos de Shenzhen (China) que retornaram da Índia e da Indonésia, com cepas do genótipos ECSA e Asiático respectivamente (ZHANG et al., 2018b). Em relação ao impacto dessa mutação, a predição revelou que o resíduo está presente em um domínio transmembranar, o que foi corroborado pela literatura que se refere à 6K como um polipeptídeo transmembranar (LILJESTRÖM; GAROFF, 1991). Ainda, a literatura reporta que a proteína 6K possui epítomos de célula T que abrangem a posição da mutação detectada nesse estudo (LORENTE et al., 2017).

Mutações presentes na E1, como a E1-A226V, foram descritas anteriormente por conferir aptidão ao vírus de infectar novos vetores (TSETSARKIN et al., 2007), aumentando a infectividade do mosquito (TSETSARKIN; WEAVER, 2011),

contribuindo para a emergência do CHIKV em novos continentes, porém, a mutação E1-A226V não foi detectada nas amostras desse estudo.

A mutação E1-K211T, detectada nesse estudo, foi relatada pela primeira vez durante um surto epidêmico no Rio de Janeiro, em 2016 (CUNHA et al., 2017). Similarmente, uma mutação na mesma posição, E1-K211N, foi detectada durante surtos em Karnataka e Gujarat, no sudoeste da Índia, durante o surto de 2006 e em um isolado do Sri Lanka, coletado em março de 2008, localidades cujo o principal vetor do CHIKV é o *Aedes aegypti* (ARANKALLE et al., 2007; HAPUARACHCHI et al., 2010a). Análises de pressão de seleção selecionaram a posição E1-211 como sofrendo pressão positiva, revelando alta propensão para mutações (ABRAHAM, MANAKKADAN, et al., 2016a, SUMATHY, ELLA, 2012).

Ainda na mesma posição, apesar de ser característica do genótipo asiático, a mutação E1-K211E foi detectada em cepas indianas do genótipo ECSA provenientes de Delhi, Andhra Pradesh e Tamil Nadu (KUMAR; GOPAL, 2010; SHRINET et al., 2012; SUMATHY; ELLA, 2012) e em isolados de viajantes na França retornando de áreas endêmicas da Índia (GRANDADAM et al., 2011b), sendo constantemente apresentada com a ocorrência da mutação E2-V264A (AGARWAL et al., 2016). Agarwal e colaboradores (2016) investigaram o efeito da mutação E1-K211E na competência vetorial e demonstraram, através de genética reversa, que a mutação E1-K211E provoca o aumento do título viral no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti* em 6 vezes, nas pernas e asas em 6,5 vezes e na saliva em 12 vezes, indicando que essa mutação aumenta a infecção, a disseminação para órgãos secundários do mosquito e a transmissão através da saliva (AGARWAL et al., 2016). Quando combinada com a mutação E2-V264A, o aumento é ainda maior na infecção, disseminação e transmissão (13, 15 e 62 vezes, respectivamente), indicando um efeito sinérgico dessas mutações na biologia viral frente o mosquito (AGARWAL et al., 2016). Os mecanismos moleculares envolvidos nessa mutação ainda são desconhecidos, porém a predição realizada no presente estudo indica que a substituição de Lisina por Treonina, na mutação E1-K211T, pode interferir nas interações com outros domínios de proteínas, o que pode, conseqüentemente, ter efeito na conformação e nas funções da proteína.

A mutação E1-M269V faz parte da assinatura molecular de diversas cepas indianas e do sudeste asiático pertencentes aos genótipos IOL e ECSA (SHRINET et al., 2012; MUDURANGAPLAR; PEERAPUR, 2016; MELAN et al., 2018). Essa

mutação também foi detectada na sequência de cepas provenientes de um surto autóctone que ocorreu na região do Lazio, Itália, em 2017, um ano depois da coleta das amostras do atual estudo (CARLETTI et al., 2017).

A mutação E1-T288I, presente em todas as cepas sequenciadas nesse estudo, também foi detectada posteriormente em casos importados para o Irã durante o surto de 2017 (POURIAYEVALI et al., 2019). No entanto, o impacto biológico dessa mutação ainda não foi elucidado.

Em relação às predições de processamento de peptídeos para apresentação ao MHC-I, foi possível constatar que as mutações têm o potencial de causar efeitos nas diferentes etapas do processamento de peptídeos (proteassoma, transporte pela TAP), na apresentação ao MHC-I e no reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos, visto que o crivo dessas etapas obedece a critérios de seletividade de acordo com as posições e propriedades físico-químicas dos aminoácidos, como a literatura refere (UEBEL et al., 1997; KEŞMIR et al., 2002; CALIS et al., 2013)

A clivagem do proteassoma é a primeira etapa da via de processamento para apresentação de peptídeos pelo MHC-I, e consiste numa etapa seletiva com especificidade (EGGERS et al., 1995). As especificidades da TAP e das moléculas do MHC evoluíram de forma a se ajustarem à especificidade do imunoproteassoma (KEŞMIR et al., 2002) e bons ligantes do MHC têm alta probabilidade de terem sido gerados pelo imunoproteassoma, mas também albergam peptídeos gerados pelo proteassoma constitutivo (NIELSEN et al., 2005).

Mutações em regiões proteicas que são propensas a serem clivadas pelo proteassoma podem impactar a apresentação de epítomos na superfície celular, como foi visto na mutação de Lisina (K) por Arginina (R) na resposta de Linfócitos T Citotóxicos contra o vírus da Leucemia Murina (FULV) (OSSENDORP et al., 1996), mostrando que uma única troca de resíduo pode causar a abolição do epítomo por clivagem específica do proteassoma.

Nossos resultados revelam que os potenciais locais de clivagens pelo proteassoma constitutivo foram afetados pela presença de mutações em regiões das proteínas E1, E2 e E3. A troca da Lisina (K) pela Treonina (T) em E1-211 fez surgir um novo local de clivagem após essa posição, pois enquanto a presença de K na posição C-terminal da ligação peptídica causa um efeito negativo para a clivagem, a T nessa posição foi mais favorável (KEŞMIR et al., 2002). Na posição E1-288, a substituição da Treonina pela Isoleucina fez surgir um novo local de clivagem pelo fato

da Isoleucina ser um aminoácido apolar de cadeia ramificada, que é uma predileção para clivagem do proteassoma constitutivo (CARDOZO; KOHANSKI, 1998; KEŞMIR et al., 2002). As mudanças na predição de clivagem diante das substituições na E2 de Alanina para Treonina, nas posições E2-164 e E2-344 podem ser explicadas pelo fato de que o proteassoma constitutivo tem preferência por clivar peptídeos com o aminoácido C-terminal sendo hidrofóbico (KEŞMIR et al., 2002). Em relação às clivagens pelo imunoproteassoma, três mutações na E2 impactaram a predição de clivagem (M74T, A164T e A344T) pois a Treonina é um aminoácido desfavorável para estar na posição C-terminal do peptídeo e aminoácidos hidrofóbicos, como a Alanina e Metionina, são favoráveis a estarem nessa posição (CARDOZO; KOHANSKI, 1998; NIEDERMANN et al., 1999).

O complexo heterodimérico TAP é altamente seletivo em afinidades com peptídeos, contudo, a sua seletividade não é igualmente distribuída no substrato. Apenas as posições P1 (N-terminal), P2, P3 e C-terminal são críticas (UEBEL et al., 1997). Quando a mutação E3-K29R ocorre nas porções N-terminal e C-terminal do peptídeo, a predição é alterada, visto que a Arginina (R) ser um aminoácido altamente favorável para a afinidade pela TAP, quando localizado nessas regiões dos peptídeos (VAN ENDERT et al., 1995; UEBEL; TAMPÉ, 1999). A mutação E2-I377V, quando ocorreu na posição N-terminal, alterou a afinidade pelo TAP de indetectável para alta, isso porque resíduos menores e alifáticos como a Valina são favorecidos à ligação ao TAP (BHASIN; RAGHAVA, 2004).

Em relação à ligação dos peptídeos ao MHC-I, cada alelo possui diferentes especificidades, aumentando o repertório de apresentação de antígenos para os linfócitos T. Todavia, algumas características se coincidem entre muitos alelos do MHC-I, como a posição dos resíduos âncora e a predileção por resíduos hidrofóbicos, alifáticos ou carregados na posição C-terminal. As análises *in silico* deste estudo também demonstraram esse fato, visto que quando as mutações ocorreram nas posições P2 e P9 de alguns potenciais peptídeos, ocasionaram modificações na ligação a diferentes alelos, seja induzindo ou abolindo a ligação. Dentre os diferentes peptídeos preditos que abrangem as mutações, o peptídeo <sup>298</sup>RSMGEEPNY<sup>306</sup> merece destaque pois a mutação E2-S299N aboliu a potencial ligação a nove alelos do MHC-I diferentes, o que sinaliza que é necessário considerar a variabilidade genética das cepas frente aos alelos do MHC-I mais frequentes em populações alvo de vacinas.



Alguns peptídeos que foram preditos como ligantes de moléculas do MHC-I não apresentaram o potencial de provocar uma resposta de célula T, contudo, a previsão de imunogenicidade permanece, até certo ponto, limitada pela ausência de dados de peptídeos não-imunogênicos, que seriam utilizados no treinamento de algoritmos de predição (CALIS et al., 2013).

Além da sequência de resíduos que compõem os peptídeos, diferentes fatores podem ser decisivos para determinar se um peptídeo é ou não um epítipo de células T citotóxicas, como a abundância dos complexos pMHC para o direcionamento imunológico, que pode ser afetada pela afinidade da ligação pMHC (VITIELLO et al., 1997), pela estabilidade do complexo pMHC e pelo processamento dos peptídeos (TENZER et al., 2009; CALIS et al., 2013). Mesmo com todas as condições favoráveis, o reconhecimento de células T pode ser afetado por outros fenômenos, como o fenômeno da exclusão competitiva (DE BOER; PERELSON, 1994).

O presente estudo tem limitações inerentes do método de análises *in silico* de imunoinformática, sendo necessárias análises mais aprofundadas como o acoplamento molecular e, por conseguinte, análises experimentais *in vitro* e *in vivo* para validar o estudo. Contudo, a identificação do potencial impacto das mutações no sistema imunológico através da abordagem utilizada pode direcionar futuros estudos, pois a identificação de epítipos é um pré-requisito importante para a compreensão das respostas imunes celulares, visto que mutações em regiões de epítipos são estratégias de evasão imune viral, como ocorre com o HIV-1 e citomegalovírus (BASTA; BENNINK, 2003; FISCHER et al., 2010).

Em conjunto, os resultados desse estudo demonstram que é fundamental que haja um melhor entendimento da variabilidade genética do CHIKV para o desenvolvimento de vacinas, testes de diagnóstico e medicamentos antivirais contra este vírus. O desenho de vacinas baseadas em peptídeos pode ser uma eficaz ferramenta no controle de surtos do CHIKV, no entanto, essa eficácia depende diretamente da escolha de peptídeos que abranjam epítipos imunogênicos correspondentes ao vírus circulante na população-alvo.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a cepa do CHIKV circulante em Alagoas/Brasil pertence ao genótipo ECSA e possui mutações nas proteínas do envelope, quando comparada com uma cepa ancestral. Também foi possível demonstrar que algumas das mutações detectadas estão localizadas em regiões de epítomos-alvo de linfócitos B experimentalmente validados. Adicionalmente, os diferentes métodos e as ferramentas de imunoinformática utilizadas nesse estudo indicaram que as mutações detectadas estão localizadas em potenciais regiões de epítomos e que a substituição de aminoácidos pode interferir nas propriedades físico-químicas correlacionadas à antigenicidade, em diferentes regiões da proteína.

