



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE – FACES  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**DYÉFERSON KENED DA SILVA COELHO GUIMARÃES**

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM  
CÉLULAS DE INSETOS VISANDO DESENVOLVIMENTO DE  
INSUMO PARA DIAGNÓSTICO E/OU VACINA**

**BRASÍLIA-DF  
2017/2018**

**DYÉFERSON KENED DA SILVA COELHO GUIMARÃES**

**EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM CÉLULAS DE  
INSETOS VISANDO DESENVOLVIMENTO DE INSUMO PARA DIAGNÓSTICO E/OU  
VACINA**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde – FACES

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra Anabele Azevedo  
Lima**

**BRASÍLIA-DF  
2017/2018**

# EXPRESSÃO DA GLICOPROTEÍNA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM CÉLULAS DE INSETOS VISANDO DESENVOLVIMENTO DE INSUMO PARA DIAGNÓSTICO E/OU VACINA

**Dyéferson Kened da Silva Coelho Guimarães – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista**

*dyeferson.guimaraes@sempreceub.com*

**Profª Dra Anabele Azevedo Lima – UniCEUB, professor orientador**

*anabele.lima@ceub.edu.br*

**Profº Adjunto Dr Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo – UFSM, professor colaborador**

*daniel\_ardisson@yahoo.com.br*

**Dr Leonardo Assis da Silva – UNB, Pós doutorando**

*leocbq@yahoo.com.br*

**Profº titular Dr Bergmann Morais Ribeiro – UNB, professor colaborador**

*bergmann@unb.br*

De acordo com o Ministério da Saúde, a saúde pública no Brasil tem retratado a alta incidência de doenças infecciosas emergentes e reemergentes, causadas por arbovírus, como por exemplo o vírus Chikungunya (CHIKV). Dados epidemiológicos associados ao CHIKV vem mostrando grandes preocupações tanto para a população como também para órgãos governamentais, por não apresentarem tratamento específico e vacina para a imunização da população. O CHIKV caracteriza-se por ser um vírus de RNA viral sentido positivo, cadeia simples e sua transmissão ocorre devido a picada do mosquito das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi expressar epítomos de proteínas específicas do vírus CHIKV fusionado a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV, cujo o modelo para expressão já é bem estabelecido por se tratar de um sistema eucarioto. Para isso, técnicas de dna recombinante foram utilizadas visando a construção de um baculovírus recombinante portador dos genes de interesse E2 e NSP3, e confirmado por sequenciamento. Além disso, a expressão da proteína do baculovírus recombinante R1 (genes E2 e NSP3) em células de inseto Tn5B foi bem-sucedida utilizando a estratégia bac-to-bac. Esta mesma proteína foi analisada por SDS-PAGE e detectada por *western blot* apresentando proteína de tamanho esperado 37 kDa. É sabido que as regiões gênicas dos epítomos E2 e NSP3 do CHIKV já foram expressos em trabalhos anteriores, entretanto, nenhum utilizou repetições das regiões antigênicas como as que foram descritas neste trabalho, a qual apresentou uma elevada expressão de proteínas com propriedades imunogênicas. Com bases nos resultados apresentados, foi possível construir uma estratégia promissora por meio de regiões imunogênicas do vírus CHIKV que visa o desenvolvimento de kit diagnóstico, bem como, servir como base para futuros estudos com a perspectiva de outras aplicações biotecnológicas, como a produção de vacina, podendo favorecer a saúde pública do Brasil e do mundo.

**Palavras-chave:** doenças infecciosas emergentes, arbovírus, baculovírus, CHIKV

**Redes de Fomento:** UniCEUB – Centro universitário de Brasília e FAPDF – Fundação de Apoio à Pesquisa do GDF.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
3.1 Isolamento e identificação do gene de interesse.....	8
3.2 Construção dos plasmídeos recombinantes contendo as regiões multiepítopo do envelope do vírus CHIKV .....	9
3.3 Construção dos baculovírus recombinantes contendo as regiões multiepítopo do envelope do vírus CHIKV .....	11
3.4 Expressão da proteína recombinante em células de inseto:.....	13
3.5 Análise das proteínas de interesse por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a purificação dos poliedros recombinantes.....	14
3.6 Imunoensaio enzimático .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1 Isolamento e identificação do gene de interesse:.....	15
4.2 Construção do plasmídeo pGEMR1:.....	16
4.3 Clonagem do inserto de interesse no vetor pFAST-amino:.....	18
4.4 Subclonagem do vetor pFAST-aminoR1 em bacmídeo:.....	19
4.5 Transfecção do bacmídeo em cultura de célula Tn5B:.....	20
4.6 Confirmação da expressão da proteína de interesse do CHIKV fusionada na poliedrina. ....	21
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	23
4.8 Ensaio imunoenzimático indireto .....	23
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

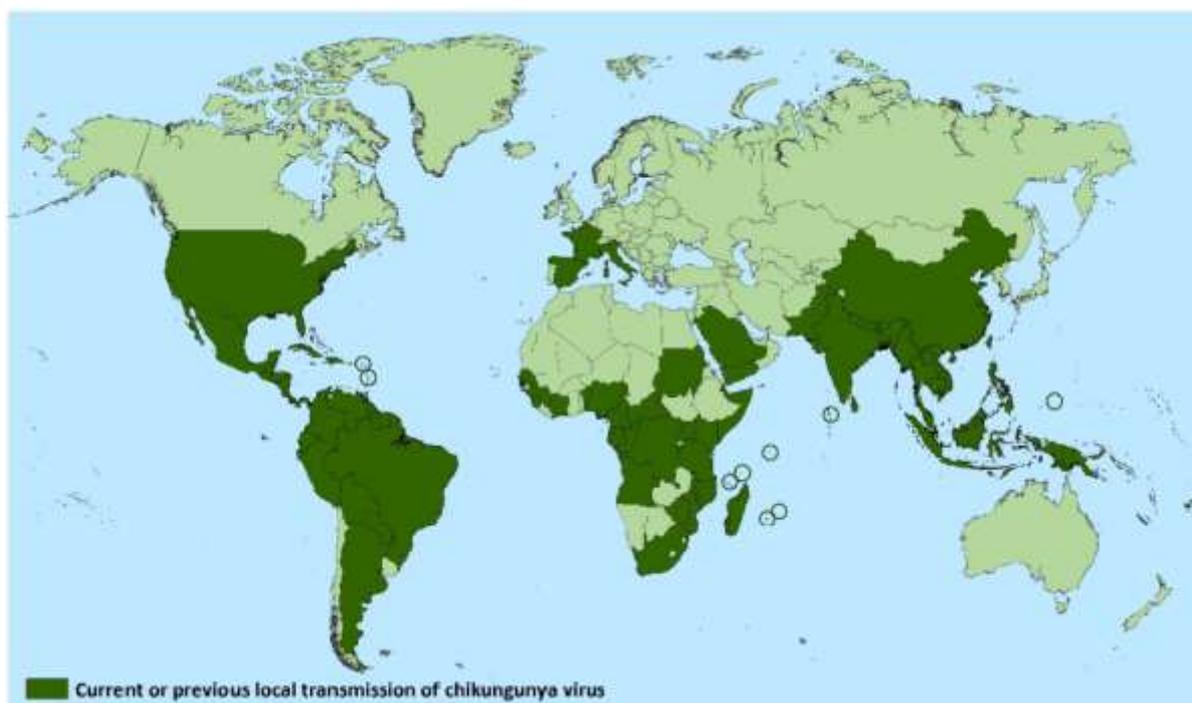
## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente a saúde pública brasileira tem retratado uma fase onde doenças infecciosas emergentes e reemergentes, causadas por arbovírus, como o vírus Chikungunya, está acarretando epidemias e trazendo grandes preocupações, tanto para a população em geral como também para órgãos governamentais, por não apresentarem tratamento específico e vacina para a imunização da população (HONÓRIO et al., 2015).

A febre Chikungunya, assim como, a maioria das doenças infecciosas de origem viral, apresenta uma incidência crescente, se alastrando por todo o globo. Sua origem é zoonótica, ou seja, o vírus existe na natureza infectando um animal silvestre, geralmente primata não humano (LIMA-CAMARA, 2016; COFFEY et al., 2014). A sua descoberta ocorreu em 1950 no continente africano, mais especificamente na região da Tanzânia (DONALISIO et al., 2015; WEAVER et al., 2012). O significado da palavra Chikungunya, vem do dialeto makonde, língua dos povos Makondes do norte de Moçambique e sul da Tanzânia, “aquele que anda encurvado”, refere-se a postura dos pacientes infectados, das dores proeminentes nas articulações, os quais adotam uma postura encurvada (TAUIL, 2014; LAITON-DONATO et al., 2016; MORCERF et al., 2015).

O vírus assusta a população mundial desde meados dos anos de 1960, quando foi encontrada em diversos lugares do continente africano como: Uganda, Malawi, Quênia, Sudão entre outras, até o presente momento. Nesta mesma década, houve surtos iniciais na Ásia, sendo introduzidas em suas respectivas cidades como: Malásia, Índia, Camboja e Tailândia. O vírus se tornou ausente por 39 anos, nenhum caso foi isolado ou confirmado como um possível portador da febre Chikungunya, mas entre os anos de 2001 e 2003, o vírus retornou a infectar moradores da Indonésia (AZEVEDO et al., 2015; LARAS et al., 2005).

No ano de 2004, não existiam casos fora do continente africano e asiático, contudo, no ano seguinte, foi comprovado um surto em junho de 2005, onde a infecção se espalhou rapidamente pelas ilhas do Oceano Índico. Neste mesmo ano foi observado sintomas não típicos desta infecção, pacientes agora apresentavam patologias associadas ao sistema neurológico e óbitos. Foi relatado que no ano de 2018, a população de mais de 100 países já entrou em contato com vírus Chikungunya (figura 1). No ano de 2015, foi notificado em todo o território nacional cerca de 38.332 prováveis casos causados pelo chikungunya, resultando em uma taxa de incidência de 18,7 casos para 100 mil habitantes, onde 13.236 foram devidamente confirmados, juntamente com 6 óbitos, todos com a média de 75 anos (MOGAMI et al., 2017).



**Figura 1:** Desenho representativo dos países onde já houve a transmissão confirmada do CHIKV. Fonte: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), acessado no dia 22 de agosto de 2018.

Já no ano seguinte, até a 16<sup>o</sup> semana epidemiológica, houve um aumento no número de casos, sendo 64.349 casos prováveis, sua taxa de incidência atingiu 31,5 casos para 100 mil habitantes, 11.181 casos foram confirmados. 15 casos de óbitos foram confirmados, com uma média de idade agora menor, atingindo 57 anos (BRASIL, 2016). Entretanto, até o mês de setembro do ano 2016, houve um aumento exacerbado de indivíduos infectados, atingindo 236.287 pessoas, enquanto que, a região do Nordeste é portadora da maior quantidade de casos, sendo 88,2% (MOGAMI et al., 2017). Até a semana de número 52 de 2017, foram registrados 171.930 possíveis casos da infecção, destes, 121.734 cerca de 70,8% dos casos foram confirmados, enquanto que até a semana epidemiológica 23 de 2018 foram registrados 47.791 prováveis casos de febre chikungunya no país, e 30,251 casos foram confirmados (BRASIL., 2018).

A sua transmissão ocorre devido a picada do mosquito do gênero *Aedes* em humanos, tais como o *Aedes aegypti*. O inseto *A. aegypti* é encontrado em zona urbana, seu comportamento antropofílico e sua preferência por habitar o interior das residências, promove uma quantidade acentuada de pessoas infectadas. Além disso, o *Aedes albopictus* habita regiões rurais, preferindo regiões que estejam afastadas das grandes cidades como sítios e fazendas (HONÓRIO, 2015) e pode também pode transmitir o vírus ao humano.

