



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO VÍRUS
CHIKUNGUNYA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

ALANA BATISTA FERNANDES

MANAUS - AM

ABRIL/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO VÍRUS
CHIKUNGUNYA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

ALANA BATISTA FERNANDES

Plano de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para aula de defesa, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Amilcar Tanuri

Manaus - AM
Abril/2016

Ficha Catalográfica

Fernandes, Alana Batista

F363c Clonagem e expressão da proteína do capsídeo do vírus Chikungunya para produção de antígeno recombinante: Produção de antígeno recombinante através de gene sintético do vírus Chikungunya / Alana Batista Fernandes. 2016
77 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cíntia Mara Costa de Oliveira

Coorientadora: Almicar Tanury

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Vírus Chikungunya. 2. Proteína recombinante. 3. Ensaio imunoenzimático. 4. Antígeno. 5. Anticorpo. I. Oliveira, Cíntia Mara Costa de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ALANA BATISTA FERNANDES

Plano de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para aula de defesa, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Data da defesa: 19 de Abril de 2016

Comissão Examinadora

Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira – Presidente

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/DHVD

Dra. Luana Cristiny Rodrigues Silva – Membro

Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT/DHVD

Dra. Aya Sadahiro – Membro

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

“Dedico este trabalho a Deus, a minha Mãe Marta Batista que muito me incentivou a estar aqui, se não fosse ela já teria desistido”.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter me dado força de vontade para chegar até aqui e me concedido a oportunidade de aprendizado e evolução.

Ao grande amor da minha vida **minha avó**, pela confiança, pela dedicação e pelo amor. Obrigada por sempre apoiar e incentivar a carreira que escolhi. Sem você, eu não estaria onde estou. Sem a educação e o seu cuidado, eu não seria quem eu sou.

À Dra. **Cintia Mara**, minha orientadora, agradeço de coração pela dedicação, pela confiança em mim depositada, principalmente pela paciência nos momentos difíceis, auxílio, incentivo e o empenho dedicado a mim e ao projeto, e agradeço também pelos ensinamentos, muitos dos quais levarei para a vida toda.

Ao Dr. **Spartaco Astolfi Filho** coordenador do laboratório de DNA na Universidade Federal do Amazonas, por ter me concedido espaço dentro do laboratório para que eu pudesse desenvolver o projeto.

Ao **André Santos** por ter de forma expressiva, colaborado para o andamento dos experimentos.

Ao MSc. **Edson Júnior Carmo**, pesquisador da Universidade Federal do Amazonas, por ter fornecido cepas de *DH5 α* , e contribuído com seu conhecimento para o andamento dos experimentos, sem medir qualquer esforço.

Ao Dr. **Adolfo José da Mota** por ter colaborado no processo de sequenciamento.

Ao Dr. **João Bosco Gimaqui** da Fundação de Medicina Tropical de Manaus por me ajudar nas técnicas laboratoriais, voltadas para o ensaio imunoenzimático.

Ao Dr. **Almicar Tanuri**, meu co-orientador, pela ajuda e extrema competência no desenvolvimento desse trabalho, sempre muito atento e exigente, estimulando brilhantemente o meu desenvolvimento científico.

À Dra. **Enedina Nogueira** técnica no laboratório de DNA da Universidade Federal do Amazonas pela sua paciência e orientação laboratorial em várias etapas deste projeto.

À Dra. **Márcia da Costa Castilho** gerente do Laboratório de Virologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), por ter cedido espaço no laboratório da fundação.

As minhas irmãs de coração e tão queridas **Suzely** e **Sulyane** pela boa convivência, pela amizade sincera, parceria e companheirismo nos bons e maus momentos da vida, e por todos os planos mirabolantes que me ajudaram a bolar.