Ainda, foi possível demonstrar que as mutações têm o potencial de impactar diferentes etapas do processamento de peptídeos gerados a partir das proteínas virais, que podem atuar como epítomos para o reconhecimento de células T.

Este estudo trouxe luz aos possíveis impactos de mutações de aminoácidos em regiões importantes para a função da proteína, contudo, devido à natureza do método utilizado, se faz necessário um estudo *in vitro* e *in vivo* para validar os resultados encontrados.

Em conjunto, os dados sinalizam a importância de considerar a sequência genômica de cepas locais para o desenvolvimento de testes diagnósticos, anticorpos ou vacinas, visto que mutações em regiões antigênicas cruciais podem interferir na detecção viral e na resposta imune específica de anticorpos a determinados epítomos.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R. et al. A novel class of chikungunya virus small molecule inhibitors that targets the viral capping machinery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 27 abr. 2020.
- ABUBAKAR, S. et al. Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 147–149, 2007.
- AGARWAL, A. et al. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. **Virology**, v. 497, n. 2, p. 59–68, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.025>>.
- AGBACK, P. et al. Structural characterization and biological function of bivalent binding of CD2AP to intrinsically disordered domain of chikungunya virus nsP3 protein. **Virology**, v. 537, p. 130–142, 1 nov. 2019.
- AHMED, R. K. S.; MAEURER, M. J. T-cell epitope mapping. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 524, p. 427–438, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19377963/>>. Acesso em: 6 dez. 2021.
- AHOLA, T.; KÄÄRIÄINEN, L. Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 2, p. 507–11, 17 jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831320>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC42770>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42770&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- AHOLA, T.; MERITS, A. Functions of Chikungunya Virus Nonstructural Proteins. In: **Chikungunya Virus**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 75–98.
- AKHRYMUK, I.; KULEMZIN, S. V.; FROLOVA, E. I. Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p.

7180–7191, 2012. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00541-12>>.

AKI, M. et al. Interferon- $\gamma$  induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. **Journal of Biochemistry**, v. 115, n. 2, p. 257–269, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8206875/>>. Acesso em: 24 fev. 2021.

AKIYAMA, K. et al. Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon- $\gamma$  for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. **FEBS Letters**, v. 343, n. 1, p. 85–88, 18 abr. 1994. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/0014-5793%2894%2980612-8>>. Acesso em: 28 out. 2021.

ALIPERTI, G.; SCHLESINGER, M. J. Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. **Virology**, v. 90, n. 2, p. 366–369, 15 out. 1978. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0042682278903215>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

ALMOND, J.; COHEN, G. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 16, n. 4, p. 433–443, 16 abr. 2002. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/2402417>>. Acesso em: 28 out. 2021.

ALTHOUSE, B. M. et al. Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1046, 13 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-018-03332-7>>.

AMBROSE, J. M. et al. Comparison of immunological profiles of sars-cov-2 variants in the covid-19 pandemic trends: An immunoinformatics approach. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066389/>>. Acesso em: 15 jun. 2021.

AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A. B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 146–150, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.014>>.

ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967–1976, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82714-0>>.

ATASSI, M. Z.; SMITH, J. A. A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. **Molecular Immunology**, v. 15, n. 8, p. 609–610, 1978.

BAPPY, S. S. et al. Extensive immunoinformatics study for the prediction of novel peptide-based epitope vaccine with docking confirmation against envelope protein of Chikungunya virus: a computational biology approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–16, 24 fev. 2020.

BASORE, K. et al. Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1725- 1737.e16, 2019.

BASTA, S.; BENNINK, J. R. A survival game of hide and seek: cytomegaloviruses and MHC class I antigen presentation pathways. **Viral immunology**, v. 16, n. 3, p. 231–242, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14583141/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

BASU, R. et al. Bacteriophage Q $\beta$  virus-like particles displaying Chikungunya virus B-cell epitopes elicit high-titer E2 protein antibodies but fail to neutralize a Thailand strain of Chikungunya virus. **Vaccine**, v. 38, n. 11, p. 2542–2550, 4 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32044164/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

BEESON, S. et al. **Chikungunya fever, Mauritius, 2006 [1]** **Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2008. .

BELTRAME, A. et al. Imported Chikungunya Infection, Italy. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 8, p. 1264–6, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953112>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

BHASIN, M. Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM. **Protein Science**, v. 13, n. 3, p. 596–607, 6 fev. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14978300/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. S. Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 13, n. 3, p. 596, 6 fev. 2004. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2286721/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14978300/)>. Acesso em: 7 out. 2021.

BJORKMAN, P. J. et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition

regions of class I histocompatibility antigens. **Nature**, v. 329, n. 6139, p. 512–518, out. 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/2443855/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of Antigen Processing. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 443–473, 21 mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/23298205/>>. Acesso em: 26 ago. 2021.

BONATTI, S. et al. Role of signal recognition particle in the membrane assembly of Sindbis viral glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 3, p. 499–502, 1984. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6723645/>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33–S40, 1 fev. 2010.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/517537>>.

BROECKEL, R. et al. Therapeutic administration of a recombinant human monoclonal antibody reduces the severity of chikungunya virus disease in rhesus macaques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, 19 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28628616/>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

BROECKEL, R. M. et al. Vaccine-induced skewing of t cell responses protects against chikungunya virus disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. OCT, 2019. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC6834551/>>. Acesso em: 6 dez. 2021.

BROWN, J. E. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution**, v. 68, n. 2, p. 514–525, 1 fev. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/evo.12281>>. Acesso em: 8 mar. 2020.

BUBLIL, E. M. et al. Stepwise prediction of conformational discontinuous B-cell epitopes using the mapitope algorithm. **Proteins: Structure, Function and**

**Genetics**, v. 68, n. 1, p. 294–304, jul. 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17427229/>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

CALIS, J. J. A. et al. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 10, p. e1003266, 24 out. 2013. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1003266>>.

Acesso em: 18 ago. 2021.

CARDONA-OSPINA, J. A.; DIAZ-QUIJANO, F. A.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Burden of chikungunya in Latin American countries: estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 38, p. 60–61, 1 set. 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971215001824>>. Acesso em: 2 jun. 2020.

CARDOZO, C.; KOHANSKI, R. A. Altered Properties of the Branched Chain Amino Acid-preferring Activity Contribute to Increased Cleavages after Branched Chain Residues by the “Immunoproteasome”. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 27, p. 16764–16770, 3 jul. 1998.

CARLETTI, F. et al. Full-Length Genome Sequence of a Chikungunya Virus Isolate from the 2017 Autochthonous Outbreak, Lazio Region, Italy. **Genome announcements**, v. 5, n. 49, 7 dez. 2017. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29217791>>. Acesso em: 19 dez. 2018.

CARRERA, J. P. et al. Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, 21 fev. 2017.

CDC. **Chikungunya Fever Diagnosed Among International Travelers --- United States, 2005--2006**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5538a2.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

CDC. **Geographic Distribution | Chikungunya virus | CDC**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso em: 12 jun. 2020.

CHAAITHANYA, I. K. et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in

Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, v. 24, n. 4, p. 265–271, 2011. Disponível em:

<<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2010.0123>>.

CHAN, Y. et al. Mutating chikungunya virus non-structural protein produces potent live-attenuated vaccine candidate. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p.

e10092, 23 jun. 2019. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emmm.201810092>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection.

**Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177–180, 1 abr. 2009.

CHARLYS DA COSTA, A. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10,

p. 1742–1744, 1 out. 2017. Disponível em:

<[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/10/17-0307\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/10/17-0307_article.htm)>. Acesso em: 8 jun. 2020.

CHAVES, T. do S. S. et al. Travelers as Sentinels for Chikungunya Fever, Brazil.

**Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 529–530, mar. 2012. Disponível em:

<[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-0838\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-0838_article.htm)>. Acesso em: 2 jun. 2020.

CHEN, K. C. et al. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African

(ECSA) lineage. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 169, 2013. Disponível em:

<<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-169>>.

CHEN, R. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General**

**Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jun. 2018. Disponível em:

<<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001072>>.

CHIRATHAWORN, C. et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 8, p. 631–634, ago.

2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23790334/>>. Acesso em: 14 jul. 2020.

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, 7 nov. 1991. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/354037a0>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

CHOTHIA, C.; BOSWELL, D. R.; LESK, A. M. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 12, p. 3745, 1988. Disponível em:

<[/pmc/articles/PMC454949/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/270411/)>. Acesso em: 29 jul. 2021.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. In: **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. [s.l.] Wiley Blackwell, 1978. 47p. 45–148.

CHOW, A. et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiq042>>.

CHRETIEN, J.-P. et al. **DROUGHT-ASSOCIATED CHIKUNGUNYA EMERGENCE ALONG COASTAL EAST AFRICA** Kenya Medical Research Institute. [s.l.: s.n.].

Disponível em: <[http://www.who.int/csr/don/2006\\_03\\_17/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2006_03_17/en/index.html)>. Acesso em: 10 jun. 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**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 29 ago. 2016. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004960>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

CHUA, C.-L. et al. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171989, 9 fev. 2017. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171989>>. Acesso em: 18 abr. 2020.

CONTEVILLE, L. C. et al. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio De Janeiro, Brazil, 2014-2015. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 347–348, 2016.

COUDERC, T. et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008a. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0040029>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

COUDERC, T. et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 8 fev. 2008b. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282093>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

COUDERC, T. et al. Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 4, p. 516–523, 15 ago. 2009.

COUDERC, T.; LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antiviral Research**, v. 121, p. 120–131, 2015.

CROSS, R. K. Identification of a unique guanine-7-methyltransferase in Semliki forest virus (SFV) infected cell extracts. **Virology**, v. 130, n. 2, p. 452–463, 30 out. 1983. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez9.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0042682283900995>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

CUNHA, M. S. et al. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1737–1739, 1 out. 2017. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/10/16-1855\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/10/16-1855_article.htm)>. Acesso em: 19 dez. 2018.

DAS, P. K. et al. Design and validation of novel chikungunya virus protease inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. AAC.01421-16, 10 out. 2016. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/60/12/7382>>. Acesso em: 14 jun. 2020.

DE ALBUQUERQUE, I. G. C. et al. Infecção pelo vírus Chikungunya: Relato do primeiro caso diagnosticado no Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128–129, jan. 2012.

DE BOER, R. J.; PERELSON, A. S. T cell repertoires and competitive exclusion. **Journal of theoretical biology**, v. 169, n. 4, p. 375–390, 1 jan. 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7967629/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

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

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8052–8056, 1988. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/282352/>. Acesso em: 2 jul. 2020.

DE SOUZA, T. M. A. et al. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 1–17, 2018.

DELANG, L. et al. The viral capping enzyme nsP1: A novel target for the inhibition of chikungunya virus infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–10, 2016.

DESAI, D. V.; KULKARNI-KALE, U. T-Cell Epitope Prediction Methods: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 1184, p. 333–364, 2014. Disponível em: [https://link-springer-com.ez9.periodicos.capes.gov.br/protocol/10.1007/978-1-4939-1115-8\\_19](https://link-springer-com.ez9.periodicos.capes.gov.br/protocol/10.1007/978-1-4939-1115-8_19). Acesso em: 6 dez. 2021.

DEY, D. et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007548, 24 jul. 2019. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007548>. Acesso em: 29 jun. 2020.

DIALLO, D. et al. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern senegal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1–14, 2012.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281–286, 1999.

DÍAZ-QUIÑONEZ, J. A. et al. Identification of Asian genotype of chikungunya virus isolated in Mexico. **Virus Genes**, v. 52, n. 1, p. 127–129, 2016.

DÍAZ, Y. et al. Chikungunya virus infection: First detection of imported and autochthonous cases in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 3, p. 482–485, 2015.