Apesar de suas semelhanças, esses dois vetores foram introduzidos no Brasil em momentos distintos. A chegada do *A. aegypti* ocorreu no período colonial, enquanto o *A. albopictus* está presente no território brasileiro a pouco mais de duas décadas (SERPA et al., 2006). A adaptação rápida do *A. aegypti*, e conseqüentemente, o processo crescente de urbanização e aumento do número populacional, facilitaram a disseminação do mesmo por todo o país, chegando a habitar aproximadamente 4.523 municípios até o presente momento (ZARA et al., 2016; SERPA et al., 2006). No ano de 2014 o *A. albopictus* estava disseminado em 3.285 municípios e ausente em quatro estados: Acre, Amapá, Roraima e Sergipe (CARVALHO et al., 2014).

O vírus passa por um curto período de incubação que dura no máximo 12 dias, porém com uma média de 4 dias, a infecção é dividida em três fases, a fase aguda que dá início aos sintomas mais comuns como a febre alta (acima de 39°), cefaleia, exantema, dores nas pequenas e grandes articulações, estas dores articulares passam por um período muito intenso, acometendo na maioria dos casos as articulações dos tornozelos, pulsos, falanges, quadris e joelhos. Alguns achados clínicos têm sido encontrados com grande frequência como erupção maculopapular transitória, com muito prurido, sendo achados na face e no tronco, fotossensibilidade, úlceras na boca, dermatite esfoliativa, bolhas e alterações gastrintestinais.

A doença evolui para a fase subaguda depois de uma remissão temporária das dores articulares, elas retornam mais exacerbadas, e por fim, a terceira fase da doença, onde a mesma evoluiu para sua forma crônica, geralmente em pacientes acima de 40 anos, persistindo uma intensa poliartralgia, incapacitando a pessoa infectada por semanas e, em alguns casos não muito raros, por anos, (muitos indivíduos tornam-se incapazes de manusear objetos). Sua principal característica é a artralgia continua que dura mais de 3 meses e poliartrite gravíssima presente nas articulações distais, reumatismo e tenossinovites nas mãos, pulsos e tornozelos. Porém, os sintomas clínicos podem sofrer alterações de acordo com o tecido em que se multiplica. Quando a infecção ocorre em crianças, alguns sintomas diferenciados podem aparecer, tais como, erupção vesicular com descamação, petéquias e sangramento gengival. (CASTRO et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016; TAUIL et al., 2014; CORRALES-AGUILAR et al., 2015; SIMON et al., 2011).

Com o passar dos anos, no decorrer dos últimos surtos, foram relatadas evoluções clínicas atípicas da doença, como alterações oculares, renais, cardíacas e principalmente neurológicas, em sua maioria em pacientes acima de 65 anos, resultando com o maior número

dos casos em óbitos. Encefalopatia foi a patologia mais encontrada quando se trata de transmissão de mãe para filho, apresentando edemas, lesões e hemorragias cerebrais, deixando sequelas que levam o paciente a incapacidade neuromotora e morte. Diversas outras complicações neurológicas foram descritas em surtos nas mais diferentes localidades do mundo, como meningo-encefalite, mielite, Síndrome de Guillan-Barré, paralisia facial, surdez neurossensorial e neurite ótica. Quando as lesões acometem o sistema ótico, em sua maioria, causam papilite, neurite retrobulbar e neurorretinite (PINHEIRO et al., 2016).

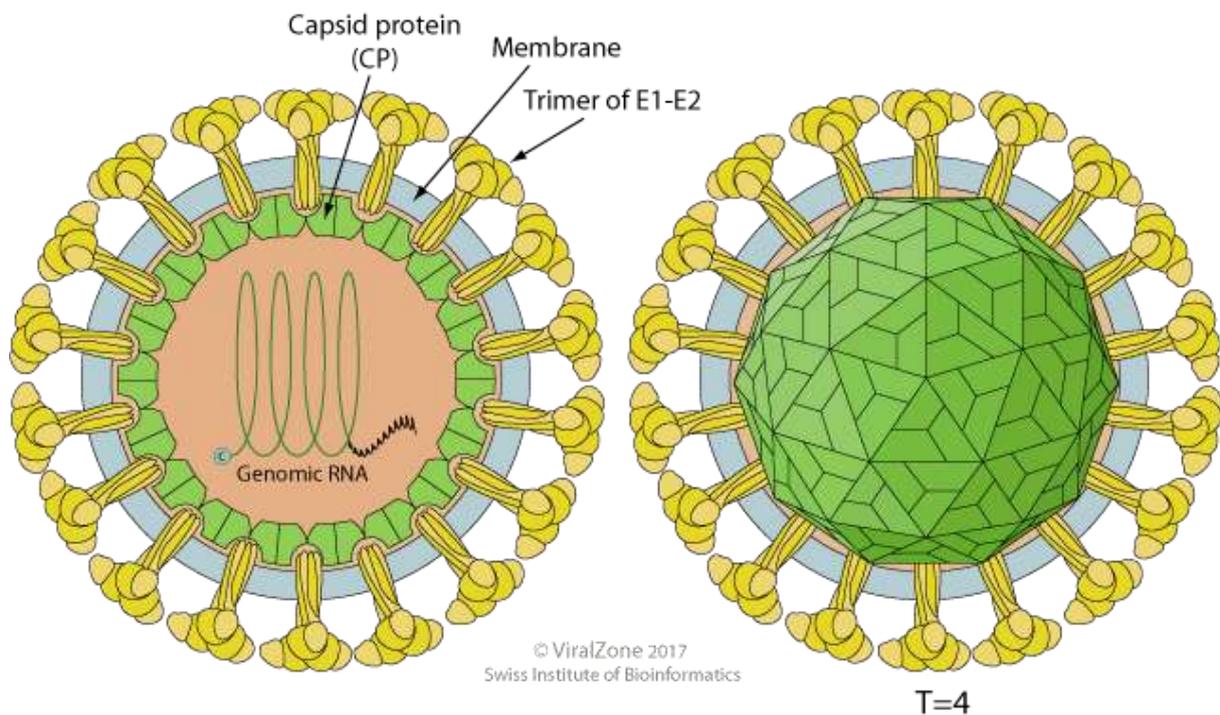
Após tantos surtos mundiais causados pelo CHIKV, não foi possível estabelecer ainda um diagnóstico rápido e que possua custo-benefício. Sendo assim, um método muito bem estabelecido para sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus, em células de inseto, permite que as proteínas heterólogas sejam ativas biologicamente guardando consigo semelhanças imunológicas quando comparadas às proteínas naturais. Trata-se de ser um sistema altamente seguro por utilizar células eucarióticas, estando o gene de interesse sob o comando de um promotor forte do baculovírus. Com o aproveitamento de tantas qualidades no uso do baculovírus como sistema de expressão, o mesmo é utilizado como uma alternativa eficiente para estabelecer insumos diagnósticos e vacinais (RIBEIRO et al., 2015). Seu nome derivado do latim *baculum*, significando bastão, devido ao seu formato. Constituído por uma fita dupla de DNA com seu tamanho variando de 80 até 180 mil pares de base e, contidos nesta sequência genética, estão os promotores de genes não essenciais como a poliedrina, o qual é amplamente utilizado quando se pretende manipular o baculovírus como um sistema de expressão (RIBEIRO et al., 2001).

Como os baculovírus não são patógenos naturais para os mamíferos, não apresentam anticorpos contra este vírus, algo extremamente vantajoso se comparado ao sistema procariótico. Outra vantagem é a ampla utilização de poliedros recombinantes como um sistema de produção de antígeno para o desenvolvimento de vacinas e de testes diagnósticos baseados em ELISA, uma vez que a fusão de genes heterólogos no gene *polh* do baculovírus tenha sido previamente criado para melhorar a produção e a expressão de proteínas para fins de diagnósticos (LÓPEZ et al., 2018).

Portanto, o objetivo do presente trabalho expressar proteínas do vírus CHIKV fusionadas a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV. Os antígenos produzidos serão purificados visando análises quanto a ativação da resposta imune.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA [

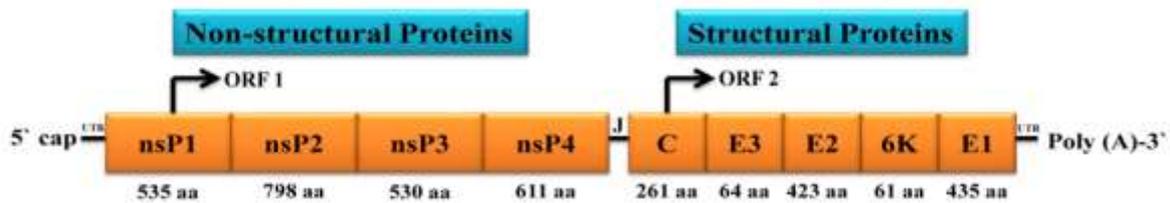
O vírus Chikungunya (CHIKV) caracteriza-se por ser um vírus de RNA sentido positivo, cadeia simples com 11,8 quilobases (kb), pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. O genoma viral codifica quatro proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4), relacionadas à replicação do RNA viral, e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). As proteínas E1 e E2, estão localizadas na membrana viral, para que quando houver brotamento do nucleocapsídeo, estas proteínas se tornem partes da formação dos vírions maduros. Suas partículas icosaédricas, com o tamanho aproximado de 70 nm de diâmetro são revestidas por um envoltório lipídico formados pela inserção das proteínas virais E1 e E2, representados na figura 2 (KRISTY SY et al., 2017; SIMON et al., 2011; VOSS et al., 2010).



**Figura 2:** Representação esquematizada da estrutura dos alphavírus (Fonte [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org)).

O RNA genômico assemelha-se bastante com os mRNA celulares, pois eles possuem uma estrutura *cap* na sua extremidade 5' e uma cauda poliA na extremidade 3' (figura 3). Duas sequências de leitura abertas (ORFs), na qual a primeira ORF ocupa dois terços da extremidade 5' do seu genoma, responsável por codificar as poliproteínas não estruturais que passam por processo proteolíticos. A segunda ORF em questão é separada da primeira por uma região de

junção, ocupa um terço do genoma viral e codifica uma segunda poliproteína responsável pela estrutura viral (PINTO 2013).



**Figura 3:** Esquema representativo do genoma do CHIKV. (Fonte: JASPREET JAIN et al., 2017).

Devido as mutações na região proteica E1, contida no envelope do vírus, em um dos três genótipos da CHIKV circulantes no mundo (o genótipo da África Ocidental, genótipo da África Oriental, Central e do Sul, denominado ECSA, e o genótipo Asiático), existe uma estimativa de que o ancestral comum dos 3 tipos pode ter sido originado a 500 anos. A ECSA, passou por uma mutação específica na posição 226, havendo uma troca da sequência de aminoácidos alanina pela valina, na sequência genética pertencente as glicoproteínas. Esta variante, desde o ano de 2005, tornou-se infectiva e transmitida tanto pelo *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*, causando um imenso surto na região da Ásia, Ilhas do Oceano Índico e Europa (TAUIL, 2014; LAITON-DONATO et al., 2016; DONALISIO., 2015).