Aos meus amigos **Lazaro Garcia** e **Marta Oyama** que por muitas vezes foram os principais ouvintes de minhas lamentações.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que participaram deste trabalho, direta ou indiretamente, meu carinho e meu reconhecimento.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA (família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*), transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos fêmeas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O início das manifestações clínicas da infecção por CHIKV na maioria das vezes é caracterizada por febre e dor nas articulações, e até agora não existe uma terapia antiviral específico ou vacina para o tratamento da infecção. O diagnóstico da infecção CHIKV é baseado em achados clínicos e laboratoriais, com o último sendo realizada por isolamento do vírus, transcrição reversa-polimerase reação em cadeia (RT-PCR), sorologia e testes rápidos. Para produzir um antígeno recombinante através da clonagem e expressão da proteína do capsídeo (C) de CHIKV de modo a detectar anticorpos anti-CHIKV em amostras de soro humano, por ensaio imunoenzimático. Um gene sintético (gBlock), especificamente concebidos para esse estudo, correspondente à proteína C do capsídeo (400 pares de bases) do vírus Chikungunya, foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e, em seguida, clonado em pGEM-T *Easy* sistema de *Escherichia coli*. Os clones transformantes foram sequenciados, e os produtos recombinantes foram digeridos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI*, e depois subclonado e expresso no vector pET-23a+ e *Escherichia coli* BL21 (DE3). A expressão da proteína C recombinante e o peso molecular foram determinados por SDS-PAGE e Dot Blot e purificado por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel. Um ensaio imunoenzimático foi realizada utilizando o antígeno recombinante para detecção de anticorpos IgM e IgG em soros de pacientes com infecção CHIKV confirmados pelo laboratório nacional de referência do Ministério da Saúde, bem como soros de pacientes positivos para o vírus Mayaro, vírus da dengue e citomegalovírus infecção. O derivado da proteína recombinante mostrou tamanho e antigenicidade compatível com a proteína C nativa do CHIKV; uma concentração de 0,342 ng / mL de proteína C recombinante foi obtido utilizando o pET-23a+ de *E. coli* BL21 (DE3); a cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel foi eficaz para obter a proteína C solúvel, confirmada pelo método de *Bradford*; o ensaio imunoenzimático utilizando o antígeno recombinante mostrou reatividade cruzada com outros agentes patogênicos de *Alphavirus*. Os resultados indicam que o sistema de expressão pET-23a+ de *E. coli* BL21 (DE3) foi eficaz para produzir a proteína C recombinante de CHIKV, no entanto, o antígeno não foi suficientemente sensível para detectar apenas a infecção CHIKV.

Palavras chave: Vírus Chikungunya, a proteína recombinante, ensaio imunoenzimático.

ABSTRAT

The Chikungunya virus (CHIKV) is an RNA virus (family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*) transmitted to humans through the bite of female mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. The clinical onset in CHIKV infection is most often characterized by fever and joint pain, and so far there is no specific antiviral therapy or vaccine for the treatment of the infection. The diagnosis of CHIKV infection is based on clinical and laboratory findings, with the latter being performed by virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), serology, and rapid tests: To produce a recombinant antigen through the cloning and expression of the capsid protein (C) of CHIKV in order to detect anti-CHIKV antibodies in human serum samples by immunoenzymatic assay. A synthetic gene (gBlock), specifically designed for this study, corresponding to the protein C (400 base pair) of Chikungunya virus, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then cloned into pGEM-T *Easy* system-*Escherichia coli*. The transformant clones were sequenced, and recombinant products were digested using the restriction endonucleases EcoRI and BamHI, and then subcloned and expressed in the vector pET-23a+ *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant protein C expression and the molecular weight were determined by SDS-PAGE and Dot Blot and purified by affinity chromatography using nickel column. An immunoenzymatic assay was performed using the recombinant antigen to detect IgM and IgG antibodies in sera from patients with CHIKV infection confirmed by the National Reference Laboratory of the Ministry of Health, as well as sera from patients tested positive for Mayaro virus, Dengue virus and Cytomegalovirus infection. The derived recombinant protein showed size and antigenicity compatible with the native protein C from the CHIKV; a concentration of 0.342 ng/mL of recombinant protein C was obtained using the pET-23a+ *E. coli* BL21 (DE3); the affinity chromatography using nickel column was effective to obtain the soluble protein C, confirmed by the Bradford method; the immunoenzymatic assay using the recombinant antigen showed cross-reactivity to others *Alphavirus* pathogens. The results indicate that the expression system pET-23a+ *E. coli* BL21 (DE3) was effective to produce the recombinant protein C of CHIKV, however the antigen was not sensitive enough to detect only the CHIKV infection.