DÖNNES, P.; KOHLBACHER, O. Integrated modeling of the major events in the MHC class I antigen processing pathway. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 14, n. 8, p. 2132–2140, ago. 2005. Disponível em:

<<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/15987883/>>. Acesso em: 6 dez. 2021.

DUIJL-RICHTER, M. K. S. Van et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. p. 3647–3674, 2015.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Chikungunya Virus and the Mosquito Vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1036–1041, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0937>>.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 27 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001446>>.

ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534–541, 11 abr. 2009. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268808001167/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268808001167/type/journal_article)>. Acesso em: 14 abr. 2020.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p. 13429–13429, 12 nov. 1996. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.23.13429>>. Acesso em: 3 jun. 2020.

EGGENSPERGER, S.; TAMPÉ, R. The transporter associated with antigen processing: A key player in adaptive immunity. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 9–10, p. 1059–1072, 2015.

EGGERS, M. et al. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 6, p. 1865–1870, 1 dez. 1995. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/182/6/1865/1107437/1865.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2021.

EMBRAPA et al. **Climatologia do Estado de Alagoas**. [s.l: s.n.].

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of virology**, v. 55, n. 3, p. 836–9, set. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2991600>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

FARIA, N. R. et al. **Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015** *Plos One Currents Outbreaks*, 2016. .

FEIBELMAN, K. M. et al. Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya virus nsP1 RNA capping enzyme. **Antiviral Research**, v. 154, p. 124–131, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354217307726>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

FERNANDES, A. I. V. et al. Immunoglobulin therapy in a patient with severe chikungunya fever and vesiculobullous lesions. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUL, 2019. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/31312203/>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

FIELDS, W.; KIELIAN, M. A Key Interaction between the Alphavirus Envelope Proteins Responsible for Initial Dimer Dissociation during Fusion. **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 3774–3781, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.03310-12>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v. 5, p. 1–19, 2008.

FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 63, n. 22, p. 500–1, 6 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898168>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

FISCHER, W. et al. Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing. **PloS one**, v. 5, n. 8, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20808830/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

FONG, R. H. et al. Exposure of epitope residues on the outer face of the chikungunya virus envelope trimer determines antibody neutralizing efficacy. **Journal**

**of virology**, v. 88, n. 24, p. 14364–79, 15 dez. 2014a. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25275138>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

FONG, R. H. et al. Exposure of Epitope Residues on the Outer Face of the Chikungunya Virus Envelope Trimer Determines Antibody Neutralizing Efficacy.

**Journal of Virology**, v. 88, n. 24, p. 14364–14379, 15 dez. 2014b.

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

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553503>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

FOX, J. M. et al. Optimal therapeutic activity of monoclonal antibodies against chikungunya virus requires Fc-FcR interaction on monocytes. **Science Immunology**, v. 4, n. 32, 2019.

FOX, J. M.; DIAMOND, M. S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 11, p. 4210–4218, 2016. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1601426>>.

FOY, N. J. et al. Hypervariable Domain of Nonstructural Protein nsP3 of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Determines Cell-Specific Mode of Virus Replication.

**Journal of Virology**, v. 87, n. 13, p. 7569–7584, 1 jul. 2013.

FRIC, J. et al. Use of Human Monoclonal Antibodies to Treat Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 2, p. 319–322, 15 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/207/2/319/2192719>>.

Acesso em: 29 jul. 2020.

FROLOVA, E. I. et al. Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11679–11695, 15 nov. 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC2977861/?report=abstract>. Acesso em: 2 jul. 2020.

Disponível em: </pmc/articles/PMC2977861/?report=abstract>. Acesso em: 2 jul. 2020.

FROS, J. J. et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10877–10887, 15 out. 2010.

FROS, J. J. et al. Chikungunya Virus nsP3 Blocks Stress Granule Assembly by Recruitment of G3BP into Cytoplasmic Foci. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10873–10879, 2012.

GAEDIGK-NITSCHKO K1, DING MX, LEVY MA, S. M. Site-directed mutagenesis in the Sindbis virus 6Kprotein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virus structure. **Virology**, v. 175(1), p. 282– 91., 1990.

GALAN-HUERTA, K. A. et al. Genetic Variability of Chikungunya Virus in Southern Mexico. **Viruses**, v. 11, n. 8, p. 714, 5 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/8/714>>. Acesso em: 12 jun. 2020.

GARDNER, J. et al. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 15 ago. 2010. Disponível em: <<https://jvi-asm-org.ez9.periodicos.capes.gov.br/content/84/16/8021.short>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

GAROFF, H.; SIMONS, K.; RENKONEN, O. Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. **Virology**, v. 61, n. 2, p. 493–504, 1974. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4472532/>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

GIBBONS, D. L. et al. Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of semliki forest virus by combined electron microscopy and crystallography. **Cell**, 2003.

GIBBONS, D. L. et al. Multistep Regulation of Membrane Insertion of the Fusion Peptide of Semliki Forest Virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3312–3318, 1 abr. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15016852/>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

GÖERTZ, G. P. et al. Conserved motifs in the hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 required for transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006958, 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006958>>.

GOLDBERG, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 895–899, 18 dez. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14685250/>>. Acesso em: 5 out. 2021.

GOMEZ DE CEDRÓN, M. et al. RNA helicase activity of Semliki Forest virus

replicase protein NSP2. **FEBS Letters**, v. 448, n. 1, p. 19–22, 2 abr. 1999.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2899%2900321-X>>.

Acesso em: 21 nov. 2018.

GOTTIPATI, K.; WOODSON, M.; CHOI, K. H. Membrane binding and rearrangement by chikungunya virus capping enzyme nsP1. **Virology**, v. 544, p. 31–41, 1 maio 2020.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011a.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011b.

GRATZ, N. G. Critical review of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 215–227, 2004.

GROETTRUP, M. et al. A third interferon- $\gamma$ -induced subunit exchange in the 20S proteasome. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 4, p. 863–869, abr. 1996.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8625980/>>. Acesso em: 28 out. 2021.

HAHN, C. S.; STRAUSS, J. H. Site-directed mutagenesis of the proposed catalytic amino acids of the Sindbis virus capsid protein autoprotease. **Journal of virology**, v. 64, n. 6, p. 3069–73, 1 jun. 1990. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2335827>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

HAHN, Y. S. et al. Mapping of RNA-temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: complementation group F mutants have lesions in nsP4. **Journal of virology**, v. 63, n. 3, p. 1194–1202, 1989.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Oxford University Press**, n. 41, 1999.

Disponível em: <<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 18, n. 6, p. 997–1021,



1969.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science (New York, N.Y.)**, v. 131, n. 3407, p. 1102–3, 15 abr. 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343>>. Acesso em: 8 out. 2018.

HAPUARACHCHI, H. C. et al. Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: Virological evidence from Sri Lanka and Singapore. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 4, p. 1067–1076, 2010a.

HAPUARACHCHI, H. C. et al. Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: virological evidence from Sri Lanka and Singapore. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 4, p. 1067–1076, abr. 2010b.

HASAN, M. A. et al. A comprehensive immunoinformatics and target site study revealed the corner-stone toward Chikungunya virus treatment. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 1, p. 189–204, 1 maio 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7172456/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)>. Acesso em: 28 jan. 2021.

HASTE ANDERSEN, P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2558–2567, 1 nov. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.062405906>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

HAWMAN, D. W. et al. Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13878–13888, 15 dez. 2013. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02666-13>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

HAWMAN, D. W. et al. Pathogenic Chikungunya Virus Evades B Cell Responses to Establish Persistence. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1326–1338, 2 ago. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5003573/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/)>. Acesso em: 29 jul. 2020.

HAWMAN, D. W. et al. Mutations in the E2 Glycoprotein and the 3' Untranslated Region Enhance Chikungunya Virus Virulence in Mice. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, p. JVI.00816-17, 2017. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00816-17>>.

HEEMELS, M. T.; PLOEGH, H. L. Substrate specificity of allelic variants of the TAP peptide transporter. **Immunity**, v. 1, n. 9, p. 775–784, 1 dez. 1994.

HELENIUS, A. et al. **ON THE ENTRY OF SEMLIKI FOREST VIRUS INTO BHK-21 CELLS**. [s.l.: s.n.].

HER, Z. et al. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 1, p. 24–41, jan. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emmm.201404459>>.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231–240, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2014.1745>>.

HIROKI, C. H. et al. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 31 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32082301/>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

HOARAU, J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0900255>>.

HOLLAND CHENG, R. et al. Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. **Cell**, v. 80, n. 4, p. 621–630, 24 fev. 1995.

HONG, E. M.; PERERA, R.; KUHN, R. J. Alphavirus Capsid Protein Helix I Controls a Checkpoint in Nucleocapsid Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 8848–8855, 15 set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553612>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6 I, p. 3824–3828, 1 jun. 1981. Disponível em: <<https://www-pnas.ez9.periodicos.capes.gov.br/content/78/6/3824>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

HOPP, T. P.; WOODS, K. R. A computer program for predicting protein antigenic determinants. **Molecular Immunology**, v. 20, n. 4, p. 483–489, 1983. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/6191210/>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

HORTON, R. et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project. **Immunogenetics**, v. 60, n. 1, p. 1–18, 10 jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18193213/>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

HORWOOD, P. F. et al. Outbreak of Chikungunya virus infection, Vaimo, Papua New Guinea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 1535–1538, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965757>>. Acesso em: 9 mar. 2020.

HUANG, L.; DAI, Y. Direct prediction of T-cell epitopes using support vector machines with novel sequence encoding schemes. **Journal of bioinformatics and computational biology**, v. 4, n. 1, p. 93–107, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16568544/>>. Acesso em: 7 dez. 2021.

HUBER, E. M. et al. Immuno- and Constitutive Proteasome Crystal Structures Reveal Differences in Substrate and Inhibitor Specificity. **Cell**, v. 148, n. 4, p. 727–738, 17 fev. 2012.

HUITS, R. et al. Diagnostic accuracy of a rapid E1-antigen test for chikungunya virus infection in a reference setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 1, p. 78–81, 2018.

IBGE. Censo Demográfico 2010. Características da População e dos Domicílios. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 48, 2010.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 3 jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28472356/>>. Acesso em: 1 set. 2020.

JIANG, P. et al. Hepatitis B virus core antigen as a carrier for Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitope peptide enhances protection against genital chlamydial infection. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43281–43292, 2015. Disponível em:

</pmc/articles/PMC4791232/?report=abstract>. Acesso em: 10 ago. 2020.

JIANG, P. et al. Evaluation of tandem Chlamydia trachomatis MOMP multi-epitopes vaccine in BALB/c mice model. **Vaccine**, v. 35, n. 23, p. 3096–3103, 25 maio 2017.

JIN, J. et al. Neutralizing Antibodies Inhibit Chikungunya Virus Budding at the Plasma Membrane. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 417- 428.e5, 12 set. 2018a.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30146390/>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

JIN, J. et al. Neutralizing Antibodies Inhibit Chikungunya Virus Budding at the Plasma Membrane. **Cell Host and Microbe**, v. 24, n. 3, p. 417- 428.e5, 12 set. 2018b.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30146390>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

JIN, J.; SIMMONS, G. **Antiviral functions of monoclonal antibodies against chikungunya virus** *Viruses* MDPI AG, , 1 abr. 2019. .

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 12, p. 1994–5, dez. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17354339>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

KAM, Y.-W. et al. Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 13005–13015, 1 dez. 2012.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015702>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

KAM, Y.-W. et al. Unique Epitopes Recognized by Antibodies Induced in Chikungunya Virus-Infected Non-Human Primates: Implications for the Study of Immunopathology and Vaccine Development. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95647, 22 abr. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3995782/?report=abstract>. Acesso em: 17 set. 2020.