No Brasil, estes dois vetores são os responsáveis por desencadear surtos (CHOMPOOSRI et al., 2016; SIMON et al., 2011). Sabe-se que o CHIKV, também é transmitido de forma vertical pelos seus vetores, as fêmeas possuem a capacidade de transmitir o vírus para os seus ovos, desta forma é viável encontrar o mesmo não apenas na saliva das fêmeas, mas também em machos silvestres (CHOMPOOSRI et al., 2016). O primeiro caso que chegou ao Brasil, aconteceu em 03 de setembro de 2010, quando um homem de 55 anos de idade, vindo da Indonésia, apresentou no vôo os sintomas característicos da doença. Foi atendido pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP) e a amostra do paciente foi coletada e enviada para o Instituto Carlos Chagas, confirmando a presença de IgM (Imunoglobulina M) positivo para o vírus Chikungunya, desde então, o número de casos cresceu de forma acelerada, entretanto, por um equívoco, muitos casos foram relatados como dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A realização de um diagnóstico confiável quando se trata da febre chikungunya, torna-se difícil já que as suas manifestações clínicas se assemelham com diversas outras doenças e

infecções virais por arboviroses. Entretanto, a infecção causada pelo vírus CHIKV mais se assemelha a infecção por dengue vírus (PINTO., 2013).

Por estes motivos os métodos de diagnóstico do vírus CHIKV são baseados em exames sorológicos, isolamento viral, reação em cadeia da polimerase reversa em tempo real (RT-PCR) e critérios epidemiológicos associados aos sintomas clínicos sugestivos da doença. Todos os exames laboratoriais, muitas vezes são de difícil acesso para a população que frequenta os hospitais públicos do país, acarretando em um problema a mais quando se trata da liberação de um laudo conclusivo ao paciente. Anticorpos IgM podem ser utilizados para detecção por ELISA após duas semanas do início da infecção, o problema é que em alguns casos os mesmos anticorpos aparecem somente de 6 a 12 semanas após o início da infecção, onde anticorpos IgG aparecem depois dos IgM e podem persistir por anos. Mesmo com todos os cuidados, este procedimento de sorologia é limitado já que o método está suscetível a reação cruzada com outros vírus, graças a sua alta identidade com outros arbovírus, tais como, o vírus mayaro vírus, dengue vírus e o zika vírus (PERPETUA et al., 2016; ESPOSITO et al., 2016).

A técnica de RT-PCR, por ser uma ferramenta altamente sensível para identificar o ácido nucleico viral durante o estágio inicial da doença (5-10 dias após infecção) vem sendo utilizado a partir de amostras do soro dos pacientes infectados. Outra técnica também utilizada para detecção do vírus no início da infecção, seria o isolamento viral, manipulando células de mamífero, tais como C6/36 ou células Vero E6, porém, esta técnica é indicada somente para casos onde o paciente se encontra no segundo dia de infecção e com um laboratório que tenha o isolamento nível 3 de segurança (PINHEIRO et al., 2016; CORRALES-AGUILAR et al., 2015).

Em regiões onde apenas se consegue estabelecer um diagnóstico clínico-epidemiológico do arbovírus, torna-se confuso e diversas vezes não confiável, já que nos seus primeiros dias, pode ser facilmente confundido com diversas outras infecções e patologias como gripe, febre amarela, gastroenterite entre outras (CALVO et al., 2016). Alguns estudos realizados evidenciaram a ineficácia de alguns diagnósticos que atuam na fase aguda da infecção, dos ensaios comerciais baseados em anticorpos ICT SD e MAC ELISA SD, promovendo resultados de sensibilidades extremamente baixos com cerca de 3,9% de exatidão (PINTO., 2013).

Diante do exposto é de extrema importância o desenvolvimento de métodos de diagnóstico inovadores para detecção da infecção por CHIKV no país, permitindo que pacientes sejam diagnosticados com facilidade, confiança, de forma rápida, facilitando também os estudos clínicos e epidemiológicos.

### 3.MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho está sendo desenvolvido em colaboração com Universidade de Brasília (UnB), no laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Instituto de Biologia – IB, sob orientação do Prof<sup>o</sup> Titular Dr Bergmann Morais Ribeiro, Prof<sup>a</sup> Dra Anabele de Azevedo Lima e colaboradores. O financiamento e colaboração foi feita pelo próprio laboratório em questão, pela Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Centro Universitário de Brasília (UniCEUB). Os resultados apresentados no trabalho são de exclusividade dos parceiros citados.

#### 3.1 Isolamento e identificação do gene de interesse

Para o isolamento e a identificação do gene de interesse, foram estabelecidas estratégias *in silico* das regiões imunogênicas do vírus CHIKV, baseado no trabalho de Yiu-Wing Kam et al. (2012). Para isso, o gene de interesse contendo a região de epítipo foi sintetizado pela empresa IDT (*integrated DNA technologies*®). Yiu-Wing Kam et al. (2012) relata quais proteínas presentes no CHIKV conseguem produzir de maneira mais eficientes anticorpos, selecionando assim a glicoproteína E2 e a proteína não estrutural NSP3.

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados para amplificar o fragmento de interesse dos epítipos em questão e os mesmos foram produzidos pela empresa Biomatters Ltda. Nas extremidades dos oligonucleotídeos existem sítios compatíveis para a atuação da enzima de restrição *NcoI*, que foi utilizada na reação de digestão e purificação do fragmento de interesse.

A sequência dos oligonucleotídeos sintetizados são:

CHIKV-F

5' GGATCCCATGGAACAACGTCGTTCAACAAAAGACAATTTTAATG3'

CHIKV-R1

5' GGATCCCATGGTTCCTCCACCAGAACCTCCACCACCATCAGGACA3'

Para a amplificar do DNA de interesse, foi utilizado a enzima GoTaq® Long PCR Master Mix, utilizando a técnica PCR (tabela 1). Seguido da leitura em gel de agarose 1% submetido a eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X, coradas com brometo de etídio,

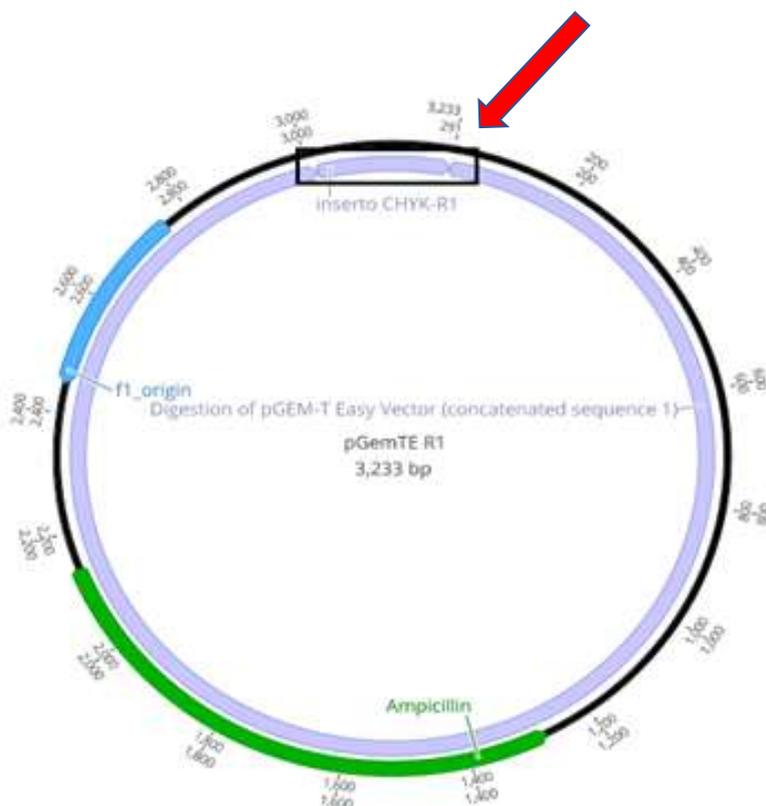
analisado em luz UV e fotografado com o fotodocumentador, de acordo como Sambrook & Russel (2001).

**Tabela 1:** Programa utilizado para amplificação do fragmento de interesse.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>Desnaturação</b>	inicial 95 C	3 min
<b>Desnaturação</b>	94°C	15 s
<b>Anelamento</b>	54° C	20 s
<b>Extensão</b>	72° C	20 s
<b>Extensão final</b>	72 ° C	5 min
<b>Estoque</b>	12° C	∞

### **3.2 Construção dos plasmídeos recombinantes contendo as regiões multiepítipo do envelope do vírus CHIKV**

A região do gel contendo o fragmento de interesse foi purificado com o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE). O DNA purificado foi submetido a reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase, onde utilizou-se o plasmídeo comercial pGEM® T-easy (Promega) previamente digerido com *NcoI* conforme as instruções obtidas com o fabricante, na proporção de 3:1 (inserto:vetor), utilizando 100 ng do vetor e 300 ng do inserto (figura 4) A reação foi incubada por um período de 12 horas a 4°C. E, seguida, a reação de ligação foi transformada em células DH10β por eletroporação. Semeadas em meio LB sólido contendo apenas o antibiótico de seleção ampicilina (50 mg/mL).

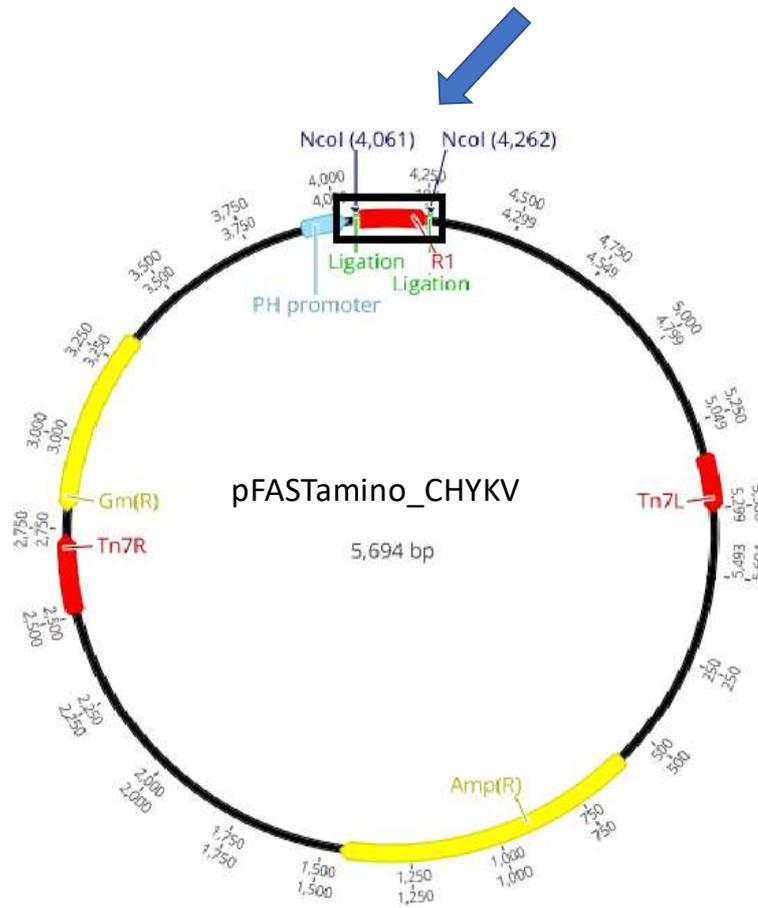


**Figura 4:** Mapa estrutural da construção do vetor comercial pGEM® T-easy, onde o inserto R1 recombinante foi clonado no mesmo. Os sítios de restrição e o gene de resistência a ampicilina estão contidas na figura. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Após o crescimento das colônias, as mesmas passaram por um procedimento de purificação plasmidial, utilizando o kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acordo com protocolo estabelecido pela empresa. Em seguida, o DNA purificado foi digerido com a enzima de restrição *Nco*I, para liberação de um fragmento equivalente a 205 pares de base (pb), o qual foi analisado e confirmado com a leitura utilizando gel de agarose a 1%.