Keywords: Chikungunya virus, Recombinant protein, Immunoenzymatic assay.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	A) <i>Aedes aegypti</i> e B) <i>Aedes albopictus</i> principais espécies de vetores do vírus Chikungunya, sendo encontrado em regiões de clima tropical e subtropical	19
FIGURA 2	Ciclo de transmissão selvático e urbano do vírus Chikungunya.....	20
FIGURA 3	Os pontos coloridos demonstram onde os <i>Alphavirus</i> foram registrados. Os pontos em azul são os casos registrados de Chikungunya pelo mundo.....	22
FIGURA 4	Estrutura esquemática da partícula viral do Chikungunya e as proteínas estruturais.....	25
FIGURA 5	Genoma do vírus Chikungunya com suas proteínas estruturais e não estruturais.....	25
FIGURA 6	Componentes estruturais que formam a proteína do Capsídeo do vírus Chikungunya.....	27
FIGURA 7	Ciclo de replicação do vírus Chikungunya, os estágios e as proteínas.....	28
FIGURA 8	Fluxograma de atividades do projeto.....	37
FIGURA 9	Sequência completa da proteína C de 800 pb do vírus Chikungunya.....	37
FIGURA 10	Sequência da proteína C parcial do Chikungunya (400 pb).....	38
FIGURA 11	-Mapa do vetor de clonagem pGEM-T <i>Easy</i>	40
FIGURA 12	Mapa do vetor pET-23a+ e sequencias de pontos de referências.....	41
FIGURA 13	Perfil eletroforético dos produtos da PCR obtidos após amplificação do gene sintético da proteica C do Vírus Chikungunya. A1, A2 e A3= genes. M= marcador de peso molecular 100pb (Promega).....	49
FIGURA 14	Placas de petri evidenciando as colônias transformadas usando o pGEM- T <i>Easy</i>	50
FIGURA 15	Perfil eletroforético dos produtos da extração plasmidial das colônias transformantes. C1-6= DNA plasmidial das colônias; M= Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega).....	50
FIGURA 16	Perfil eletroforético do gene sintético CHIKV de 400pb, após clonagem no vetor pGEM-T <i>Easy</i> , visualizado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. M=marcador molecular <i>Ladder</i> de 100pb; I1 e I2= insertos CHIKV amplificados da PCR de colônias.....	51
FIGURA 17	Análise de similaridade entre as sequências nucleotídicas obtidas no estudo e sequências do genoma Chikungunya depositadas no UniProt.....	52
FIGURA 18	Perfil eletroforético do processo de digestão enzimática com <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> , visualizado em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular de 1Kb e 100pb, respectivamente; C1 e C2= plasmídeos; ID1 e ID2= insertos digeridos.....	53
FIGURA 19	Análises eletroforética mostrando o vetor pET-23a+ linearizado com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> . M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1 e 2= pET-23a+ digerido; 3= pET-23a+ não digerido.....	54
FIGURA 20	Perfil eletroforético do processo de digestão enzimática visualizado em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1 e 2= pET-23a+ linearizado, 3= inserto CHIKV digerido do pGEM-TEasy.....	54
FIGURA 21	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene sintético da proteína C por PCR de colônia. M= marcador molecular de 100pb, 01 a 10= Clones analisados.....	55