KAO, D. J.; HODGES, R. S. Advantages of a Synthetic Peptide Immunogen Over a Protein Immunogen in the Development of an Anti-Pilus Vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 1, p. 33–42, jul. 2009.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1747-0285.2009.00825.x>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

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, 2011.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 4, p. 212–213, abr. 1985. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01195768>>.

Acesso em: 26 ago. 2020.

KARTTUNEN, J. T.; TROWSDALE, J.; LEHNER, P. J. Antigen presentation: TAP dances with ATP. **Current Biology**, v. 9, n. 21, p. R820–R824, 4 nov. 1999.

KELVIN, A. A. et al. Inflammatory cytokine expression is associated with Chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, ago. 2011. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21858242/>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

KEŞMİR, C. et al. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 15, n. 4, p. 287–296, 1 abr. 2002.

Disponível em: <[https://academic.oup.com/peds/article-](https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/15.4.287)

[lookup/doi/10.1093/protein/15.4.287](https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/15.4.287)>. Acesso em: 1 mar. 2021.

KETKAR, H.; HERMAN, D.; WANG, P. Genetic determinants of the re-emergence of arboviral diseases. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 150, 12 fev. 2019. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30759739>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p.

3075–3084, 1 dez. 2002. Disponível em:

<<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-83-12-3075>>.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, jun. 1980.

KISSELEV, A. F. et al. The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3363–3371, 5 fev. 1999. Disponível em:

<<http://www.jbc.org/article/S0021925819879553/fulltext>>. Acesso em: 11 ago. 2021.

KISSELEV, A. F.; AKOPIAN, T. N.; GOLDBERG, A. L. Range of Sizes of Peptide Products Generated during Degradation of Different Proteins by Archaeal Proteasomes \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 1982–1989, 23 jan. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925819841479/fulltext>>. Acesso em: 6 out. 2021.

KNUDSEN, A. B.; ROMI, R.; MAJORI, G. Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus*, with implications for its introduction into other parts of Europe. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 12, n. 2 Pt 1, p. 177–83, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827590>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

KOLASKAR, A. S.; KULKARNI-KALE, U. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 31–42, 15 ago. 1999.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS letters**, v. 276, n. 1–2, p. 172–4, 10 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702393>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

KOVACIKOVA, K. et al. 6'- $\beta$ -fluoro-homoaristeromycin and 6'-fluoro-homoneplanocin A are potent inhibitors of Chikungunya virus replication through their direct effect on viral nonstructural protein 1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, 2020.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 30 jun. 2015. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/08347>>.

KRINGELUM, J. V. et al. Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, p. e1002829, 27 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300419>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

KULARATNE, S. A. M. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and long-term outcomes of a major outbreak of Chikungunya in a Hamlet in Sri Lanka, in 2007: A longitudinal cohort study. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. October 2006,

2012.

KULKARNI-KALE, U.; BHOSLE, S.; KOLASKAR, A. S. CEP: A conformational epitope prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. W168–W171, 1 jul. 2005. Disponível em: <[https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl\\_2/W168/2505653](https://academic.oup.com/nar/article/33/suppl_2/W168/2505653)>. Acesso em: 2 set. 2020.

KUMAR, C. V. M. N.; GOPAL, D. V. R. S. **Reemergence of chikungunya virus in Indian subcontinent***Indian Journal of Virology* Springer, , jun. 2010. .

KUMAR, C. V. M. N.; SIVAPRASAD, Y.; GOPAL, D. V. R. S. A. I. Genetic diversity of 2006 – 2009 Chikungunya virus outbreaks in Andhra Pradesh , India , reveals complete absence of E1 : A226V mutation. p. 114–117, 2016.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1945–1948, 1 ago. 2008. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.83628-0>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 3, p. 894–906, 1 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179353>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

LAM, S. K. et al. Chikungunya infection- An emerging disease in Malaysia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, n. 3, p. 447–451, 2001.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.

LANGSJOEN, R. M. et al. Molecular Virologic and Clinical Characteristics of a Chikungunya Fever Outbreak in La Romana, Dominican Republic, 2014. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2016.

LANKAT-BUTTGEREIT, B.; TAMPÉ, R. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. **FEBS Letters**, v. 464, n. 3, p. 108–112, 31

dez. 1999. Disponível em: <[https://pubmed.ncbi.nlm-](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/10618487/)

[nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/10618487/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/10618487/)>. Acesso em: 12 ago. 2021.

LARAS, K. et al. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 2, p. 128–141, 1 fev. 2005. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/j.trstmh.2004.03.013>>.

Acesso em: 31 mar. 2020.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006. Disponível em:

<[/pmc/articles/PMC1479323/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1479323/)>. Acesso em: 1 set. 2020.

LASTARZA, M. W.; LEMM, J. A.; RICE, C. M. Genetic analysis of the nsP3 region of Sindbis virus: evidence for roles in minus-strand and subgenomic RNA synthesis.

**Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5781–5791, 1994.

LEE, C. Y. et al. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002390, 1 dez. 2011. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002390>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

LEHNERT, E. et al. Antigenic Peptide Recognition on the Human ABC Transporter TAP Resolved by DNP-Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 42, p. 13967–13974, 26 out. 2016.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27659210/>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006\*. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, set. 2008. Disponível em: <[http://journals.lww.com/00003246-](http://journals.lww.com/00003246-200809000-00008)

[200809000-00008](http://journals.lww.com/00003246-200809000-00008)>. Acesso em: 14 abr. 2020.

LEMM, J. A. et al. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 12, p. 2925–2934, 1 jun. 1994.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06587.x>>. Acesso em: 26 nov. 2018.



LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LESCAR, J. et al. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 137–48, 6 abr. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301009>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, fev. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>>.

LEVITT, M.; LEVITT, M. Conformational Preferences of Amino Acids in Globular Proteins. **Biochemistry**, v. 17, n. 20, p. 4277–4285, 1978. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/708713/>>. Acesso em: 1 set. 2020.

LI, L. et al. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 705–708, 1 dez. 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nature09546>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

LI, Q. et al. The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1284- 1294.e9, 3 set. 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32730807/>>. Acesso em: 15 jun. 2021.

LI, X.-F. et al. Complete Genome Sequence of a Chikungunya Virus Isolated in Guangdong, China. **Journal of Virology**, v. 86, n. 16, p. 8904–8905, 15 ago. 2012.

LIANG, S. et al. EPSVR and EPMeta: Prediction of antigenic epitopes using support vector regression and multiple server results. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 381, 16 jul. 2010. Disponível em:

<<http://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-381>>.

Acesso em: 2 set. 2020.

LILJESTRÖM, P.; GAROFF, H. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. **Journal of virology**, v. 65, n. 1, p. 147–54, 1 jan. 1991. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1985194>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

LINDH, E. et al. The Italian 2017 Outbreak Chikungunya Virus Belongs to an

Emerging *Aedes albopictus* –Adapted Virus Cluster Introduced From the Indian Subcontinent. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofy321/5239584>>.

LINGER, B. R. et al. Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. **RNA**, v. 10, n. 1, p. 128–138, jan. 2004.

LOBIGS, M.; ZHAO, H. X.; GAROFF, H. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. **Journal of virology**, v. 64, n. 9, p. 4346–55, 1 set. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200886>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

LOEWY, A. et al. The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. **Journal of virology**, v. 69, n. 1, 1 jan. 1995. Disponível em: <[pmc/articles/PMC188595/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/188595/)>. Acesso em: 18 fev. 2019.

LOHACHANAKUL, J. et al. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 2, p. 134–138, 2012.

LONG, F. et al. Cryo-EM structures elucidate neutralizing mechanisms of anti-chikungunya human monoclonal antibodies with therapeutic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 45, p. 13898–13903, 10 nov. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26504196/>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

LONG, K. M.; HEISE, M. T. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 1, p. 13–21, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40475-015-0037-z>>.

LOPEZ, S. et al. Nucleocapsid-glycoprotein interactions required for assembly of alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 68, n. 3, p. 1316–1323, 1994.

LORENTE, E. et al. Complex antigen presentation pathway for an HLA-A\*0201-restricted epitope from Chikungunya 6K protein. **PLoS Neglected Tropical**

**Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–21, 2017.

LUCAS-HOURANI, M. et al. A phenotypic assay to identify chikungunya virus inhibitors targeting the nonstructural protein nsP2. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 2, p. 172–179, fev. 2013.

LUM, F.-M. et al. An Essential Role of Antibodies in the Control of Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6295–6302, 15 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670192>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

LUM, F.-M. et al. Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1860, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-20305-4>>.

LUM, F.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **ANTIVIRAL RESEARCH**, v. 120, p. 165–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>>.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in southern province, Taganyika territory, in 1952-1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

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

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: Bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 91–98, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.004>>.

MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, 6 nov. 2017.

MAHA, M. S. et al. **Chikungunya virus mutation, Indonesia, 2011** *Emerging Infectious Diseases* Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2015. .

MANCINI, E. J. et al. Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. **Molecular Cell**, v. 5, n. 2, p. 255–266, 2000.

MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, p. 421–437, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2017.05.0062255-5021/>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

MASRINOUL, P. et al. Monoclonal antibody targeting chikungunya virus envelope 1 protein inhibits virus release. **Virology**, v. 464–465, n. 1, p. 111–117, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.038>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

MAVALANKAR, D. et al. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 412–415, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18325255>>. Acesso em: 13 jan. 2019.

MCCARTHY, M. K.; WEINBERG, J. B. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, 2015. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC4310299/>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

MELAN, A. et al. Molecular characterization of chikungunya virus causing the 2017 outbreak in Dhaka, Bangladesh. **New Microbes and New Infections**, v. 24, p. 14–16, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.03.007>>.

MELANCONT, P.; GAROFF, H. **Processing of the Semliki Forest Virus Structural Polyprotein: Role of the Capsid Protease** **JOURNAL OF VIROLOGY**. [s.l.: s.n.].

MELTON, J. V. et al. Alphavirus 6K proteins form ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923–46931, 6 dez. 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/277/49/46923.full>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Function of Chikungunya Virus Structural Proteins. In: OKEOMA, C. M. (Ed.). **Chikungunya Virus**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 63–74.

MIGLIORINI, F. et al. Association between HLA genotypes and COVID-19 susceptibility, severity and progression: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 26, n. 1, p. 84, 3 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/34344463/>>. Acesso

em: 27 out. 2021.

MINER, J. J. et al. Brief report: Chikungunya viral arthritis in the United States: A mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 67, n. 5, p. 1214–1220, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/25605621/>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017**. [s.l.: s.n.].

MOMBURG, F. et al. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 5, p. 1613, 1 maio 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10111496/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MOORE, D. L. et al. An epidemic of chikungunya fever at Ibadan, Nigeria, 1969. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 59–68, 1974.

MORO, M. L. et al. Chikungunya virus in North-Eastern Italy: A seroprevalence survey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 508–511, mar. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20207883/>>. Acesso em: 12 jul. 2020.

MORRISON, T. E. et al. A Mouse Model of Chikungunya Virus–Induced Musculoskeletal Inflammatory Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 32–40, jan. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010000647>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

MUDURANGAPLAR, B.; PEERAPUR, B. V. Molecular characterisation of clinical isolates of chikungunya virus: A study from tertiary care hospitals in Southern India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. DC14–DC17, 2016.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. **Structure (London, England : 1993)**, v. 14, n. 1, p. 63–73, jan. 2006a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407066>>. Acesso em: 7 nov. 2018.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 63–73, jan. 2006b.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8th. ed. São Paulo: Artmed, 2014.

MYERS, R. M. et al. The 1964 epidemic of dengue-like fever in South India: isolation of chikungunya virus from human sera and from mosquitoes. **The Indian journal of medical research**, v. 53, n. 8, p. 694–701, ago. 1965.