Após a confirmação em gel de agarose, o inserto foi ligado no vetor o pFAST-amino (figura 5). Uma vez fusionado o gene heterólogo no vetor pFAST-amino fez-se a transformação por eletroporação em células *E. coli* DH10β. A construção deste plasmídeo foi realizada contendo genes de resistência para ampicilina, gentamicina e os cassetes de expressão Tn7, os quais são marcadores de transposon bacteriano. Seu crescimento ocorreu em placas contendo meio LB-ágar sólido com ampicilina (50 mg/mL) e gentamicina (7 mg/mL). Sua devida confirmação foi realizada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos

específicos CHIKV-R1 e CHIKV-F, seguido de sequenciamento da sequência dos possíveis clones.



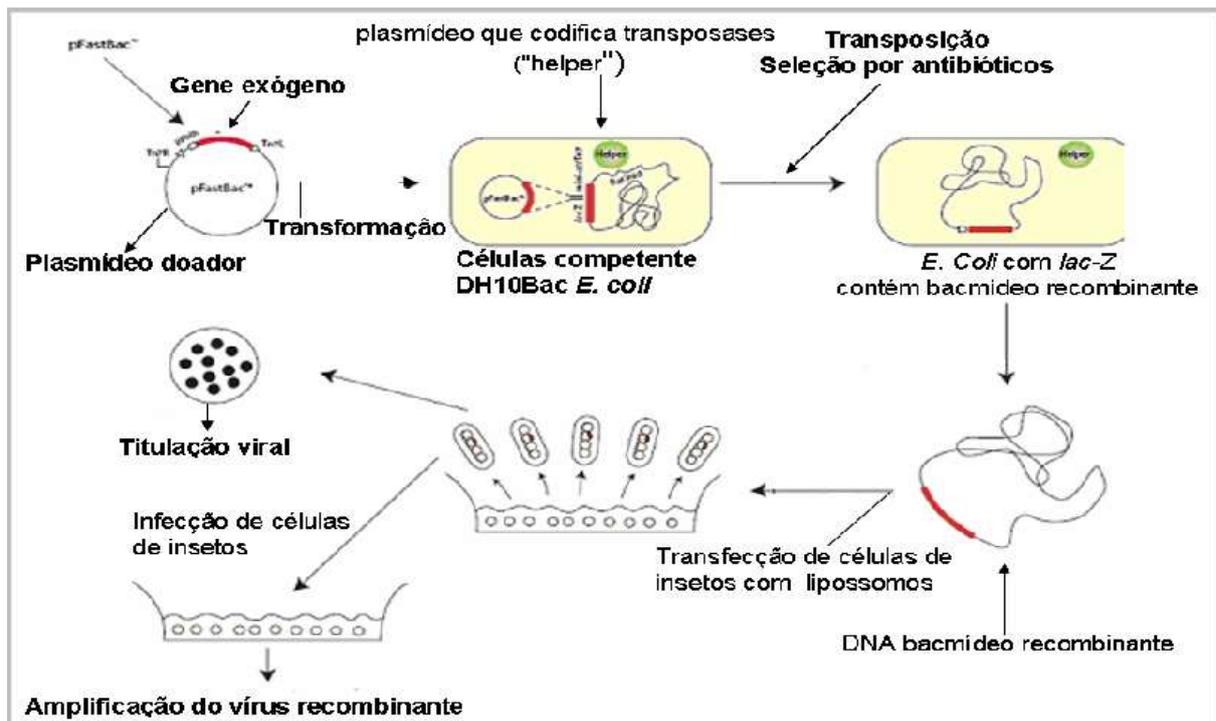
**Figura 5:** Desenho estrutural do vetor de transferência comercial pFAST-amino clonado ao inserto de interesse (R1), contendo sítio de clonagem e restrição pela enzima *NcoI*, promotor da poliedrina, sítio de transposição bacteriano Tn7R e Tn7L e genes de resistência a gentamicina (Gm) e ampicilina (Amp). Fonte: elaborado pelo autor (2017).

### 3.3 Construção dos baculovírus recombinantes contendo as regiões multiepítipo do envelope do vírus CHIKV

O sistema de expressão chamado bac-to-bac™, foi desenvolvido em 1990 pelo pesquisador Luckow, este método se faz uso de regiões Tn7, contidas em bactérias *E. coli* DH10BAC, o qual vai interagir com o vetor pFAST-amino, onde o DNA de interesse será clonado. Contido dentro desta cepa de *E. coli* está todo o conteúdo genômico do baculovírus AcMNPV, conhecido como bacmídeo. Este bacmídeo é construído através da transposição das regiões específicas Tn7 contidas no vetor que serão doadas, havendo uma troca com as regiões

Tn7 presentes no bacmídeo. Surgiram colônias brancas e azuis na placa, das quais as colônias brancas foram coletadas, elas possuem o gene lacZ interrompido pelo fragmento gênico que foi transposto. Por consequência disso, o gene lacZ pertencente ao bacmídeo não consegue realizar de maneira eficaz a deleção do cromossomo bacteriano (figura 6). Entretanto, as colônias que apresentam coloração azulada, seu gene permanece intacto, viabilizando a clivagem do substrato do x-Gal. As colônias utilizadas foram coletadas com um palito de dente e depositadas em meio LB líquido com 10 uL de canamicina, 1 uL de gentamicina e 1 uL de tetraciclina, em agitação por 12 horas. O DNA plasmidial foi adquirido usando a técnica de lise alcalina, conforme o protocolo da empresa. Sua confirmação ocorreu utilizando PCR com os oligonucleotídeos M13R 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3', M13F 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e CHIKV-F.

As células DH10BAC contendo o gene AcMNPV do baculovírus em um cromossomo artificial, trata-se de ser quimiocompetente e foram utilizadas para transformar o plasmídeo pFastBac-R1, por meio da técnica choque elétrico. 500 ng da amostra plasmidial, juntamente com 100 uL da bactéria foram incubadas por 30 minutos, logo após esse tempo, sofreram choque térmico, entrando em contato com 42°C por exatos 2 minutos e, de forma imediata foram depositadas por 10 minutos no gelo. Adicionou-se meio LB, 1 mL, e foram incubadas por 4 horas a 37°C. Seu inóculo foi realizado em meio LB-ágar, com 5 µL L de tetraciclina, 5 µL de gentamicina, 35 µL de canamicina, 20 µL de IPTG e 30 µL de X-GAL. O crescimento bacteriano ocorreu por 48 horas. O material genético foi extraído por kit, e os fragmentos de interesse gerados foram devidamente analisados com um gel de agarose 1%.



**Figura 6:** Esquema representativo do sistema Bac-to-Bac para a construção dos baculovírus recombinantes. (Fonte: Invitrogen)

### 3.4 Expressão da proteína recombinante em células de inseto:

O clone construído por múltiplos epítomos do vírus Chikungunya agora fusionado ao gene do baculovírus foi purificado com o uso do SDS 0.5% com múltiplas lavagens, seu produto final foi envolto por lipossomos artificiais (Cellfectin II, INVITROGEN), logo em seguida, foi transfectado em culturas de células de inseto da ordem Lepidoptera, *Trichoplusia ni* (Tn5B) (GRANADOS et al., 1994). O meio contendo células infectadas pelo vírus recombinante, foi centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm, formando um sedimento celular e concentrado todas as partículas virais no sobrenadante. O mesmo sobrenadante foi coletado para agora infectar células Tn5B, aumentando a quantidade de título viral e proteínas de importância. Três dias após a infecção (dpi), às células foram coletadas e centrifugadas novamente, na mesma proporção de tempo, no entanto, as mesmas passaram por um processo de múltiplas lavagens com Triton 0,25% para que haja purificação dos poliedros.

A confirmação da proteína de interesse foi realizada com um gel de poli-acrilamida a 12% (SDS-PAGE) e em seguida, foi feito o *western blot*, utilizando o anticorpo anti-histidina, diluído 10.000 vezes em PBS. O vetor plasmidial pFAST-amino possui o promotor da poliedrina e a região codante do gene de interesse, uma localidade chamada cauda de histidina

e, a partir dela, o anticorpo primário vai se ligar a um anticorpo secundário, anti-mouse, o qual foi diluído da mesma forma que o primário.

### **3.5 Análise das proteínas de interesse por microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a purificação dos poliedros recombinantes**

Trinta microlitros dos cristais proteicos purificados receberam o mesmo volume de acetona 100%, e foram incubados em temperatura ambiente por cerca de 45 minutos. A amostra foi espalhada no suporte porta-amostra do microscópio (*stub*), o mesmo foi colocado em temperatura ambiente novamente e observado até que esteja completa a secagem da amostra. Em seguida, uma fina camada de ouro foi depositada nas amostras pelo tempo de 90 segundos, através do metalizador Leica modelo EM SCD500, para tornar o material como um bom condutor térmico e elétrico. A devida visualização das amostras ocorreu no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-70014 Field emission Scanning Electron Microscope).

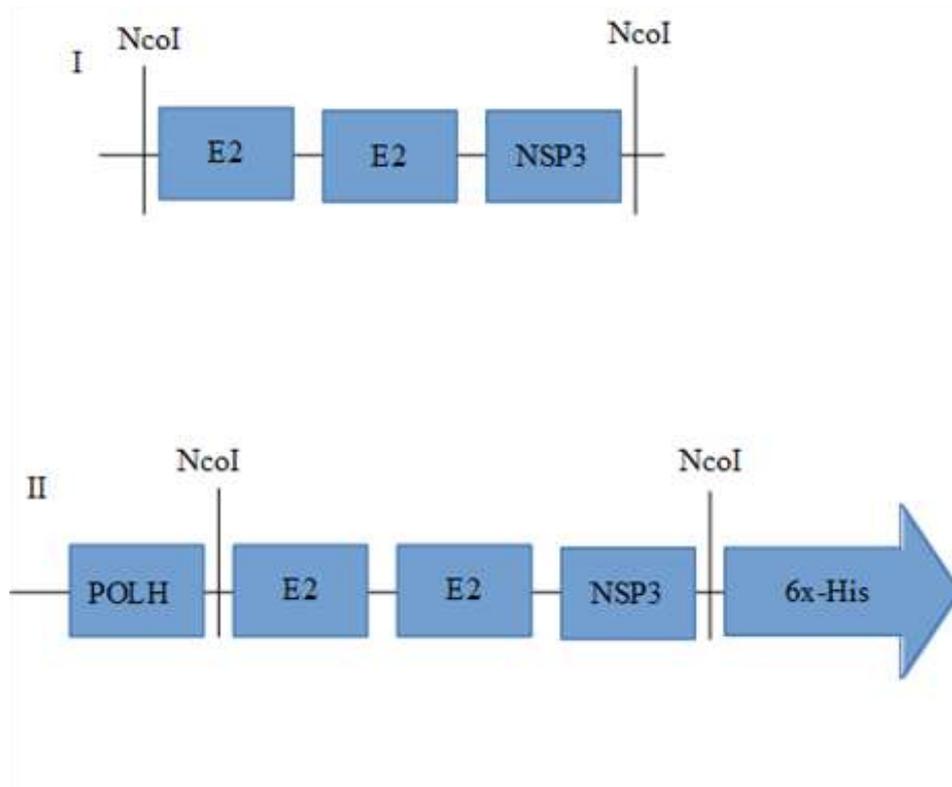
### **3.6 Imunoensaio enzimático**

Os cristais fusionados com construtor da estratégia R1 (regiões epítipo do gene E2 /NSP3) purificados foram devidamente quantificados utilizando o Quant-iT™ assay kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados testes sorológicos imunoenzimáticos. Para a realização da análise dos cristais fusionados com poliedros R1 purificados poderiam ser utilizados como insumos diagnósticos no desenvolvimento de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) indireto, método que se baseia na interação do antígeno-anticorpo. Foram testados em diferentes diluições, entre 1:25, 1:50 e 1:100. Os poços que constituem as placas do ELISA foram sensibilizados com 50µL do antígeno fusionado à poliedrina. Após a encubação por 37°C por uma hora, utilizamos como controle negativo a poliedrina fusionada apenas ao vetor PfAST\_Amino. Todo o protocolo técnico restante do ELISA foi realizado seguindo as orientações de Silva (2016), onde foram utilizados 4 amostras de pacientes cedidas gentilmente pela Fiocruz.