FIGURA 22	Perfil eletroforético do produto da dupla digestão dos plasmídeos pET-23a+ com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> . M= Marcador de peso molecular 100pb; 01, 03, 05, 07, 09 – plasmídeos pET-23a+ duplamente digeridos com <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> ; 02, 04, 06, 08, 10 – pET-23a+ não digerido. A seta indica o fragmento do DNA sintético.....	56
FIGURA 23	Gel de SDS-PAGE 12%, mostrando a expressão da proteína recombinante a 25°C por 4 horas. M- marcador de peso molecular de 250 kDa, 1- BL21DE3 com IPTG sem vetor de expressão, 2 ao 9 BL21De3 com vetor de expressão contendo o gene de interesse.....	57
FIGURA 24	Dot blot de colônias. As amostras 1 e 17, são os controles negativos (BL21DE3); 2 e 18 controles positivos (BL21DE3/tGH-HisTag); de 3 a 16 são células da hospedeira BL21DE3/pE-T23a+CHIKV.....	58
FIGURA 25	Gel de poliacrilamida 12%, com amostras da proteína purificada. M- Marcador de peso molecular, 1 a 10- solução com tampão de lavagem e água sem proteína, 11 a 18- amostras da proteína recombinante purificada, 29- água.....	59
FIGURA 27	Esquema da placa de ELISA com 96 poços. As linhas A, B e C, contem as triplicatas das amostras soropositivas para CHIK e Oropouche, sensibilizadas com as frações 14 e 15 dos antígenos recombinantes. Nas linhas D e E, são poços contendo os antígenos sem amostras virais. Nas linhas F, G e H os poços contem as triplicatas das amostras soropositivas para Chikungunia e Ouripouche, sensibilizadas com as frações 16 e 17, dos antígenos recombinantes.....	61
FIGURA 29	Placa de ELISA com 96 poços. As linhas A, B e C, contém as triplicatas das amostras soropositivas para CHIK, A e B contem duplicatas para Mayaro, sensibilizadas com as frações 14 e 15 dos antígenos recombinantes. Nas linhas D e E, são poços contendo os antígenos sem amostras virais. Nas linhas F, G e H os poços contém as triplicatas das amostras soropositivas para CHIK, G e H contem duplicatas das amostras soropositivas para Mayaro, sensibilizadas com as frações 16 e 17, dos antígenos recombinantes.....	62

LISTA DE ABREVEATURAS

CHIKF – Chikungunya febre

CHIKV – Vírus Chikungunya

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RT-PCR – Transcrição reversa - Reação em Cadeia da Polimerase

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

YFV – *Yellow fever vírus*

DENV – *Dengue vírus*

ILHV – *Ilheus vírus*

ROCV – *Rocio vírus*

SLEV – *Saint Louis encephalitis vírus*

WNV – *West Nile vírus*

JEV – *Japanese encephalitis vírus*

LIV – *Louping ill vírus*

WSLV – *Wesselsbron vírus*

EEEV – *Eastern equine encephalitis vírus*

WEEV – *Western equine encephalitis vírus*

VEEV – *Venezuelan equine encephalitis vírus*

MAYV – *Mayaro vírus*

ONNV – *O'nyong-nyong vírus*

RRV – *Ross River vírus*

GEV – *Getah vírus*

E. coli – *Escherichia coli*.

Ae. albopictus – *Aedes albopictus*

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

A – Alanina

V – Valina

WA – África Ocidental

ECSA – África Oriental e Central-Sul

IOL – Ásia e Oceano Índico
C – Capsídeo
ORFs – Fase de leitura aberta
NTR – Região não traduzida
prM – Proteína precursora de membrana
nm – Manômetro
nsP – Proteínas não estruturais
NK – Natural killer
IFN I – Interferon do tipo I
IFN α – Interferon alfa
IFN β – Interferon beta
IL – Interleucina
GM-CSF – Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos
LCR – Líquidos cefalorraquidiano
CPE – Efeitos citopáticos
IF – Imunofluorescência
cDNA – DNA complementar
HI – Hemaglutinação
PRNT – Neutralização de redução de placas
MAC-ELISA – Imunoensaio de captura
CAM – Centro de Apoio Multidisciplinar
FMT-HVD – Gerência de Virologia na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
IDT – Integrated DNA Technologies
Pb – Pares de bases
 μ M – Micromolar
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
mM – Milimolar
MgCl – Cloreto de magnésio
 $^{\circ}$ C – Graus Celsius
 μ L – Microlitro
s – Segundo
min – Minuto
mL – Mililitro