NAGAR, P. K. et al. Mapping and Immunological Response of Immunodominant B and T cell Epitopes of E2 Glycoprotein of Chikungunya Virus. **MOJ Immunology**, v. 4, n. 2, p. 1–10, 5 out. 2016. Disponível em: <<http://medcraveonline.com/MOJI/MOJI-04-00117.php>>.

NARDIN, A. et al. Use of Human Monoclonal Antibodies to Treat Chikungunya Virus Infection. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-abstract/207/2/319/2192719>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

NAYAK, K. et al. Antibody response patterns in chikungunya febrile phase predict protection versus progression to chronic arthritis. **JCI Insight**, v. 5, n. 7, 9 abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3205261/>?report=abstract>. Acesso em: 17 jul. 2020.

NEEFJES, J.; OVAA, H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 12, p. 769–775, 14 dez. 2013. Disponível em: <<https://www-nature.ez9.periodicos.capes.gov.br/articles/nchembio.1391>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

NEOGI, D. K. et al. Serosurvey of chikungunya antibody in Calcutta metropolis. **The Journal of communicable diseases**, v. 27, n. 1, p. 19–22, 1995.

NEUVONEN, M. et al. SH3 domain-mediated recruitment of host cell amphiphysins by alphavirus nsp3 promotes viral RNA replication. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, 2011.

NG, L. C. et al. Entomologic and virologic investigation of chikungunya, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1243–1249, 2009a.

NG, L. F. P. et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity.

**PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2009b.

NIEDERMANN, G. et al. The specificity of proteasomes: impact on MHC class I processing and presentation of antigens. **Immunological Reviews**, v. 172, n. 1, p. 29–48, dez. 1999. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01354.x>>.

NIELSEN, M. et al. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. **Immunogenetics**, v. 57, n. 1–2, p. 33–41, 3 abr. 2005. Disponível em: <[www.cbs.dtu.dk/services/NetChop-3.0](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop-3.0)>. Acesso em: 1 mar. 2021.

NIELSEN, M.; ANDREATTA, M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 33, 30 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27029192/>>. Acesso em: 8 abr. 2021.

NIJENHUIS, M. et al. Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 6, 1996.

NITATPATTANA, N. et al. Long-term persistence of Chikungunya virus neutralizing antibodies in human populations of North Eastern Thailand. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 183, 21 out. 2014. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-11-183>>. Acesso em: 18 abr. 2020.

NJENGA, M. K. et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2754–2760, 2008.

NORET, M. et al. Interleukin 6, RANKL, and Osteoprotegerin Expression by Chikungunya Virus-Infected Human Osteoblasts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 3, p. 455–457, ago. 2012.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015. Disponível em: <????>. Acesso em: 10 jun. 2020.

NVBDCP. **Status report on Dengue and Chikungunya as on 31.12.09. Dengue**

**and Chikungunya virus update 2010.** [s.l: s.n.]. Disponível em:

<[http://nvbdcp.gov.in/Doc/Den\\_Chik\\_Dec09.pdf](http://nvbdcp.gov.in/Doc/Den_Chik_Dec09.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2020.

OKABAYASHI, T. et al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 382–388, 2015.

OMAR, A.; KOBLET, H. Semliki forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. **Virology**, v. 166, n. 1, p. 17–23, 1 set. 1988. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez9.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/0042682288901419>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

OSSENDORP, F. et al. A Single Residue Exchange Within a Viral CTL Epitope Alters Proteasome-Mediated Degradation Resulting in Lack of Antigen Presentation. **Immunity**, v. 5, n. 2, p. 115–124, ago. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8769475/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

OSTERRIETH, P.; BLANES-RIDAURA, G. [Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. I. Isolation of the virus in upper Uele]. **Annales de la Societe belge de medecine tropicale (1920)**, v. 40, p. 199–203, 29 fev. 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14429303>>. Acesso em: 29 fev. 2020.

OU, J. H. et al. The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, n. 1, p. 1–15, 25 jul. 1983.

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, 1 maio 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627749>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

OZDEN, S. et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e527, 2007. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0000527>>.

PADBIDRI, V. S.; GNANESWAR, T. T. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 23, n. 4, p. 445–51, 1979. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L10>>



054657>. Acesso em: 1 mar. 2020.

PAIXÃO, E. S. et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.iedb.org/reference/1027456>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

PAL, P. et al. Development of a Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, 18 abr. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003312>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

PANNING, M. et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 416–422, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18325256/>>. Acesso em: 12 jul. 2020.

PARKER, J. M.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–32, 23 set. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430611>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

PARKER, M. D. et al. Antibody to the E3 Glycoprotein Protects Mice against Lethal Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 24, p. 12683–12690, 15 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926570>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

PAROLA, P. et al. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.

PASTORINO, B. et al. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in Democratic Republic of the Congo: Identification of a new central African strain. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 2, p. 277–282, 2004.

PASTULA, D. M. et al. Chikungunya virus disease outbreak in Yap State, Federated States of Micronesia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2017.

PATERSON, H. E.; MCINTOSH, B. M. Further Studies on the Chikungunya Outbreak

in Southern Rhodesia in 1962. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 52–55, 17 mar. 1964. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1964.11686214>>. Acesso em: 8 out. 2018.

PATRONOV, A.; DOYTCHINOVA, I. T-cell epitope vaccine design by

immunoinformatics. **Open Biology**, v. 3, n. JAN, 2012. Disponível em:

<<https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsob.120139>>. Acesso em: 7 dez. 2021.

PAVRI, K. **Disappearance of chikungunya virus from india and South East**

**Asia Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1986.

. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3026069>>. Acesso em: 1 abr. 2020.

PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Predicting

location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. **Methods in**

**Enzymology**, v. 203, n. C, p. 176–201, 1 jan. 1991. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/1722270/>>. Acesso em: 29 ago. 2020.

PELLEQUER, J. L.; WESTHOF, E.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins.

**Immunology Letters**, v. 36, n. 1, p. 83–99, 1993. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/7688347/>>. Acesso em: 26 ago. 2020.

PERERA, R. et al. Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil

$\alpha$ -Helix Important for Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 1–10, 1 jan.

2001. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/75/1/1>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

PHUKLIA, W. et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and

monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Research**, v. 177, n. 2, p. 179–188, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.08.011>>.

PIERRO, D. J.; POWERS, E. L.; OLSON, K. E. Genetic determinants of Sindbis virus strain TR339 affecting midgut infection in the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of**

**General Virology**, v. 88, n. 5, p. 1545–1554, 1 maio 2007. Disponível em:

<<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.82577-0>>.

Acesso em: 17 jan. 2019.

PORTA, J. et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–1177, 2015.

PORTA, J. et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–77, 2016a. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537684>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

PORTA, J. et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–1177, 1 fev. 2016b. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/26537684/>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

PORTA, J. et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–1177, 1 fev. 2016c. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/26537684/>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

POURIAYEVALI, M. H. et al. Imported cases of Chikungunya virus in Iran. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1004, 27 dez. 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3582078/>>. Acesso em: 16 set. 2020.

POWERS, A. M. N. N. M. et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.

PRIYA, R.; PATRO, I. K.; PARIDA, M. M. TLR3 mediated innate immune response in mice brain following infection with Chikungunya virus. **Virus Research**, v. 189, p. 194–205, 30 ago. 2014.

PUIPROM, O. et al. Characterization of chikungunya virus infection of a human keratinocyte cell line: Role of mosquito salivary gland protein in suppressing the host immune response. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 210–215, 1 jul. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134813001445>>. Acesso em: 5

jun. 2021.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 2–3, jan. 2008.

RAMMENSEE, H. G.; FALK, K.; RÖTZSCHKE, O. Peptides Naturally Presented by MHC Class I Molecules. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 213–244, abr. 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/8476560/>>. Acesso em: 13 set. 2021.

RAO, T. Recent epidemics caused by Chikungunya virus in India, 1963–1965. **Scientific culture**, v. 32, p. 215, 1966.

RAOUFI, E. et al. **Epitope Prediction by Novel Immunoinformatics Approach: A State-of-the-art Review** *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* Springer, , 1 jun. 2020. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10989-019-09918-z>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

RATHORE, A. P. S.; NG, M. L.; VASUDEVAN, S. G. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2?? phosphorylation. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–15, 2013.

RATSITORAHINA, M. et al. Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1135–1137, jul. 2008.

RAYNES, R.; POMATTO, L. C. D.; DAVIES, K. J. A. Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways. **Molecular aspects of medicine**, v. 50, p. 41, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27067006/>>. Acesso em: 3 ago. 2021.

REINHERZ, E. L. The structure of a T-cell mechanosensor. **Nature**, v. 573, n. 7775, p. 502–504, 26 set. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/d41586-019-02646-w>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

REITER, P.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C. Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 463–464, 2006.

REITER, P.; SPRENGER, D. The used tire trade: a mechanism for the worldwide

dispersal of container breeding mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 3, n. 3, p. 494–501, 1987.

RELLER, M. E. et al. Chikungunya as a cause of acute febrile illness in southern Sri Lanka. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2 dez. 2013.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W449–W454, 2 jul. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/48/W1/W449/5837056>>. Acesso em: 29 set. 2021.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 1 dez. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673607617796>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

RIANTHAVORN, P. et al. An outbreak of chikungunya in Southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. SUPPL. 3, p. e161–e165, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2010.01.001>>.

RICE, C. M.; STRAUSS, J. H. Association of Sindbis virion glycoproteins and their precursors. **Journal of Molecular Biology**, v. 154, n. 2, p. 325–348, jan. 1982. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283682900675>>.

ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. In: **Advances in Immunology**. [s.l: s.n.]17p. 739–779.

RODAS, J. D. et al. Genetic characterization of northwestern Colombian chikungunya virus strains from the 2014-2015 epidemic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 639–646, 2016.

RODGER, L. M. An outbreak of suspected Chikungunya fever in Northern Rhodesia. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 35, p. 126–8, 18 fev. 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13742532>>. Acesso em: 29 fev. 2020.

- RODRIGUES, F. M. et al. Etiology of the 1965 epidemic of febrile illness in Nagpur city, Maharashtra State, India. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 2, p. 173–179, 1972.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 15 jun. 1956. Disponível em: <[http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0022172400044442](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022172400044442)>.
- RUBACH, J. K. et al. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 201–208, 5 fev. 2009. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez9.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S004268220800696X>>. Acesso em: 20 fev. 2019.
- RUDD, P. A. et al. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against Chikungunya Virus Hemorrhagic Fever and Shock. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 9888–9898, 2012. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00956-12>>.
- RUDOLPH, K. E. et al. **Review article: Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review** **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** American Society of Tropical Medicine and Hygiene, , 2014. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24781112/>>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015.
- SAM, I. C. et al. Chikungunya virus of Asian and Central/East African genotypes in Malaysia. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 2, p. 180–183, 2009.
- SANCHEZ-TRINCADO, J. L.; GOMEZ-PEROSANZ, M.; RECHE, P. A. **Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction** **Journal of Immunology Research** Hindawi Limited, , 2017. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/>>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- SANTHOSH, S. R. et al. Comparative full genome analysis revealed E1: A226V shift in 2007 Indian Chikungunya virus isolates. **Virus Research**, v. 135, n. 1, p. 36–41, 1 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384900>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

SARANGAN, G. et al. Genetic characterization of Chikungunya virus 2009 isolates from South India. **Bioinformatics**, v. 14, n. 03, p. 106–112, 2018. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.net/014/97320630014106.htm>>.

SARKAR, J. K. et al. Chikungunya Virus Infection with Haemorrhagic Manifestations. **Indian Journal of Medical Research**, v. 53, n. 10, p. 921–5, 1965.