## 4. RESULTADOS

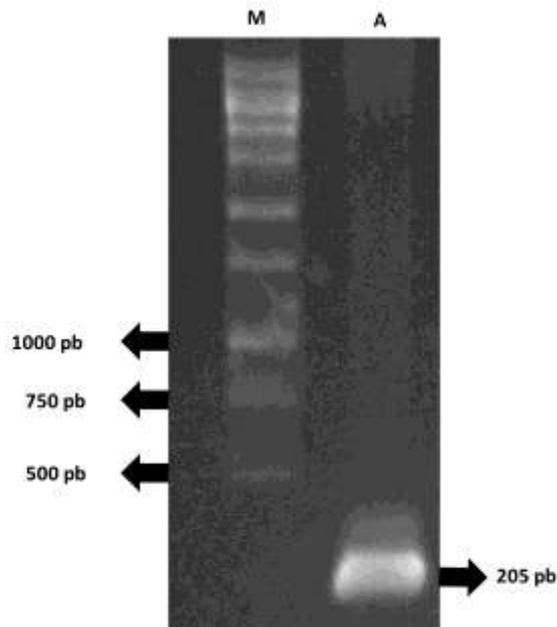
### 4.1 Isolamento e identificação do gene de interesse:

O fragmento R1 foi construído utilizando peptídeos imunogênicos presentes no CHIKV, a partir de duas repetições do gene E2 e uma do NSP3, o mesmo foi sintetizado contendo em suas extremidades sítios de digestão para a enzima *NcoI* (figura 7).



**Figura 7:** Esquema representativo mostra a estratégia do isolamento do gene sintético (I) e a construção do baculovírus recombinante (II). Duas repetições dos epítomos de interesse da proteína estrutural E2 e uma da proteína não estrutural NSP3 foram utilizadas para sintetizar o construtor de interesse, enquanto são flanqueadas por sítios de restrição da enzima *NcoI* (I). Na representação II mostra como o inserto se encontrará quando for inserido no genoma do baculovírus AcMNPV, o qual será encontrado sob o comando do promotor forte de fase tardia *polh*, e a cauda 6x-Histidina será utilizada para a sua confirmação. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

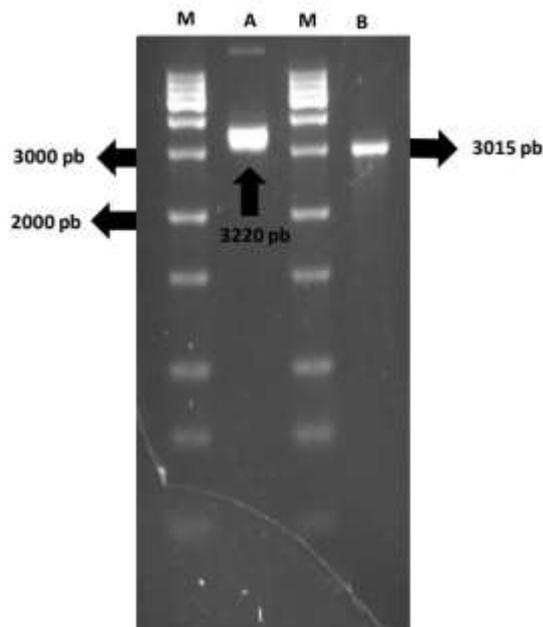
O fragmento de DNA sintetizado utilizando multiepítomos foi amplificado por PCR com uso de oligonucleotídeos específicos contendo sítios de restrição para a enzima *NcoI* em suas extremidades. Em seguida, foi aplicado eletroforese com gel de agarose 1%, apresentando o fragmento com 205 pares de base (figura 8).



**Figura 8:** Amplificação por PCR e confirmação do inserto, apresentando o tamanho de 205 pb, codificando o multiepitópo de interesse R1 em gel de agarose 1% representado no poço A. O poço M, representa o marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega). Fonte: elaborado pelo autor (2017).

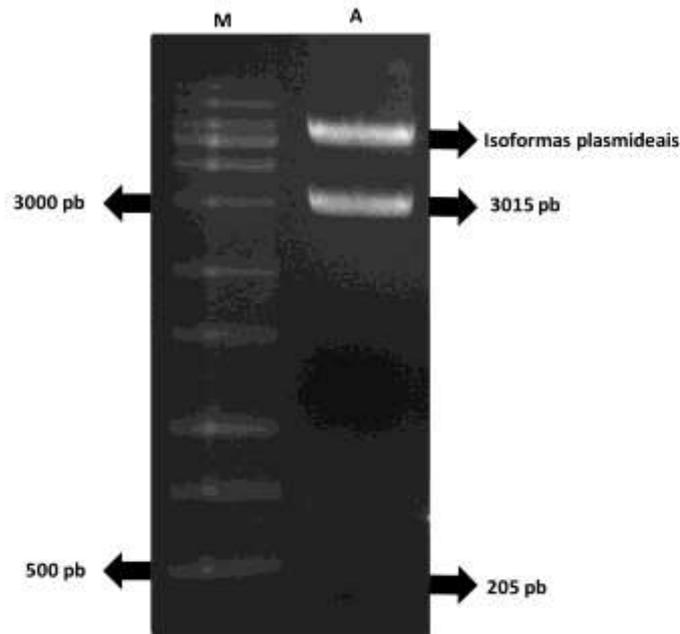
#### **4.2 Construção do plasmídeo pGEMR1:**

Após amplificado o gene de interesse, o inserto foi clonado no vetor comercial pGemT-easy e cepas da bactéria *E. coli* DH10B foram utilizadas para transformação e amplificação dos clones de interesse. Sua confirmação ocorreu por meio do gel de agarose 1% apresentando uma banda correspondente a 3.220 pb, logo em seguida, foi utilizado o vetor já linearizado com a enzima *NcoI* para colaborar com a confirmação e comparação. É possível observar o fragmento de 3.015 pb do processo de digestão, liberando o inserto do vetor (figura 9).



**Figura 9:** Análise da confirmação do clone pGEMR1 através do Gel de Agarose 1%, mostrando no poço A, a banda correspondente ao tamanho de 3220 pb, enquanto que, o poço B, está representado pelo vetor digerido com a enzima *NcoI*, apresentando 3015 pb. No poço M, está presente o marcador molecular 1 kb DNA ladder (Promega). Fonte: elaborado pelo autor (2017).

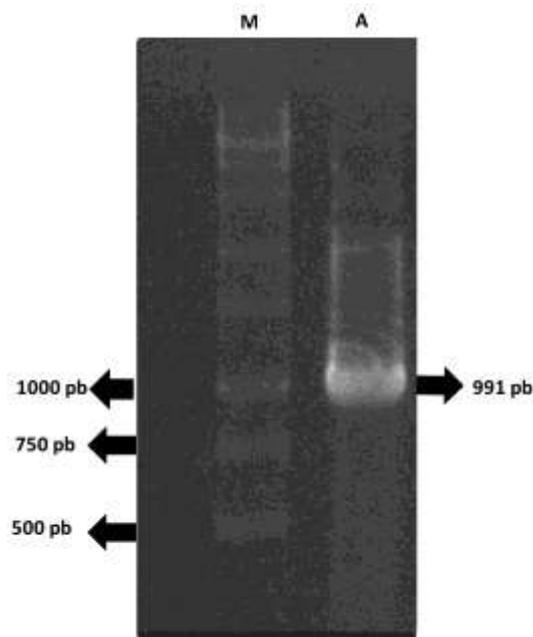
Após a visualização da clonagem do inserto R1 com o vetor comercial pGemT-easy no gel de agarose, o gene de interesse passou por uma etapa de confirmação por digestão com a enzima de restrição *NcoI*, a reação durou cerca de 4 horas. Devido ao tempo de reação ter sido curto, a enzima de restrição não conseguiu efetuar totalmente a sua função, deste modo, o gel de agarose apresentou 3 bandas, sendo que a primeira contém várias isoformas do vetor clonado com o inserto, a segunda banda corresponde a 3015 pb, tamanho esperado do vetor em sua forma linear e a terceira banda é composta somente pelo inserto com 205 pb (figura 10).



**Figura 10:** Confirmação da clonagem em Gel de Agarose 1% utilizando enzima *NcoI* para liberar o inserto de 205 pb, fazendo o mesmo apresentar 3015 pb (poço A), sendo este, o vetor comercial pGemT-easy linearizado. Poço M, marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega).  
Fonte: elaborado pelo autor (2017).

#### 4.3 Clonagem do inserto de interesse no vetor pFAST-amino:

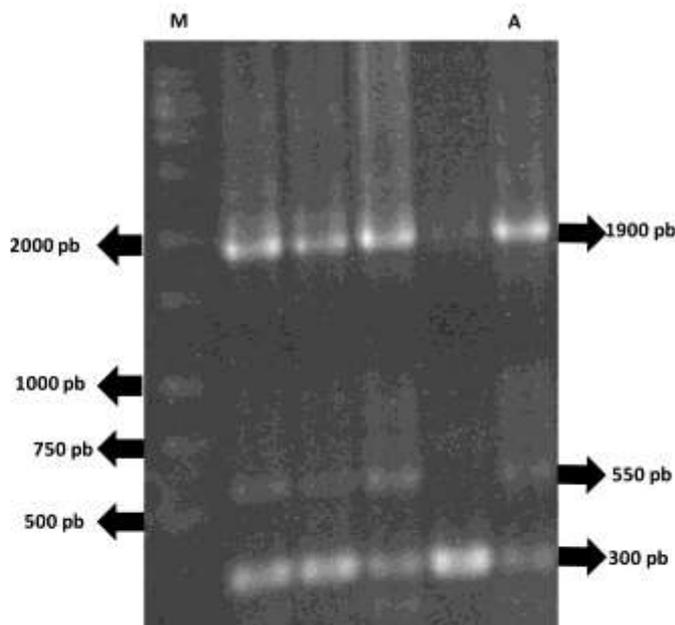
Após a obtenção do plasmídeo recombinante, o fragmento de interesse foi removido e clonado no vetor pFAST-amino. A confirmação desta clonagem foi realizada utilizando a técnica de PCR com oligonucleotídeos, amplificando um fragmento de 991 pb (figura 11).



**Figura 11:** Gel de agarose 1% confirmando a amplificação por PCR da ligação entre o pFAST-amino com o inserto R1. Os oligonucleotídeos utilizados apresentam no final da amplificação uma banda 991 pb (A). M representa o marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega). Fonte: elaborado pelo autor (2017).