µg – Micrograma

ng – Nanograma

U – Unidade

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra-acético

pH – potencial hidrogeniônico

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

LB – Bertani sólido

NaCl – Cloreto de sódio

IPTG – Isopropylthio-β-D-gactoside

X-GAL – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Tampão fosfato-salino

Kb – Kilobyte

BPS – Soro-albumina bovina

S.O.C. – Caldo super otimizado com catabólica repressão

LB – Luria Bertani

KDa – Kilodaltons

V – Volts

M – Molar

NaAc – Aceto de sódio

HCl – Cloreto de Hidrogênio

ABTS - 2,2-diazino do ácido etilbenzotialino sulfônico

O. D. – Densidade ótica

MS – Ministério da Saúde

Sumário

1. Introdução	16
1.2. Revisão Bibliográfica	17
1.2.1 Arbovírus	17
1.2.2 Chikungunya.....	18
1.2.3 Transmissão urbana do vírus Chikungunya.....	19
1.3 Epidemiologia.....	20
1.4 Organização Genômica.....	24
1.5 Ciclo de replicação do vírus dentro do hospedeiro humano	27
1.6 Resposta do sistema imunológico ao CHIKV	28
1.7 Patologia	30
1.8 Diagnóstico	32
2. Objetivos	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivo específicos.....	35
3. Material e Métodos.....	36
3.2. Desenho do estudo	36
3.3. Locais de estudo	36
3.4. Etapas do estudo	36
3.5. Estratégia de clonagem do gene que codifica a proteína do capsídeo (C) do vírus Chikungunya.....	37
3.6. Amplificação do gene sintético da proteína do capsídeo (C) do vírus Chikungunya	38
3.7. Purificação do produto amplificado por PCR.....	39
3.8. Clonagem do produto de PCR no vetor de Clonagem pGEM-T <i>Easy</i> – Reação de ligação...39	
3.9. Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> DH5 α com os plasmídeos recombinantes	40
3.10. Extração, análise de restrição e PCR dos plasmídeos recombinantes pGEM-T <i>Easy</i> de <i>E.coli</i> DH5 α	41
3.11. Preparação do plasmídeo pET-23a+ para Subclonagem	42
3.11.1. Características do vetor.....	42
3.10.2 Procedimentos.....	42
3.11 Subclonagem do gene no plasmídeo de expressão pET-23a+	43
3.12 Extração, análise de restrição e sequenciamento do plasmídeo pET-23a+ das células competentes <i>E.coli</i> DH5 α	43

3.13	Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) com o plasmídeo recombinantes	44
3.14	Indução da expressão em <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	45
3.15	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	46
3.16	Dot Blot com anti-His (C-Terminal)	46
3.17	Purificação da Proteína do Capsídeo em coluna de Níquel	47
3.18	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	47
4.	Resultados	49
4.1	PCR do gene sintético da proteína do capsídeo do Chikungunya	49
4.2	Clonagem do gene sintético da proteína do capsídeo do Vírus Chikungunya	50
4.3	PCR de colônia para o gene sintético da proteína do capsídeo do Chikungunya	51
4.4	Sequenciamento	51
4.5	Digestão plasmidial com as endonucleases de restrição <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	52
4.6	Construção do vetor de expressão pET-23a+	53
4.7	Identificação do inserto no vetor pET-23a+ por PCR de colônia e confirmação da correta construção por análise de restrição com as endonucleases <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	54
4.8	Expressão do gene sintético da proteína do capsídeo do vírus Chikungunya na hospedeira <i>E. coli</i> BL21 DE3	56
4.9	Análise da expressão da proteína C pela técnica de Dot Blot	57
4.10	Purificação da Proteína do Capsídeo do vírus Chikungunya por coluna de níquel	58
4.11	Teste imunoenzimático (ELISA) para validar a proteína do capsídeo do Chikungunya como antígeno recombinante	59
5.	Discussão	62
6.	Conclusões	69
7.	Perspectivas e recomendações:	70
8.	Referencias Bibliograficas	71