SASAYAMA, M. et al. Chikungunya virus was isolated in Thailand, 2010. **Virus Genes**, v. 49, n. 3, p. 485–489, 2014.

SCHILTE, C. et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 429–442, 15 fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123960/>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 23 maio 2006. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0030263>>.

SCOTT, S. S. de O. et al. Immunoglobulin-responsive chikungunya encephalitis: two case reports. **Journal of NeuroVirology**, v. 23, n. 4, p. 625–631, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28577289/>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. OCT, p. 302, 8 out. 2013. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 30 jul. 2020.

SELVARAJAH, S. et al. A Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting the Acid-Sensitive Region in Chikungunya Virus E2 Protects from Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2423, 2013a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069479>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

SELVARAJAH, S. et al. A Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting the Acid-Sensitive Region in Chikungunya Virus E2 Protects from Disease. v. 7, n. 9, 2013b.

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**, v. 76, n. 6, p. 1189–1193, jun. 2007.

SHAH, K. V.; GIBBS, C. J.; BANERJEE, G. VIROLOGICAL INVESTIGATION OF THE EPIDEMIC OF HAEMORRHAGIC FEVER IN CALCUTTA: ISOLATION OF THREE STRAINS OF CHIKUNGUNYA VIRUS. **The Indian journal of medical research**, v. 52, p. 676–83, jul. 1964. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14195507>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

SHEN, X. et al. Novel immunodominant epitopes derived from MAGE-A3 and its significance in serological diagnosis of gastric cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 139, n. 9, p. 1529–1538, 11 set. 2013. Disponível em:

<<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

SHEY, R. A. et al. In-silico design of a multi-epitope vaccine candidate against onchocerciasis and related filarial diseases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40833-x>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

SHIN, G. et al. Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 41, p. 16534–16539, 2012. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1210418109>>.

SHIRAKO, Y.; STRAUSS, J. H. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. **Journal of virology**, v. 68, n. 3, p. 1874–85, 1994. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

SHRINET, J. et al. Genetic characterization of Chikungunya virus from New Delhi reveal emergence of a new molecular signature in Indian isolates. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 100, 2012. Disponível em:

<<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-100>>.

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

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18309379>>.



SILVA, L. R. et al. Targeting Chikungunya Virus Entry: alternatives for new inhibitors in drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, 23 jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34165405/>>. Acesso em: 27 out. 2021.

SIMIZU, B. et al. Structural proteins of Chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 51, n. 1, p. 254–8, 1984. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6726893](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6726893)>.

SIMON, F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, jul. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>>.

SINGH, I.; HELENIUS, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. **Journal of Virology**, v. 66, n. 12, p. 7049–7058, 1992. Disponível em: <</pmc/articles/PMC240368/?report=abstract>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

SJOBERG, M.; GAROFF, H. Interactions between the Transmembrane Segments of the Alphavirus E1 and E2 Proteins Play a Role in Virus Budding and Fusion. **Journal of Virology**, v. 77, n. 6, p. 3441–3450, 2003. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.6.3441-3450.2003>>.

SMITH, S. A. et al. Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 1, p. 86–95, 8 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26159721/>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

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

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

SNYDER, J. E. et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8511–8523, 1 ago. 2013. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/87/15/8511>>. Acesso em: 27 jun. 2020.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>>.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

SRIVASTAVA, P. et al. Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? . 28 abr. 2020, p. 695.

STAIKOWSKY, F. et al. Prospective study of chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-2006 outbreak. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

STOLTZE, L. et al. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. **Nature Immunology**, v. 1, n. 5, p. 413–418, 2000. Disponível em: <<http://immunol.nature.com>>. Acesso em: 24 fev. 2021.

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

SUMATHY, K.; ELLA, K. M. Genetic diversity of chikungunya virus, India 2006-2010: Evolutionary dynamics and serotype analyses. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 3, p. 462–470, 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23187>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

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

TAKKINEN, K.; PERANEN, J.; KAARIANEN, L. Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 7, p. 1627–1633, 1 jul. 1991. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-72-7-1627>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

TAN, K. K. et al. Independent Emergence of the Cosmopolitan Asian Chikungunya Virus, Philippines 2012. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 23 jul. 2015.

TANABE, E. L. de L. et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. **Revista do Instituto**

**de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. 0, p. 2016–2019, 2018a. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652018005000603&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652018005000603&lng=en&tlng=en)>.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. October, p. 1–15, 2018b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.030>>.

TANABE, I. S. B. et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 730–733, 2019.

TARAPHDAR, D.; CHATTERJEE, S. Molecular characterization of chikungunya virus circulating in urban and rural areas of West Bengal, India after its re-emergence in 2006. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 3, p. 197–202, 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1093/trstmh/tru166>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906–908, 2015.

TENG, T. S. et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

TENZER, S. et al. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. **Nature Immunology**, v. 10, n. 6, p. 636–646, 3 maio 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.1728>>. Acesso em: 17 mar. 2021.

TEO, T.-H. et al. A Pathogenic Role for CD4 + T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 259–269, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23209328/>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

TERASAKI, P. I. A brief history of HLA. **Immunologic research**, v. 38, n. 1–3, p. 139–148, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17917021/>>. Acesso em: 6 dez. 2021.

THAIKUREA, L. et al. Chikungunya in Thailand : A re- emerging disease ?

**Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 28, n. 2, p. 359–364, 1997.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, 2013.

THIRUVENGADAM, K. V; KALYANASUNDARAM, V.; RAJGOPAL, J. Clinical and pathological studies on chikungunya fever in Madras city. **The Indian journal of medical research**, v. 53, n. 8, p. 729–44, ago. 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5830407>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

THONNON, J. et al. [Chikungunya virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997]. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 92, n. 2, p. 79–82, maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399593>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

TOMAR, N.; DE, R. K. **Immunoinformatics: An integrated scenario** **Immunology** Wiley-Blackwell, , out. 2010. . Disponível em: <<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2967261/>?report=abstract>. Acesso em: 13 ago. 2020.

TOMAR, S. et al. Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 9962–9969, 15 out. 2006.

TOMAR, S.; AGGARWAL, M. Structure and function of alphavirus proteases. In: **Viral Proteases and Their Inhibitors**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 105–135.

TORRES, J. R. et al. Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. **IDCases**, v. 2, n. 1, p. 6–10, 2015.

TOSELAND, C. P. et al. AntiJen: a quantitative immunology database integrating functional, thermodynamic, kinetic, biophysical, and cellular data. **Immunome research**, v. 1, n. 1, p. 4, 6 out. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16305757/>>. Acesso em: 6 dez. 2021.

TOURNEBIZE, P.; CHARLIN, C.; LAGRANGE, M. Manifestations neurologiques du chikungunya : à propos de 23 cas colligés à la Réunion. **Revue Neurologique**, v.

165, n. 1, p. 48–51, 4 jan. 2009. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0035378708004529>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

TOUSSAINT, N. C. et al. Universal peptide vaccines - Optimal peptide vaccine design based on viral sequence conservation. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8745–8753, 3 nov. 2011.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of Chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. Aegypti* mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6835, 31 ago. 2009. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006835>>.

TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4084, 16 set. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5084>>.

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, 2011.

TUEKPRAKHON, A. et al. Variation at position 350 in the Chikungunya virus 6K-E1 protein determines the sensitivity of detection in a rapid E1-antigen test. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1094, 18 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-19174-8>>.

UCHIME, O.; FIELDS, W.; KIELIAN, M. The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. **Journal of virology**, v. 87, n. 18, p. 10255–62, 15 set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864626>>. Acesso em: 24 nov. 2018.

UEBEL, S. et al. Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 17, p. 8976–8981, 19 ago. 1997. Disponível em:

<<https://www.pnas.org/content/94/17/8976>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

UEBEL, S.; TAMPÉ, R. Specificity of the proteasome and the TAP transporter.

**Current Opinion in Immunology**, v. 11, n. 2, p. 203–208, 1 abr. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095279159980034X>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

VAN AALST, M. et al. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8–22, jan. 2017. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893917300042>>.

VAN DEN EYNDE, B. J.; MOREL, S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 2, p. 147–153, 1 abr. 2001. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11228406/>>. Acesso em: 28 out. 2021.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. **Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion***Viruses*, 2015. .

VAN ENDERT, P. M. et al. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 6, p. 1883–1895, 1 dez. 1995. Disponível em: <<https://pubmed-ncbi-nlm-nih.ez9.periodicos.capes.gov.br/7500034/>>. Acesso em: 31 ago. 2021.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity***Immunology Today* Elsevier Current Trends, , 1 ago. 1989. .

VASILJEVA, L. et al. Regulation of the Sequential Processing of Semliki Forest Virus Replicase Polyprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41636–41645, 2003.

VASILJIEVA, L. et al. **Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus-RNA 5' Triphosphatase Activity of Nsp2**. [s.l.] JBC Papers in Press. Published on, 2000. . Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

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, 2007.

VITA, R. et al. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D339–D343, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30357391/>>. Acesso em: 7 out. 2020.

VITIELLO, A. et al. Comparison of cytotoxic T lymphocyte responses induced by peptide or DNA immunization: Implications on immunogenicity and immunodominance. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 3, p. 671–678, 1997.

VOLK, S. M. et al. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 1 jul. 2010. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01603-09>>.

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 1 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09555>>.

WALTER, G. Production and use of antibodies against synthetic peptides. **Journal of Immunological Methods**, v. 88, n. 2, p. 149–161, 17 abr. 1986.

WANG, C. et al. Chikungunya virus sequences across the first epidemic in Nicaragua, 2014-2015. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 400–403, 1 fev. 2016.

WANG, Y. F.; SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. **Journal of Virology**, v. 68, n. 10, p. 6466–6475, 1994.

WARTER, L. et al. Chikungunya Virus Envelope-Specific Human Monoclonal Antibodies with Broad Neutralization Potency. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 3258–3264, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278338/>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.

WAUQUIER, N. et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>>.

WEINBREN, M. .; HADDOW, A. .; WILLIAMS, M. . The occurrence of chikungunya virus in Uganda I. Isolation from mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 253–262, maio 1958. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(58\)90084-1](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(58)90084-1)>.

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. E2046–E2053, 28 maio 2013. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3670335/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23881111/)>. Acesso em: 29 set. 2021.

WELCH, W. J.; SEFTON, B. M. **Characterization of a Small, Nonstructural Viral Polypeptide Present Late During Infection of BHK Cells by Semliki Forest Virus****JOURNAL OF VIROLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

WENGLER, G. et al. During entry of alphaviruses, the E1 glycoprotein molecules probably form two separate populations that generate either a fusion pore or ion-permeable pores. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1695–1701, jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15166454/>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

WHITE, L. K. et al. Chikungunya Virus Induces IPS-1-Dependent Innate Immune Activation and Protein Kinase R-Independent Translational Shutoff. **Journal of Virology**, v. 85, n. 1, p. 606–620, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962078/>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

WIN, M. K. et al. Chikungunya fever in Singapore: Acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, n. 2, p. 111–114, 2010.



WU, D. et al. Chikungunya virus with E1-A226V mutation causing two outbreaks in 2010, Guangdong, China. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 174, 2 jun. 2013.

Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-174>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

XU, W. et al. Variations in SARS-CoV-2 Spike Protein Cell Epitopes and Glycosylation Profiles During Global Transmission Course of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–12, 2020.

YAO, J. S.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Interactions between PE2, E1, and 6K Required for Assembly of Alphaviruses Studied with Chimeric Viruses. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7910–7920, 1996. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/fa4c/72b9e034d00b87f6113b409f5931a9dc6dd8.pdf>>.