#### **4.4 Subclonagem do vetor pFAST-aminoR1 em bacmídeo:**

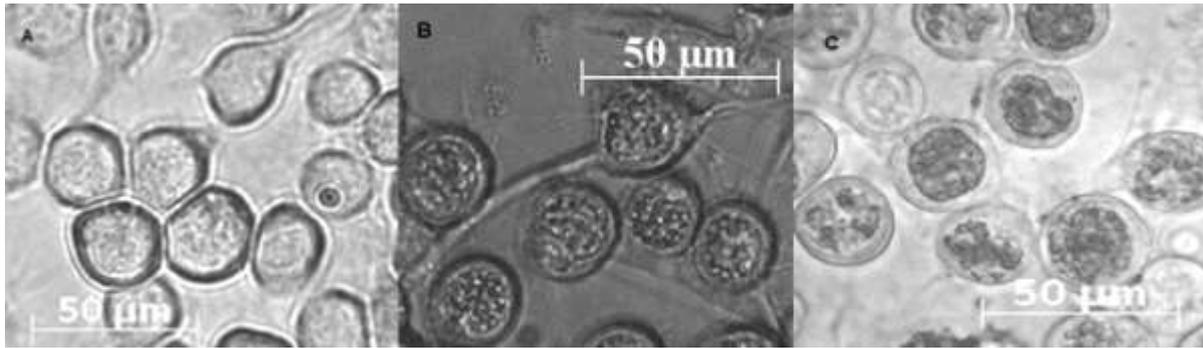
Das mais diversas colônias que cresceram, o uso da interrupção do gene LacZ, responsável por gerar colônias bacterianas com a coloração branca, serve primordialmente como um mecanismo de confirmação de clonagem, além disso, antibióticos também são utilizados, descritos no item 2.3, entretanto, a confirmação mais confiável se dá pelo uso dos oligonucleotídeos M13 em reação de PCR. Como estão presentes antes da região de transposição do bacmídeo, este método torna-se eficiente para verificar se realmente houve a transposição das regiões específicas da bactéria para o bacmídeo recombinante. O oligonucleotídeo CHIK-F também foi incluído na PCR para verificar a presença do inserto (figura 12).



**Figura 12:** Gel de agarose 1%. Neste gel, apenas a amostra do poço B foi escolhida para dar continuidade ao projeto por apresentar resultado satisfatório, sendo que, foi utilizado em sua PCR os primers M13 indicados pelo fabricante, para produzir o fragmento de 1900 pb, nesta mesma técnica, foi utilizado o oligonucleotídeo CHIK-F para sintetizar o fragmento de 550 pb e por fim, o fragmento de 300 pb corresponde a algumas colônias que não são clones. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

#### 4.5 Transfecção do bacmídeo em cultura de célula Tn5B:

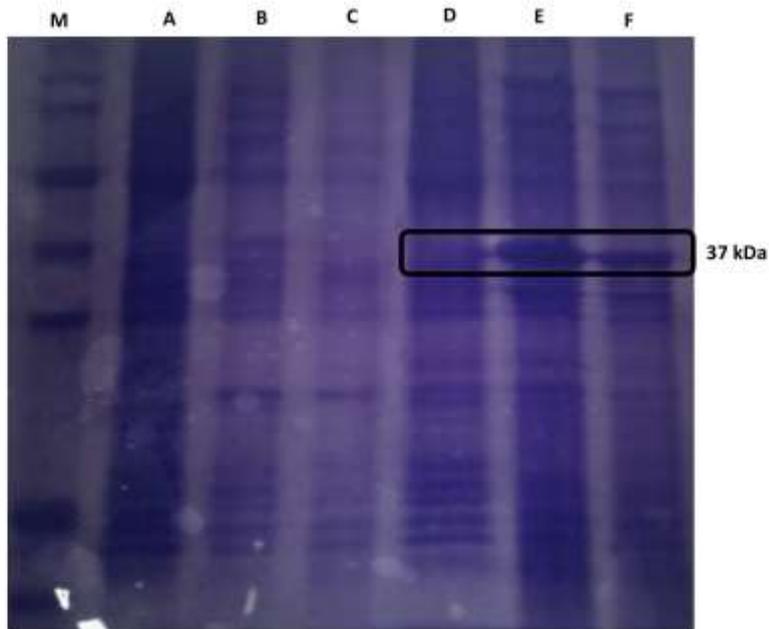
Após a confirmação do bacmídeo recombinante, o mesmo foi purificado e transfectado em células de inseto *Tn5B*, desta forma, foi possível acompanhar o seu efeito citopatológico por até 72 horas, podendo também observar a evolução da infecção e produção das partículas infectivas do vírus. Nas primeiras 24 hpi, foi possível observar sinais celulares iniciais de uma infecção, 48 hpi, os poliedros estavam claramente visíveis e nas 72 hpi, é facilmente possível diferenciar a formação de poliedros individuais de formação da massa proteica (figura 13).



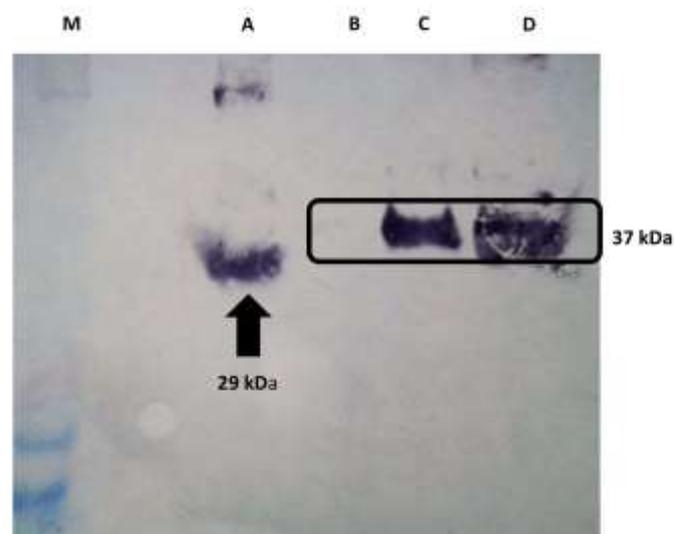
**Figura 13:** células de *Trichoplusia ni* infectadas com o vírus transgênico. A - Corresponde a 24 h p.i.; B - 48 h p.i.; C - 72 h p.i. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

#### **4.6 Confirmação da expressão da proteína de interesse do CHIKV fusionada na poliedrina.**

O DNA do bacmídeo recombinante foi utilizado para transfectar células Tn5B como descrito anteriormente. As células foram coletadas no período de 24 h p.i., 48 h p.i. e 72 h p.i., para confirmar a expressão da proteína recombinante com o tamanho esperado de 37 kDa. Sua devida confirmação foi realizada através da eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (figura 13), em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e imuno marcadas com anticorpos anti-his e anti-mouse. Indicando pela técnica de *western blot* a expressão da proteína heteróloga em células de inseto (figura 14).



**Figura 13:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), apresentando como M, sendo o marcador de peso molecular. A – Mock de extrato de células de Tn5B não infectadas. B – células *Tn5B* infectadas com o AcMNPV selvagem. C – células *Tn5B* infectadas com AcMNPV fusionado com o pFAST-Amino. As amostras dos poliedros pertencentes aos poços B e C, foram perdidas no processo de semipurificação, deste modo, as mesmas não aparecem no gel mostrado. D – R1 mais a poliedrina em 24 hpi. E – R1 mais poliedrina em 48 hpi. F – R1 fusionada a poliedrina em 72 hpi. As amostras presentes nos poços E e F apresentaram exatos 37 kDa. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

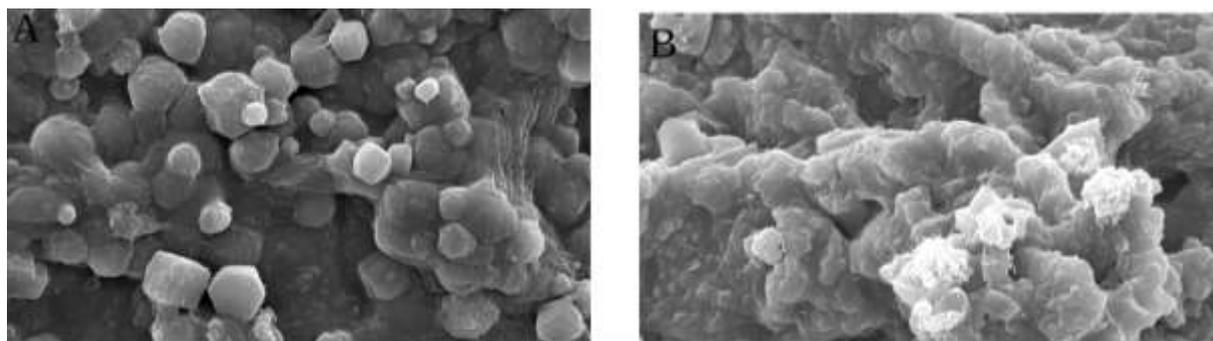


**Figura 14:** Marcação da proteína expressa com os anti-corpos. M referindo-se ao marcador de peso molecular, A – controle negativo de células Tn5B, infectadas com AcMNPV selvagem, apresentando 29 kDa. B – purificação da poliedrina fusionada ao R1, com 24 h p.i. C – R1 mais a poliedrina com 48

h p.i., apresentando 37 kDa. D – poelidrina com o R1 em 72 hpi, também apresentou 37 kDa. Fonte: elaborado pelo autor (2017).

#### 4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na análise dos cristais proteicos foi possível observar que por mais que estas proteínas possuam a densidade molecular semelhantes entre si, entre o poliedro fusionado ao vetor Pfast Amino e o poliedro fusionado a proteína de interesse, elas apresentam uma conformação morfológica totalmente distintas e tamanhos diferenciados se comparados. Os cristais recombinantes são notavelmente menores, formadores de grumos proteicos, enquanto que a proteína fusionada ao Pfast Amino forma cristais com conformações bem delimitadas e independente entre eles, não apresentando grumos (figura 15).

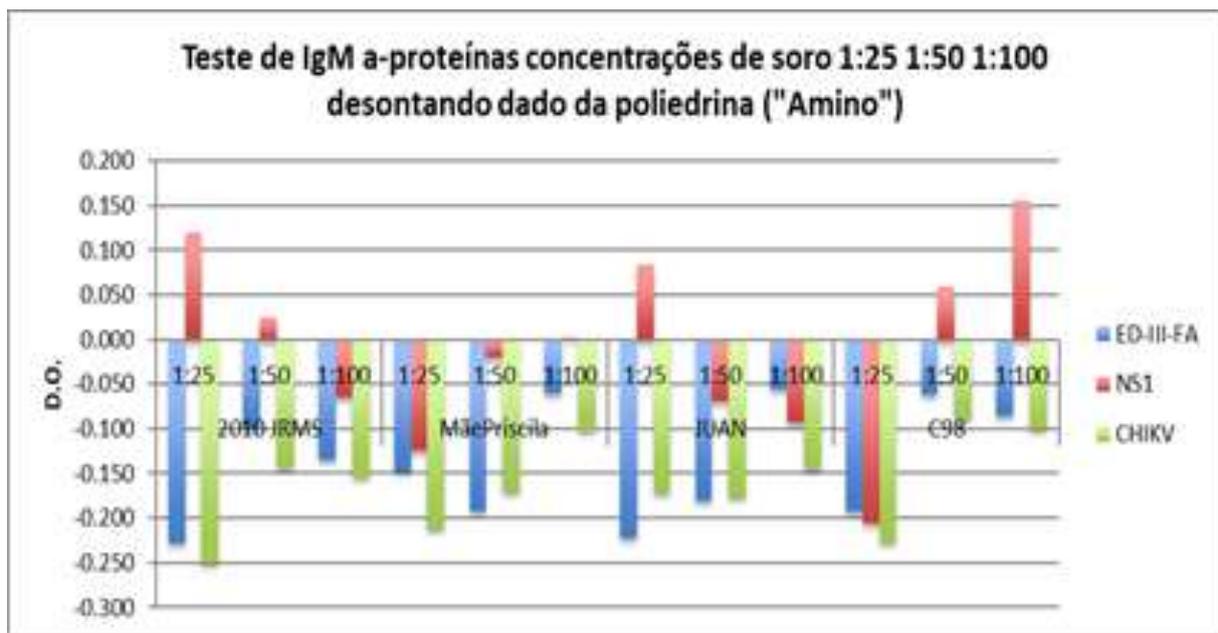


**Figura 15:** Análise por microscopia eletrônica de varredura dos cristais produzidos pelo baculovírus recombinante expressando a proteína de interesse. Em A, estão contidos os poliedros fusionados ao vetor comercial Pfast\_Amino; na imagem B os poliedros fusionados ao gene sintético R1. (Fonte: elaborado pelo autor ,2018).