1. Introdução

A febre Chikungunya CHIKF, causada pelo "vírus Chikungunya (CHIKV)," é uma arbovirose transmitida pela picada de mosquitos infectados pertencentes ao gênero *Aedes*, responsáveis por ciclos de transmissão em ambientes urbanos e Peri urbanos. O primeiro caso descrito da CHIKF foi em 1950 na Tanzânia e ao longo dos anos o CHIKV tem causado epidemias em vários países ao redor do mundo. Em 2011 o vírus foi relatado pela primeira vez nas Américas, na ilha de Saint Martin e no Caribe. Sendo que até o final de dezembro de 2015, quase 1 milhão de casos foram notificados nas Américas, resultando em 71 mortes.

O diagnóstico da febre chikungunya pode ser por critérios clínicos e exames laboratoriais. Dentre os exames laboratoriais existem a cultura viral, as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) e exames sorológicos (ELISA) para detecção de anticorpos IgM e IgG do vírus Chikungunya. Os testes de ELISA para detecção de anticorpos específicos anti-CHIKV são menos exigentes em termos de infraestruturas laboratoriais e permitem, detectar IgM e IgG entre 2 e 7 dias após o aparecimento da doença (MOHAN et al., 2010).

Atualmente, não existe nenhum tratamento específico disponível para a febre chikungunya, o indicado é tomar medidas de prevenção e conscientização através de órgãos públicos contra os mosquitos disseminadores do vírus. É importante salientar ainda que, como no caso da dengue, pacientes com febre chikungunya devem evitar medicamentos à base de ácido acetilsalicílico, pois o uso deste pode aumentar o risco de sangramentos. Em todo mundo a taxa de mortalidade por febre chikungunya é muito baixa. Porém, distúrbios vasculares, cansaço, depressão e vários sintomas reumáticos podem ocorrer por até dois anos principalmente em pessoas idosas (UJVARI, 2011).

Neste contexto, foi desenvolvido o presente estudo tendo como foco principal à clonagem e expressão do gene da proteína do nucleocapsídeo C do CHIKV em sistemas de expressão *Escherichia coli* e comparar o desempenho da proteína C recombinante como antígeno em técnicas de sorodiagnóstico para detecção da infecção por CHIKV em amostras clínicas. Vindo assim, contribuir para um diagnóstico rápido e específico CHIKV ou ainda para monitoramento dos *Alphavirus* em estudos epidemiológicos na região.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1 Arbovírus

Arbovírus é uma contração do termo derivado da expressão inglesa *arthropod-borne virus*, que é utilizado para classificar vírus que tem como característica comum, a necessidade de dois componentes para se manter na natureza, um artrópode hematófago que pode ser mosquito ou carrapato e um animal vertebrado, de diferentes gêneros e espécies. Os Arbovírus constituem o maior grupo conhecido de vírus, sendo registrados 537 tipos diferentes, distribuídos por quase todos os continentes (OLIVEIRA, 2015).

Os arbovírus estão distribuídos em sete famílias, onde seis delas são compostas por agentes que têm como material genético o RNA (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae e Orthomyxoviridae) e apenas uma família composta por vírus de DNA (Asfarviridae) (HOLLIDGE et al., 2010). A estrutura genômica dos arbovírus do tipo RNA pode ser de cadeia simples ou dupla, segmentada ou não. Entre os com genoma segmentado incluem os das famílias Togaviridae, Flaviviridae e Rhabdoviridae, enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias Bunyaviridae e Reoviridae (CASSEB, 2013). Os arbovírus de maior importância para a saúde humana são os que levam a doenças, estão classificados nas famílias Togaviridae, gênero *Alphavirus*; Bunyaviridae gênero *Orthobunyavirus* e Flaviviridae gênero *Flavivirus* (GRIMMER DAVIS, 2009).