YAP, G. et al. Evaluation of Chikungunya Diagnostic Assays: Differences in Sensitivity of Serology Assays in Two Independent Outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. e753, 20 jul. 2010. Disponível em:

<<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000753>>.

YAP, M. L. et al. Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 52, p. 13703–13707, 26 dez. 2017.

Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1713166114](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1713166114)>. Acesso em: 20 mar. 2021.

YERGOLKAR, P. N. et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1580–1583, 2006.

YIN, D. et al. A novel multi-epitope recombinant protein for diagnosis of human brucellosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 219, 21 maio 2016. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1552-9>>.

Acesso em: 10 ago. 2020.

YORK, I. A. et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8–9 residues. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1177–1184, 18 dez. 2002. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12436110/>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

ZAID, A. et al. Chikungunya Virus Arthritis: Implications of Acute and Chronic

Inflammation Mechanisms on Patient Management. **Arthritis & Rheumatology**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 29 dez. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.40403>>.

ZHANG, G. L. et al. PREDTAP: a system for prediction of peptide binding to the human transporter associated with antigen processing. **Immunome Research**, v. 2, p. 3, 23 maio 2006. Disponível em: <[pmc/articles/PMC1524936/](http://pmc/articles/PMC1524936/)>. Acesso em: 7 dez. 2021.

ZHANG, L. Multi-epitope vaccines: A promising strategy against tumors and viral infections. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 2, p. 182–184, 1 fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

ZHANG, R. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018a.

ZHANG, X. et al. Differences in genome characters and cell tropisms between two chikungunya isolates of Asian lineage and Indian Ocean lineage. **Virology Journal**, p. 1–10, 2018b. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-018-1024-5>>.

ZHANG, Y. et al. The confirmation of three repeated sequence elements in the 3' untranslated region of Chikungunya virus. **Virus Genes**, v. 46, n. 1, p. 165–166, 23 fev. 2013.

## APÊNDICE 1

### Cepas utilizadas para análise filogenética

GenBank	Localidade	Ano de isolamento
HM045811	Tanzânia	1953
LC259082	Tailândia	1958
HM045809	República Democrática do Congo	1960
HM045823	Angola	1962
HM045803	Índia	1963
HM045786	Nigéria	1964
HM045788	Índia	1973
HM045814	Tailândia	1975
HM054822	República Central Africana	1978
HM045812	Uganda	1982
HM045791	Indonésia	1983
AY726732	Senegal	1983
HM045784	República Central Africana	1984
HM04597	Indonésia	1985
HM045790	Filipinas	1985
HM045789	Tailândia	1988
HM045786	Tailândia	1995
MH229986	Ilhas Maurício	2006
MK098629	Sri Lanka	2006
EU703759	Malásia	2006
FJ807897	Indonésia	2007
Kt324224	Malásia	2008
FJ445510	Singapura	2008
Lc259093	Malásia	2009
MH124573	Índia	2010
MF773565	Timor Leste	2010
MF773567	Bornéu	2011
HE806461	Nova Caledônia	2011
MF773561	Bali	2011
MG664850	China	2012
MG664851	China	2012
LC259084	Filipinas	2012
MF773569	Papua Nova Guiné	2013
KJ451622	Micronésia	2013
KP164568	Feira de Santana-BA	2014
KX629422	Índia	2014

<b>GenBank</b>	<b>Localidade</b>	<b>Ano de isolamento</b>
LC259088	Tonga	2014
MF773559	Samoa	2014
KP164571	Recife-PE	2014
MF773560	Caribe	2014
MH359139	Colômbia	2014
KP164572	Belém do Pará-PA	2014
KJ451624	Ilhas Virgens Britânicas	2014
LC259089	Dominica	2014
MH329299	Colômbia	2014
KP164567	Oiapoque-AP	2014
MG967666	Haiti	2014
KR559471	El Salvador	2014
KU940225	Salvador-BA	2015
MF773562	Kiribati	2015
MG921596	México	2015
KU355832	Rio de Janeiro-RJ	2015
LC259090	Colômbia	2015
MG000876	Haiti	2016
KX228391	Recife-PE	2016
Ky124328	Rio de Janeiro-RJ	2016
KY055011	Aracaju-SE	2016
MK370032	Índia	2016
MF774614	Paquistão	2016
MH124581	Índia	2016
MF499120	Hong Kong	2016
LC259094	Angola	2016
LC259092	Cuba	2016
AF079456	Uganda (Grupo externo: O'nyong nyong)	1996-1997

## APÊNDICE 2

### AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESTRUTURAL DOS MODELOS

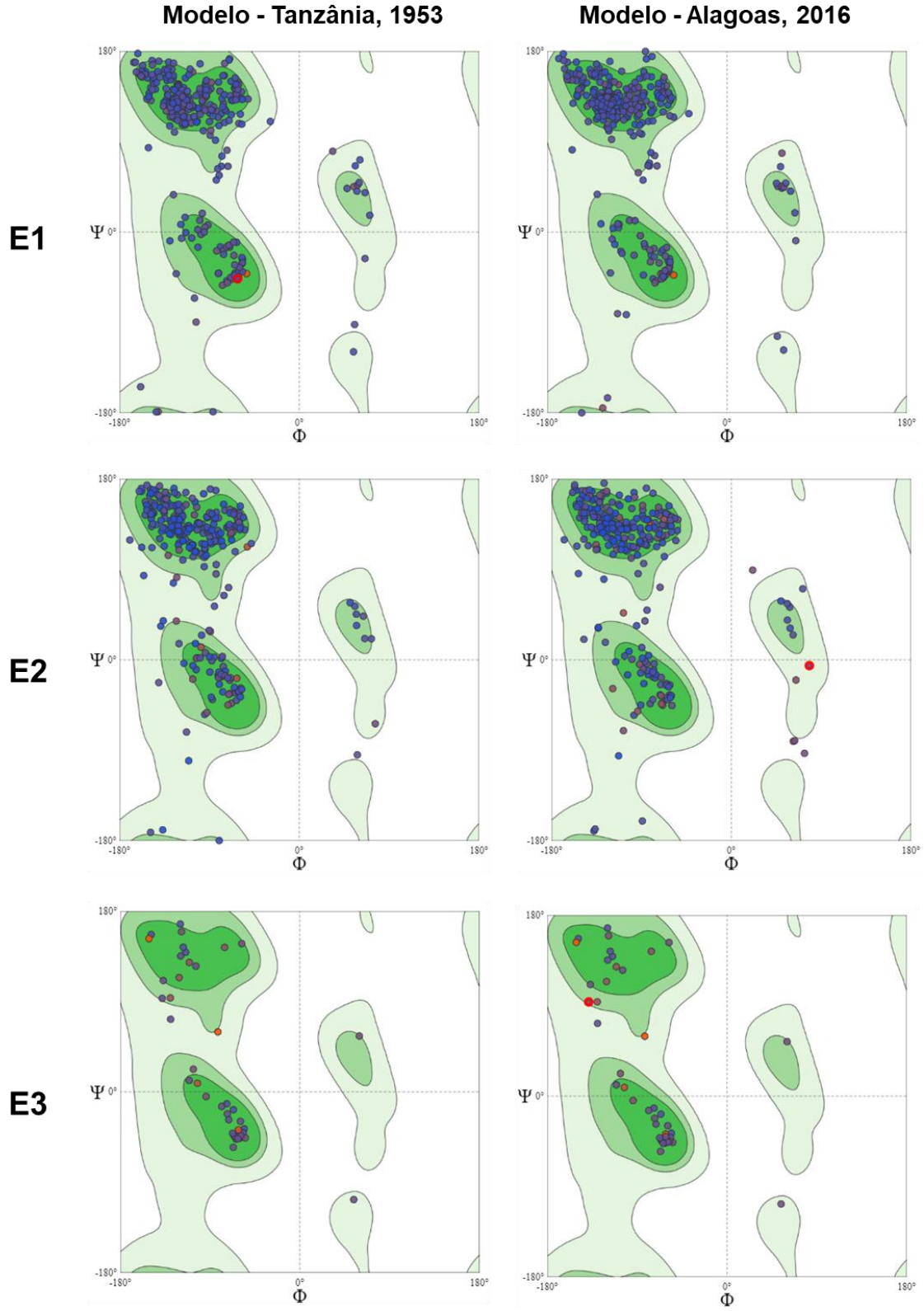
Características estruturais dos modelos adquiridos no Swiss-Prot

	Modelo – Tanzânia, 1953			Modelo – Alagoas, 2016		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3
<b>Estrutura PDB</b>	3n41.1	3n41.1	3N40.1	3n41.1	3n41.1	3N40.1
<b>Cadeia</b>	C	B	A	C	B	A
<b>Alcance</b>	1-381	5-342	5 a 63	1-381	5-342	5 a 63
<b>Cobertura</b>	0.94	0.85	0.92	0.94	0.85	0.92
<b>GMQE</b>	0.73	0.67	0.67	0.73	0.67	0.66
<b>QMEANDisCo Global</b>	0.82 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.72 (± 0.11)	0.83 ± 0.05	0.83 ± 0.05	0.71 (± 0.11)
<b>Identidade</b>	99.51%	98.06%	100%	99.27%	98.89%	98.31%
<b>Método</b>	X-ray	X-ray	X-ray	X-ray	X-ray	X-ray
<b>Resolução</b>	3.01 Å	3.01 Å	2.17 Å	3.01 Å	3.01 Å	2.17 Å
<b>Similaridade</b>	0.62	0.63	0.65	0.62	0.63	0.64
<b>QMEAN (Z-score)</b>	-0.42	0.47	0	-0.24	0.36	-0.06
<b>C<math>\beta</math> (Z-score)</b>	0.44	1.39	0.65	-0.77	1.26	0.64
<b>Todos os átomos (Z-score)</b>	-0.13	-0.38	-0.41	-0.26	-0.59	-0.39
<b>Solvatação (Z-score)</b>	-1.28	-0.7	-0.89	-1.22	-1.21	-0.88
<b>Torção (Z-score)</b>	-0.10	0.47	0.26	-0.02	-0.16	0.19

### Valores de QMEAN dos resíduos de interesse

Proteína	Posição	Tanzânia, 1953	Alagoas, 2016
E1	211	0.73	0.76
	269	0.84	0.88
	288	0.77	0.77
E2	60	0.85	0.81
	74	0.71	0.74
	103	0.93	0.91
	164	0.76	0.71
	221	0.76	0.8
	299	0.91	0.89
	344	-	-
	377	-	-
E3	384	-	-
	29	0.75	0.72

Gráfico de Ramachandran para validação dos modelos



## ANEXO 1 - ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

Tanabe ISB, Santos EC, Tanabe ELL, Souza SJM, Santos FEF, Taniele-Silva J, Ferro JFG, Lima MC, Moura AA, Anderson L, Bassi ÊJ. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 Nov 1;113(11):730-733. doi: 10.1093/trstmh/trz065. PMID: 31365117.

*Trans R Soc Trop Med Hyg* 2019; **00**: 1–4  
doi:10.1093/trstmh/trz065



### Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase

Ithallo S. B. Tanabe<sup>a</sup>, Elane C. Santos<sup>a</sup>, Eloiza L. L. Tanabe<sup>a</sup>, Stephannie J. M. Souza<sup>a</sup>, Fabio E. F. Santos<sup>a</sup>, Jamile Taniele-Silva<sup>a</sup>, Jean F. G. Ferro<sup>b</sup>, Magliones C. Lima<sup>b</sup>, Adriana A. Moura<sup>c</sup>, Leticia Anderson<sup>a,d</sup> and Ênio J. Bassi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>IMUNOREG—Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>b</sup>Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas, 57036-860, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>c</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>d</sup>Centro Universitário CESMAC, 57081-350, Maceió, Alagoas, Brazil

\*Corresponding author: Tel: +55-82-3214-1536; E-mail: enio.bassi@icbs.ufal.br

Received 18 March 2019; revised 8 June 2019; editorial decision 24 June 2019; accepted 25 June 2019

**Background:** The immune response against the Chikungunya virus (CHIKV) during the very early acute phase is not fully elucidated. Therefore we explored the cytokine and chemokine profile triggered by CHIKV in infected patients.