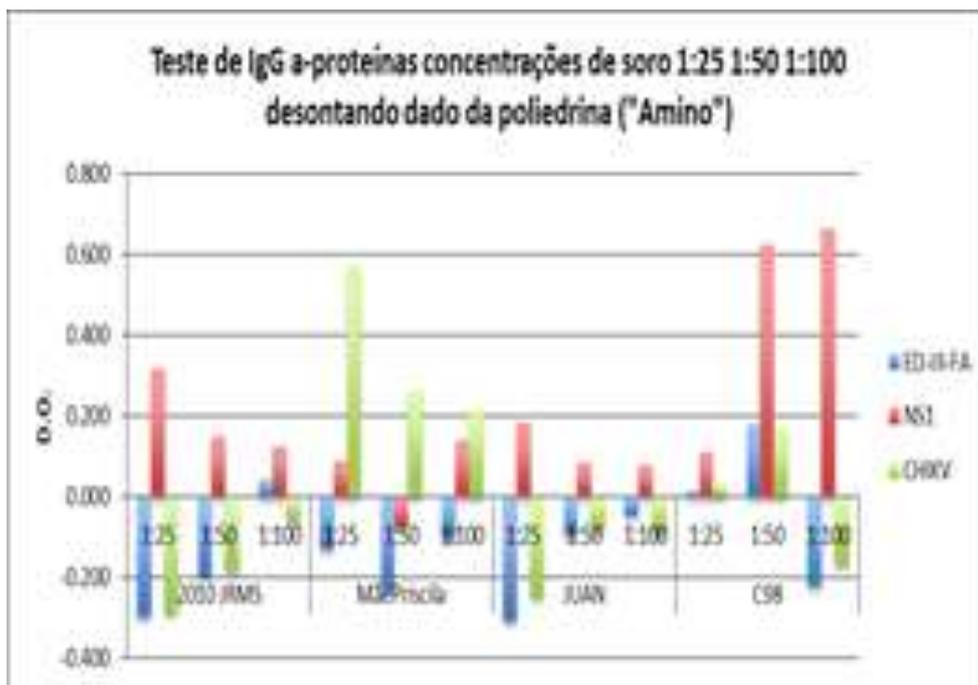
#### 4.8 Ensaio imunoenzimático indireto

Os corpos de oclusão fusionados a proteína de interesse foram testados com amostras de soros de pacientes para verificar o nível de interação e reconhecimentos contra anticorpos IgM (figura 16) e IgG (figura 17) específicos para Chikungunya. Os imunoenaios foram preparados na Instituição parceira Fiocruz. O teste avaliou amostras de 4 pacientes, o primeiro paciente (2010 JRMS), nunca tinha entrado em contato com o CHIKV e zika, mas estava com infecção confirmada para dengue, a segundo paciente (Mãe Priscila) apresentava

sintomatologia clássica para febre chikungunya, sua infecção foi confirmada por testes moleculares prévios. O terceiro paciente (JUAN) apresentava anticorpos IgG para dengue e o último soro da quarta paciente (C98) pertencia a uma mulher grávida infectada somente pelo vírus Zika. Para a realização deste experimento, três concentrações distintas de proteínas foram utilizadas (1:25, 1:50 e 1:100), sensibilizadas nas cavidades dos poços do Elisa indireto. Utilizamos como controle negativo os corpos de oclusão fusionados ao vetor Pfast Amino.



**Figura 16:** Teste ELISA indireto para detecção de IgM, a partir de soro de pacientes infectados.



**Figura 17:** Teste ELISA indireto para detecção de IgG, a partir de soro de pacientes infectados.

## 5. DISCUSSÃO

O vírus Chikungunya tem a capacidade de emergir, ressurgir e espalhar rapidamente por diversas áreas devido aos seus vetores serem amplamente distribuídos por todo o globo e por viajantes infectados serem reservatórios do CHIKV. Não existem medicamentos específicos contra o CHIKV, aqueles que apresentam a sintomatologia são tratados com fármacos anti-inflamatórias não-esteróides, fluidos e medicamentos para aliviar sintomas de febre e dor (TAUBITZ et al., 2007).

Sabemos que a vacinação se tornou um meio para prevenir infecções, porém, nenhuma vacina até o momento foi capaz de impedir a infecção por chikungunya. Além disso, as reações cruzadas presentes nos exames imunológicos causados pelos Alphavírus, devido aos sítios antigênicos semelhantes entre este gênero viral, caracterizam uma limitação. Entretanto, a infecção por CHIKV mostra produzir uma reação imunológica duradoura e, em relação a outros Alphavírus, o sistema imunológico consegue produzir uma resposta imune parcial. Estratégias biotecnológicas precisam ser tomadas para que exista a possibilidade de desenvolver sistemas diagnósticos mais específicos e sensíveis, como também, insumos vacinais (DESSAIN et al., 2008, EDELMAN et al., 2000).

O sistema de expressão em baculovírus é bastante estudado e inquestionável quando se trata de sua eficiência, com alto potencial para expressar proteínas de diversos tamanhos, das mais simples às mais complexas, produzindo modificações pós-traducionais como a glicosilação, sendo uma das mais importantes, permitindo que as proteínas expressas tenham grande taxa de semelhança biológica e imunológica quando comparada à proteína natural. Outras alterações como dobramento correto, formação de pontes dissulfeno e adição de fosfatos também ocorrem (RIBEIRO et al., 2001, ZHENG et al., 2004).

Neste trabalho, a expressão foi controlada por um forte promotor, conhecido como promotor do gene *polh*, garantindo a expressão não somente da poliedrina, como também a proteína heteróloga de 8 kDa. A poliedrina é a principal proteína presente no corpo de oclusão do baculovírus, permitindo que a região responsável pela sua expressão seja uma ótima estratégia para a inserir um gene responsável por sintetizar uma proteína heteróloga. Após obter os poliedros fusionados com a proteína de interesse, a mesma poderá ser facilmente separada do corpo de oclusão utilizando centrifugação e gradiente de sacarose, outra vantagem desse sistema de expressão é o baixo custo e a pureza do material coletado (ARDISSON-ARAÚJO et al., 2013; DATAL et al., 2005).

Os baculovírus estão dentro do maior grupo de vírus que infectam invertebrados, pertencem à família Baculoviridae, apresentam DNA de fita dupla, são altamente específicos para com seus hospedeiros, sendo em sua maioria insetos da ordem Lepidoptera. Devido a sua especificidade com as células de inseto, o seu manuseio no processo de clonagem traz consigo riscos mínimos. Seu uso na medicina como agentes terapêuticos profiláticos e diagnósticos se dá pelo fato do mesmo apresentar genes de hiperexpressão, garantindo que durante a infecção genes heterólogos sejam expressados em grande escala (RIBEIRO et al., 2001; BARROS, 2007).

A proteína recombinante R1 foi expressa com sucesso em células de inseto *Tn5B* utilizando a estratégia BAC-TO-BAC. Esta mesma proteína foi visualizada pelo SDS-PAGE e detectada pelo *western blot*. O baculovírus recombinante estava sob o comando do promotor viral forte, o *polh*. É sabido que os genes E2 e NSP3 do vírus Chikungunya já foram expressos corretamente em trabalhos anteriores, entretanto, nenhum deles utilizou repetições das regiões antigênicas como as que foram descritas neste trabalho, a qual apresentou uma produção alta de proteínas com propriedades imunogênicas.

A proteína R1 foi fusionada a poliedrina na porção amino-terminal, do baculovírus AcMNPV, utilizando o vetor comercial pFAST-amino, que contém o gene do promotor da

poliedrina do AcMNPV. Os sítios de transposição Tn7 presentes na bactéria *E. coli* DH10BAC que contém o genoma completo do AcMNPV e no vetor comercial, auxiliam diretamente na produção do bacmídeo recombinante, através da transposição que ocorre entre o pFAST-amino e a bactéria DH10BAC (RIBEIRO et al., 2015).

O bacmídeo é constituído também pela região replicon mini-F, o gene de resistência a gentamicina, canamicina, tetraciclina e um fragmento de DNA que possibilita a codificação do peptídeo LaZ. É importantíssimo ressaltar que ao pegar uma colônia que contenha o bacmídeo recombinante, ela não esteja contaminada por bactérias que não houveram a transposição do gene de interesse, desta forma, será possível garantir uma máxima expressão das proteínas heterólogas (INVITROGEN, 2015).

O oligonucleotídeo M13F e M13R garantem a devida confirmação e identificação de bactérias não recombinantes, utilizando a técnica PCR, havendo um resultado altamente sensível, como mostrado na figura 8.

A fusão deste gene fusionada a poliedrina, produziu um fenótipo não muito estável, quando se utiliza detergentes iônicos. Logo nas primeiras 24 após a infecção celular, foi observado uma pequena produção de corpos de oclusão da poliedrina, em poucos casos, o mesmo estava contido em uma massa proteica disforme, enquanto que, o interior do núcleo de outras células era habitado por poliedros bem formados, indicando que a expressão e produção correta dos poliedros não foi afetada, como mostra a figura 10. Contudo, os epítomos antigênicos foram demarcados por anticorpos específicos no *western blot*, de acordo com a figura 11, indicando a correta expressão da proteína heteróloga de interesse e fusão da região de interesse ao gene *polh* do AcMNPV na região amino-terminal.

Apesar de a proteína recombinante se apresentar em grumos quando observados no MEV mostrados na figura 16, este feito não alterou seu objetivo final de ser utilizado como antígeno no método de Elisa indireto. Quando a amostra foi utilizada para sensibilizar as placas de 96 poços de poliestireno do Elisa, foi possível observar no soro da paciente conhecida como Mãe da Priscila o devido reconhecimento de anticorpos do tipo IgG encontrados somente na paciente, já que a mesma se encontra infectada pelo CHIKV, não apresentando reação cruzada, já que mesmo os outros pacientes infectados por arbovírus, não houve reconhecimento antígeno-anticorpo nas suas amostras, enquanto que, quanto testados contra anticorpos do tipo IgM, os mesmos não foram reconhecimento, fato que também ocorreu na paciente infectada por CHIKV, já que seu estado de infecção não se encontrava no estado agudo, a paciente não apresentava mais anticorpos IgM. Graças a isso, a imunodecção realizada neste trabalho foi

feita com sucesso, possibilitando que esta estratégia viabilize a produção de kit para diagnóstico por um menor custo e utilização em grande escala.

No trabalho de Metz (2013), ele foi capaz de produzir um baculovírus recombinante para expressar partículas semelhantes ao vírus (VLP) utilizando a poliproteína estrutural do CHIKV. A sequência que codifica esta poliproteína foi fusionada ao gene responsável por expressar a poliedrina do AcMNPV, o sistema de expressão BAC-TO-BAC foi escolhido pelo autor da pesquisa devido à segurança e viabilidade que a mesma traz. Os resultados obtidos foram satisfatórios, sendo que as proteínas VLP foram expressadas corretamente e forneceram proteção completa contra a viremia e a doença artrítica de CHIKV em um modelo de rato após uma única aplicação do VLP. Expondo resultados que colaboram com o fato da proteína E2 produzir uma resposta imunológica satisfatória, possibilitando assim a produção de um insumo vacinal.

Cho B (2008), relata o uso das glicoproteínas estruturais do CHIKV expressos em um sistema de Baculovirus recombinante, produzindo uma proteína recombinante derivada do seu capsídeo, pode ser amplamente utilizado para o desenvolvimento de um kit diagnóstico que não apresente reação cruzada com a Dengue, apresentando uma sensibilidade maior que 87%.