A família Bunyaviridae considerada a maior família dos vírus de RNA, com maior número de arbovírus conhecidos, com aproximadamente 100 tipos distribuídos em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus* e *Hantavirus*. Porém, os vírus do gênero *Tospovirus* são vírus de insetos que infectam plantas e os vírus do gênero *Hantavirus* são vírus de roedores e não são considerados arbovírus (GIBRAIL, 2015).

A família Flaviviridae é composta por mais de 53 tipos de vírus e compreende os gêneros *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus* este último, foi recentemente proposto (ICTV, 2016). O gênero *Flavivirus* possui alguns vírus que se destacam, pela grande importância médica, como os *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV), *Ilheus virus* (ILHV), *Rocio virus* (ROCV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Louping ill virus* (LIV) e *Wesselsbron virus* (WSLV) (TRAVASSOS DA ROSA, 1997).

A família Togaviridae compreende os gêneros *Alphavirus* o qual possui 31 espécies de Arbovírus e Rubivírus que compreende o vírus da Rubéola. O gênero *Alphavirus* possui uma grande importância para o estudo dos arbovírus. Os *Alphavirus* infectam uma variedade de vertebrados, inclusive o homem. Já foram associados mais de 10 tipos *Alphavirus* com doença humana, e pelo menos 08 destes, tem sido responsável por epidemias como: *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV), *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Mayaro virus* (MAYV), *O'nyong-nyong virus* (ONNV), *Ross River virus* (RRV), *Chikungunya virus* (CHIKV), objeto deste trabalho e *Getah virus* (GEV) (ICTV, 2016; CASSEB, 2013; TRAVASSOS DA ROSA, 1997).

1.2.2 Chikungunya

O CHIKV pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus* e foi descrito pela primeira vez no Leste do Continente Africano entre os anos de 1950 a 1953, no território denominado província de Tanganyka, na região que hoje corresponde à Tanzânia (KUCCHARZ & CEBULA-BYRSKA, 2012). Após as primeiras descrições foi identificado os ciclos silvestres e periurbano na região da África envolvendo vetores do gênero *Aedes ssp*, na Ásia circulando principalmente em ciclo urbano (*Aedes aegypti*) e periurbano (*Aedes albopictus*) com três genótipos conhecidos: África Ocidental (WA), África Oriental e Central-Sul (ECSA), da Ásia e da linhagem do Oceano Índico (IOL) (DONALISIO & FREITAS, 2015).

O CHIKV causa a febre chikungunya (CHIKF), durante o período da doença os acometidos por ela apresentam uma curvatura para baixo uma posição antálgica, devido a este fato o nome Chikungunya foi associado “aquele que se curva” na língua Makonde, falada em várias regiões da África Oriental (HONÓRIO et al, 2015).

Existem várias espécies de *Aedes* que transmitem o vírus Chikungunya na África (*Aedes furcifer*, *Aedes vittatus*, *Aedes africanus*, *Aedes fulgens*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes dalzieli*, *Aedes vigilax*, *Aedes camptorhynchites*). Além desses *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis* e *Anopheles sp.* têm sido ocasionalmente, descritos (ROBERTA, 2012). Porém, duas principais espécies de mosquitos *Aedes* estão diretamente envolvidas com a transmissão humana do vírus Chikungunya no mundo o *A. aegypti* e devido a uma adaptação das cepas emergentes do Oceano Índico o *A. albopictus*, anteriormente considerado apenas um vetor

secundário, hoje tem servido como o vetor primário do CHIKV na maioria dos surtos descritos (Figura 1).