**Methods:** Cytokines, chemokines and C5a anaphylatoxin were analysed in serum from CHIKV-infected patients during the viraemic phase (mean 2.97±1.27 d after illness onset) compared with a healthy group.

**Results:** CHIKV-infected patients had a significant increase of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (CXCL8/IL-8), interleukin-10 (IL-10), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), monokine induced by interferon- $\gamma$  (CXCL9/MIG), monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1), interferon- $\gamma$ -induced protein-10 (CXCL10/IP-10) and complement C5a anaphylatoxin.

**Conclusions:** The very early acute immune response triggered against CHIKV leads to an increase in pro-inflammatory immune mediators such as IFN- $\gamma$  and its induced chemokines, and a high level of C5a anaphylatoxin as a result of complement activation.

**Keywords:** acute immune response, arboviruses, chemokines, chikungunya virus, complement system, cytokines

#### Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an emergent arbovirus transmitted by mosquitoes in tropical and subtropical regions that is responsible for outbreaks around the world in recent years.<sup>1</sup> The acute phase occurs during the first 2 weeks after the onset of the disease and is characterized by fever, headache, skin rash and polyarthralgia. The disease can progress to the chronic phase, with persistent arthralgia for months or even years. The immune soluble analytes profile present in the blood of infected patients during different stages of the disease has been explored in various studies.<sup>2–6</sup> However, the early acute immune response triggered by CHIKV in the first days of infection has not been fully elucidated. Therefore, in this study we investigated the levels of 12 soluble analytes of the immune response in the very early acute phase in CHIKV-infected patients.

#### Materials and methods

In this study, patients underwent a medical examination (on the day of blood sample collection) and the day of initial symptoms onset was obtained. This study analysed 29 serum samples from CHIKV-infected patients in the very early acute phase and 21 serum samples of healthy donors (see Supplementary data). All samples were tested with reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) with primers to detect the CHIKV genome (5'-TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA-3'; 5'-TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC-3') and the probe (5'-FAM-AGGTACGCG/ZEN/CTTCAAGTTCCG CG-IwBFQ-3') in the Superscript III Platinum One-Step RT-qPCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and immune assays to reveal anti-Chikungunya virus immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Euroimmun, Lübeck, Germany), anti-Zika virus IgM antibodies by immunochromatographic assay

Taniele-Silva J, Martins LG, Sousa MB, Souza LM, Cardoso RMB, Velasco SRU, Ramos GDS, Miranda CT, Moura AA, Anderson L, Bassi ÊJ. Retrospective clinical and epidemiological analysis of scorpionism at a referral hospital for the treatment of accidents by venomous animals in Alagoas State, Northeast Brazil, 2007-2017. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2020;62:e26. doi: 10.1590/s1678-9946202062026. Epub 2020 May 11. PMID: 32401958; PMCID: PMC7232956.

**Retrospective clinical and epidemiological analysis of scorpionism at a referral hospital for the treatment of accidents by venomous animals in Alagoas State, Northeast Brazil, 2007-2017**

Jamile Taniele-Silva<sup>1\*</sup>, Lycia Gama Martins<sup>1,2,5\*</sup>, Marília Barroso de Sousa<sup>2</sup>, Letícia Moreira de Souza<sup>2</sup>, Rodolfo Mathias Barros Cardoso<sup>2</sup>, Santiago René Unda Velasco<sup>4</sup>, Geymerson dos Santos Ramos<sup>3</sup>, Cláudio Torres de Miranda<sup>2</sup>, Adriana Ávila Moura<sup>2,5</sup>, Letícia Anderson<sup>1,6</sup>, Ênio José Bassi<sup>1</sup>

## ABSTRACT

Scorpionism has a high incidence rate in Brazil. It is considered a serious public health problem mainly in tropical and subtropical regions around the world. The number of scorpion accidents have increased over the years and the highest frequencies have been reported mainly in the Brazilian Northeast region. Therefore, in this study we report a retrospective clinical and epidemiological analysis of scorpion stings from 2007 to 2017 in Alagoas State, Northeast Brazil, at a referral hospital for assistance and treatment of accidents by venomous animals. During the analyzed period, the referral hospital treated 27,988 cases, and an increase in the number of cases has taken place over the years. The highest frequency of scorpion stings was observed in females, and the age range most affected was from 20 to 29 years old. The most stung body site was the foot, followed by finger, toe or hand. Regarding the severity, most severe cases were reported in children up to 4 years old (69.4%) and 50% of the total cases treated with serotherapy corresponded to patients in this age range. Interestingly, it was also found that the occurrence of systemic manifestations and the severity of the cases were significantly associated with pediatric patients. In this way, this study highlights the scorpionism as an environmental public health problem in Alagoas State, Northeast Brazil, as well as the need to intensify the epidemiological surveillance and educational campaigns to prevent and control scorpion accidents throughout the year.

**KEYWORDS:** Scorpionism. Scorpion stings. Tropical medicine. Epidemiology.

## INTRODUCTION

Scorpionism is a serious public health problem reaching high incidence rates and severity mainly in tropical and subtropical regions around the world<sup>1,2</sup>. In Brazil, scorpionism has a high incidence rate due to the wide distribution of scorpions in all the regions and ecosystems of the country<sup>3</sup>. The species of the genus *Tityus*, mainly *Tityus serrulatus* known as “yellow scorpion” due to its coloring, is considered the most dangerous scorpion and accounts for the highest number of accidents<sup>2,4</sup>.

Scorpion toxin is composed of a complex mixture of low molecular weight proteins that prolong depolarization of post-ganglionic nerve endings throughout the body, leading to a massive release of neurotransmitters, which trigger the predominance of systemic effects (adrenergic and/or cholinergic)<sup>5</sup>. Additionally, it is known that the mediators of the inflammatory response and toxicity on

\*These authors have contributed equally to this work

<sup>1</sup>Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Maceió, Alagoas, Brazil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Alagoas, Faculdade de Medicina, Maceió, Alagoas, Brazil

<sup>3</sup>Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Computação, Laboratório de Computação Científica e Análise Numérica, Maceió, Alagoas, Brazil

<sup>4</sup>Universidad Nacional de La Rioja, Departamento de Ciencias de la Salud, La Rioja, Argentina

<sup>5</sup>Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Hospital Escola Dr. Hélio Auto, Maceió, Alagoas, Brazil

<sup>6</sup>Centro Universitário CESMAC, Maceió, Alagoas, Brazil

**Correspondence to:** Ênio José Bassi  
Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, 57072-900, Maceió, AL, Brazil

**E-mail:** enio.bassi@icbs.ufal.br

**Received:** 2 December 2019

**Accepted:** 23 March 2020



Silva LR, Rodrigues ÉEDS, Taniele-Silva J, Anderson L, Araújo-Júnior JX, Bassi ÊJ, Silva-Júnior EFD. Targeting Chikungunya Virus Entry: alternatives for new inhibitors in drug discovery. *Curr Med Chem.* 2021 Jun 23. doi: 10.2174/0929867328666210623165005. Epub ahead of print. PMID: 34165405.

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

*Current Medicinal Chemistry*, XXXX, XX, 1-23

1

## REVIEW ARTICLE

# Targeting Chikungunya Virus Entry: Alternatives for New Inhibitors in Drug Discovery

Leandro Rocha Silva<sup>1,2</sup>, Érica Erlanny da Silva Rodrigues<sup>1,3</sup>, Jamile Taniele-Silva<sup>4</sup>, Leticia Anderson<sup>4,5</sup>, João Xavier de Araújo-Júnior<sup>1,3</sup>, Ênio José Bassi<sup>4</sup> and Edeildo F. da Silva-Júnior<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Organic and Medicinal Synthesis, Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Manoel Severino Barbosa Avenue, Arapiraca 57309-005, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; <sup>4</sup>IMUNOREG – Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas, Campus AC. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; <sup>5</sup>CESMAC University Center, Cônego Machado Street, Maceió 57051-160, Brazil

**Abstract:** Chikungunya virus (CHIKV) is an *Alphavirus (Togaviridae)* responsible for Chikungunya fever (CHIKF) that is mainly characterized by a severe polyarthralgia, in which it is transmitted by the bite of infected *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. Nowadays, there are no licensed vaccines or approved drugs to specifically treat this viral disease. Structural viral proteins participate in key steps of its replication cycle, such as viral entry, membrane fusion, nucleocapsid assembly, and virus budding. In this context, envelope E3-E2-E1 glycoproteins complex could be targeted for designing new drug candidates. In this review, aspects of the CHIKV entry mechanism are discussed to provide insights into assisting the drug discovery process. Moreover, several naturals, nature-based and synthetic compounds, as well as repurposed drugs and virtual screening are also explored as alternatives for developing CHIKV entry inhibitors. Finally, we provided a complementary analysis of studies involving inhibitors that were not explored by *in silico* methods. Based on this, Phe<sup>118</sup>, Val<sup>179</sup>, and Lys<sup>181</sup> were found to be the most frequent residues, being present in 89.6, 82.7, and 93.1% of complexes, respectively. Lastly, some chemical aspects associated with interactions of these inhibitors and mature envelope E3-E2-E1 glycoproteins' complex were discussed to provide data for scientists worldwide, supporting their search for new inhibitors against this emerging arbovirus.

## ARTICLE HISTORY

Received: December 31, 2020  
Revised: April 06, 2021  
Accepted: May 11, 2021

DOI:  
10.2174/0929867328666210623165005

**Keywords:** Entry inhibitors, Chikungunya virus, medicinal chemistry, drug design, repurposing, natural products, synthetic, virtual screening, molecular docking, frequency residues.

## 1. INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) transmitted by biting of infected

female *Aedes* spp. mosquitoes, in which the most common urban vectors, are *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* [1]. CHIKV infection leads to Chikungunya Fever (CHIKF) that causes acute fever illness, rash, myalgia, followed by symmetrical, bilateral, and disabling arthralgia, which could persist for months or even years [2-4].

CHIKV epidemiology is related to the global spread of vectors, favoring the infection of millions of humans worldwide in a person-to-mosquito-to-person cycle [5].

\*Address correspondence to this author at the Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Campus A.C. Simões, Lourival Melo Mota Avenue, Maceió 57072-970, Brazil; Tel: +55-87-9-9610-8311; E-mail: [edeildo.junior@iqb.ufal.br](mailto:edeildo.junior@iqb.ufal.br)

## ANEXO 2 – ARTIGOS EM FASE DE ESCRITA E REVISÃO

**Título: Potential impact of mutations in the envelope proteins of the Chikungunya virus circulating in the state of Alagoas-Brazil: an immunoinformatics analysis**

• Autores: Jamile Taniele-Silva et al.

**Título: Deciphering adaptive mutations in the genome of the Chikungunya virus**

• Autores: Jamile Taniele-Silva et al.

## ANEXO 3 – PREMIAÇÃO



### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho  
**Prospection of mutations and detection of experimental and predicted B and T cell  
 epitopes in Chikungunya virus envelope**  
 de autoria de **Jamile Taniele da Silva**  
 recebeu o Prêmio do Melhor E-Pôster, na área de **Virologia Humana 1** no  
 XXXII Congresso Brasileiro de Virologia.



  
**Flávio Guimarães da Fonseca**  
 Presidente

  
**Helena Lage Ferreira**  
 Primeira Secretária