Estudos como o do Kuo (2011), provam que o sistema Baculovirus de expressam podem ser utilizados para o estudo e observação de características específicas de cada proteína estrutural presente no vírus Chikungunya, para descobrir quais substâncias exatas são necessárias para que haja a fusão da membrana causada pela glicoproteína E1, a qual foi classificada como uma fusão de membrana classe 2.

Os resultados demonstram o quanto é eficiente utilizar o sistema BAC-TO-BAC e a eficiência do processamento e expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus e células de inseto.

Este método de detecção de anticorpos proposto apresenta vantagens em relação aos métodos já tradicionais, acredita-se que esta estratégia apresente grande sensibilidade e especificidade, já que não apresentou reação cruzada com outros vírus e reconheceu os devidos anticorpos contra CHIKV. Porém, ainda é necessário realizar mais experimentos imunológicos com uma quantidade maior de soros de pacientes infectados, no entanto, tem grandes chances de se tornar uma estratégia inovadora que possibilitará a detecção da infecção, minimizando as reações cruzadas e falsos negativos, possibilitando um melhor tratamento para todos aqueles acometidos pela febre chikungunya, podendo favorecer a saúde pública do Brasil e do mundo.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Tendo à devida consciência da importância e problemas que a infecção por CHIKV está trazendo à população mundial é de suma necessidade o desenvolvimento de estratégias que possibilitam a criação de um diagnóstico preciso e o desenvolvimento de um insumo vacinal. Portanto, a busca por novas estratégias, expressando proteínas antigênicas recombinantes fusionadas a poliedrina, nesse sistema eucarioto de expressão em Baculovírus, pode possibilitar futuramente o desenvolvimento de um kit diagnóstico específico, eficiente e com baixo custo, sendo também, uma alternativa viável em futuros estudos na produção de vacinas, já que o presente trabalho apresenta uma estratégia que não desencadeia riscos aos humanos ao mesmo tempo que utiliza regiões antigênicas específicas do vírus.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk for Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 49, n. 58, set. 2015.
- ARDISSON-ARAÚJO, D. R. P.; ROCHA, J. R.; COSTA, M. H.; BOCCA, A. L.; DUSI, A. N.; RESENDE, B. M. A baculovirus-mediated for full-length plant virus coat protein expression and purification. **Virology Journal**, v. 10, p. 262, 2013.
- BARROS, M. C. E. S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica. **Boletim epidemiológico** 16, v. 47, n. 20. 2016.
- CALVO. E, P.; CORONEL-RUIZ. C.; VELAZCO. S.; VELANDIA-ROMERO. M.; CASTELLANOS. J, E. Diagnóstico diferencial de dengue y chikungunya en pacientes pediátricos. **Biomédica**. Bogotá, v. 36, n. 2, p.35-43, ago. 2016.
- CARVALHO. R, G.; LOURENÇO DE OLIVEIRA. R.; BRAGA. I. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. São Paulo, v.109, n. 6, p. 787-796, set. 2014.
- CASTRO. A, P, C, R.; LIMA. R, A.; NASCIMENTO. J, S. Chikungunya: visão do clínico da dor. **Revista Dor**. São Paulo, v. 17, n. 4, p. 299-302, out\dez. 2016.
- CHO, B.; KIM, J.; CHO, J. E.; JEON, B. Y.; PARK, S. Expression of the capsid protein of Chikungunya virus in a baculovirus for serodiagnosis of Chikungunya disease. **Journal of Virological Methods**. v. 154, n. 1, p. 154-159, oct. 2008.
- CHOMPOOSRI, J.; THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; BOONSERM, R.; PHUMEE, A.; SANGKITPORN, S.; SIRIYASATIEN, P. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites e Vectors**, v. 9, n 227, p. 5-13, 2016.

COFFEY, L.; FAILLOUX, A.; WEARVER, S, C. Chikungunya Virus-Vector Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, nov. 2014.

CORRALES-AGUILAR, E.; TROYO, A.; CALDERÓN-ARGUEDAS, ÓLGER. Chikungunya: un virus que nos acecha. **Acta Médica Costarricense**. San José, v. 57, n. 1, p. 7-15, jan/mar. 2015.

DATAL, N. G.; BENTLEY, W. E.; CHA, H. J. Facile monitoring of baculovirus infection for foreign protein expression under very late polyhedrin promoter using green fluorescent protein reporter under early-to-late promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 27, 2005.

DONALISIO, M. R; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, v.108, n.1. p. 283. jan\ fev 2015.

ESPOSITO. D, L, A.; FONSECA. B, A, L. Zika and chikungunya infections in Brazil: reviewing the epidemic and treatment options. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 49, n. 5. p. 535-536. set/out. 2016.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P. CALVET, G. A. BRASIL. P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no brasil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. v. 31. n. 5. p. 905-908. mai. 2015.

INVITROGEN. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System: An efficient site-specific transposition system to generate Baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Life Technologies, Carlsbad, 78 p. ago. 2015.

KUO, S. C.; CHEN, Y. J.; WANG, Y. M.; KUO, M. D.; JINN, T. R.; CHEN, W. S.; CHANG, Y. C.; TUNG, K. L.; WU, T. Y.; LO, S. J. Cell-based analysis of Chikungunya virus membrane fusion using baculovirus-expression vectors. *Journal of Virological Methods*, v, 157, n. 2, p. 206-215, may. 2011.

KRISTY SY, AVA.; SAITO-OBATA, M.; MEDADO, I. A.; TOHMA, K.; DAPAT, C.; SEGUBRE-MERCADO, E.; LUPISAN, A. T. S.; OSHITAN, H. Molecular characterization of chikungunya virus, Philippines. **Emerging Infectious Diseases journal**. v. 22, n. 5, p. 887, mai. 2016.

LAITON-DONATOK.; USME-CIRO, J. A.; RICO, A.; PARDO, L.; MARTÍNEZ, C.; SALAS, D.; ARDILA, S.; PÁEZ, A.; Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia:

evidencia de selección purificadora en el gen E1. **Biomédica**. Bogotá. v. 36, n. 2, p, 25-34. aug. 2016.

LARAS, K.; SUKI, N. C.; LARASATI, R. P.; BANGS. M, J.; KOSIM, R.; DJAUZI, S. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v. 99, n. 2, p. 128-141, mar. 2005.

LIMA-CARAMA. T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 50, n. 36, p. 1-7. mar. 2016.

METZ, S.; GARDNER, J.; GEERTSEMA, C.; LE, T. T.; GOH, L.; VLAK, J. M.; SUHRBIER, A.; PIJLMAN, G. P. Effective Chikungunya Virus-Like Particle Produced in Insect Cells. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3. mar. 2013.

MOGAMI, R.; VAZ, J. L. P.; CHAGAS, Y. F. B.; TOREZANI, R. S.; VIEIRA, A. A.; KOIFMAN, A. C. B.; BARBOSA, Y. B.; ABREU, M. M. Ultrasound of ankles in the diagnosis of complications of chikungunya fever. **Radiol. Bras**. Feb. 2017.

MORCERF, C. C. P.; BENNETTE, M. M.; MORAES, T. M. C.; SIQUEIRA, A. A.; SILVA, A. C. G.; IMPAGLIZZO. S, P. Chikungunya: arbovirose como problema de saude em expansão - uma revisão bibliográfica. **Rev. Rede de cuidados em saúde**. v. 9. n. 2, 2015.

PASTORINO, B.; MUYEMBER-TAMFUM, J. J.; BESSAUD, M.; TOCK F.; TOLOU, H., DURAND, J.P. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African Strain. **J Med Virol**, v. 74, out. 2004.

PINHEIRO, T. J.; GUIMARÃES, L. F.; SILVA, M. T. T.; SOARES, C. N.; Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. São Paulo, v. 74, n. 11, nov. 2016.

PINTO, Tatiana Priscilla Coelho. Expressão e purificação da proteína E3 do vírus chikungunya (CHIKV). 2013. 80f. (Tese de Doutorado) - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

POLETTI, M. O. D.; SOUZA, C. F. S. S.; SAMPAIO, M. G. Evidências de transmissão vertical de arbovírus. **Residência Pediátrica**, v. 6, n. 1. 2016.

RIBEIRO, B. M.; PINEDO, F. J. R. Baculovírus recombinante para controle de praga. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v. 22, p. 50-58, dez. 2001.

RIBEIRO, B. M.; MORGADO, F. S. ; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; SILVA, L. A. ; CHAVES, L. C. S.; QUIRINO, M. S.; ANDRADE, M. S. ; CORREA, R. F. T. . Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Saúde - Volume 2*. 1ed.São Paulo: Blucher, 2015, v. 2, p. 255-306.

ROMERO. K, R.; ABAD. M, R, A.; GÓMEZ. G. ¿Afecta el virus del chikungunya el estado emocional de los individuos que lo padecen?. **Psicogente**. Barranquilla. v. 19, n. 35, p. 35, jan/jun. 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. Third Edition (plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). 2001.

SILVA, LEONARDO ASSIS DA. Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto. 2016. XIV, 90 f., Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; OLIVER, M.; LEPARC-GOFFART, I.; MARIMOUTOU. C. Chikungunya virus infection. **Curr Infect Dis Rep**, v. 13, n. 3, jun. 2011.

SERPA. L, L, N.; COSTA. K, V, R, M.; VOLTOLINI. J, C.; KAKITANI. I. Variação sazonal de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no município de Potim, São Paulo. **Revista Saúde Pública**. São Paulo. 2006.

TAUIL. P, L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. **Epidemiologia e Serviços da Saúde**. Brasília, v. 23, n. 4, out\ dez. 2014.

OKABAYASHI, T.; SASAKI, T.; MASRINOUL, P.; CHANTAWAT, N.; YOKSAN, S. NITATPATTANA, N.; CHUSRI, S.; VARGAS, R. E. M.; GRANDADAM, M.; BREY, P. T.; SOEGIJANTO, S.; MULYANTNO, K. C. CHURROTIN, S.; KOTAKI, T.; FAYE, O.; SOW, A.; SALL, A. A.; PUIPROM, O.; PANJAPORN, C.; KUROSU, T.; KATO, S.; KOSAKA, M.; RAMASOOTA, P.; IKUTA, K. Detection of Chikungunya Virus Antigen by a Novel Rapid Immunochromatographic test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, feb. 2015.

VALLE, D.; PIMENTA, D, N. AGUIAR, R. Zika, dengue and chikungunya: challenges and issues. **Epidemiologia e Serviços da Saúde**. Brasília, v. 25, n. 2, abr\jun. 2016.

VOSS, J. E.; VANEY, M. C.; DUQUERROY, S.; VONRHEIN, C.; GIRARD-BLANC, C.; CRUBLET, E.; THOMPSON, A.; BRICOGNE, G.; REY, F. A. Glycoprotein organization of

Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 168, n. 7324, p. 709-712, dez. 2010.

WEAVER, S. C.; OSORIO, J. E.; LIVENGOOD, J. A.; CHEN, R.; STINCHCOMB, D. T. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 9, 2012.

ZARA. A, L, S, A.; SANTOS. S, M.; FERNANDES-OLIVEIRA. E, S.; CARVALHO. R, G.; COELHO. G, E. Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços da Saúde**, Brasília, p. 25. n. 2. Abr\Jun. 2016.

ZHENG, Z. M. A.; YANG, X. F.; LIU, H. L.; CHENG, H. W. S. I. L. S.; WANG, Y. L. Highly Efficient and Economical Baculovirus Expression System for Preparing Human Papillomavirus Type16 virus-like Particle. **Acta Biochimica and Biophysica Sinica**. Shanghai. v. 36 n. 8. p. 548-552. 2004.