Como dito anteriormente, inicialmente o *A. aegypti* era o mais importante vetor do CHIKV, mas em 2006 durante um surto ocorrido na ilha de La Réunion (Oceano Indico) o mosquito *A. albopictus* (Asian tiger mosquito) foi descrito como o principal vetor. A transmissão se tornou mais eficaz através do *Ae.albopictus* devido a apenas uma mutação pontual, a substituição do aminoácido alanina (A) por valina (V) no aminoácido 226 (E1-A226V) da proteína E1 do envelope viral, da linhagem África Oriental e Central-Sul (ECSA) (WEBER et al, 2015). O papel desta mutação pode estar diretamente ligado ao aumento da infectividade e transmissibilidade da febre chikungunya por *A. albopictus*. Salientando que o *A. albopictus* também habita regiões temperadas e até mesmo frias dos hemisférios oriental e ocidental, incluindo a Europa e os Estados Unidos da América (FISCHER, 2013).

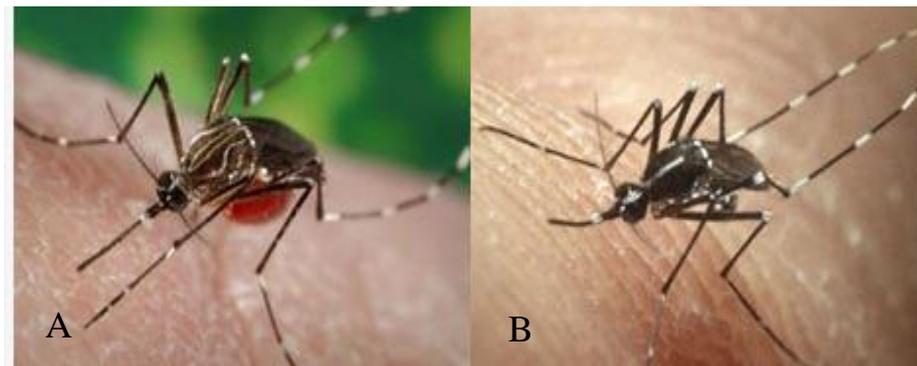


Figura 1. A) *Aedes aegypti* e B) *Aedes albopictus* principais espécies de vetores do vírus Chikungunya, sendo encontrado em regiões de clima tropical e subtropical.

Fonte: <http://lampforhaiti.org/chikungunya-outbreak/>

1.2.3 Transmissão urbana do vírus Chikungunya

Em regiões endêmicas na África, o CHIKV possui como principais reservatórios as aves, pequenos animais mamíferos silvestres. A transmissão do CHIKV envolve dois principais ciclos, o silvático, que ocorre em *Aedes*, pequenos mamíferos e primatas não-humanos, em habitats florestais. Este ciclo está restrito ao continente africano e as espécies de *Aedes* envolvidas na transmissão são *Aedes furcifer-taylori*, *Aedes africanu* e *Aedes aegypti*. Em outras regiões a transmissão ocorre pelos mosquitos entre seres humanos suscetíveis (PINTO, 2013).

As fêmeas de *Aedes* se infectam com CHIKV ao se alimentar em pessoas infectadas ou reservatórios e mantêm o vírus na saliva retransmitindo ao homem e animais silvestres durante repasto sanguíneo.

No ciclo silvático os mosquitos geralmente são encontrados em *habitats* florestais onde as fêmeas usam os buracos de árvores, cascas, folhas caídas e bromélias para depositar seus ovos e desenvolver suas larvas. Já no ciclo urbano usam reservatórios de água artificiais, pratos de vasos de flores, banhos de pássaros, pneus descartados e piscinas, dentre outros, como *habitats* para seus ovos e larvas.

O *A. aegypti* pode existir simpatricamente com *A. albopictus* e muitas vezes também compartilhar *habitats* das larvas, mas na maioria das vezes *A. aegypti* encontra-se em regiões tropicais e subtropicais, enquanto *A. albopictus* está distribuído tanto em climas quentes como temperados. Os seus ovos são altamente resistentes e podem manter-se viáveis na estação seca, dando origem a larvas e adultos na época das chuvas seguinte (PINTO, 2013; POWELL & TABACHNICK, 2013) (Figura 2).

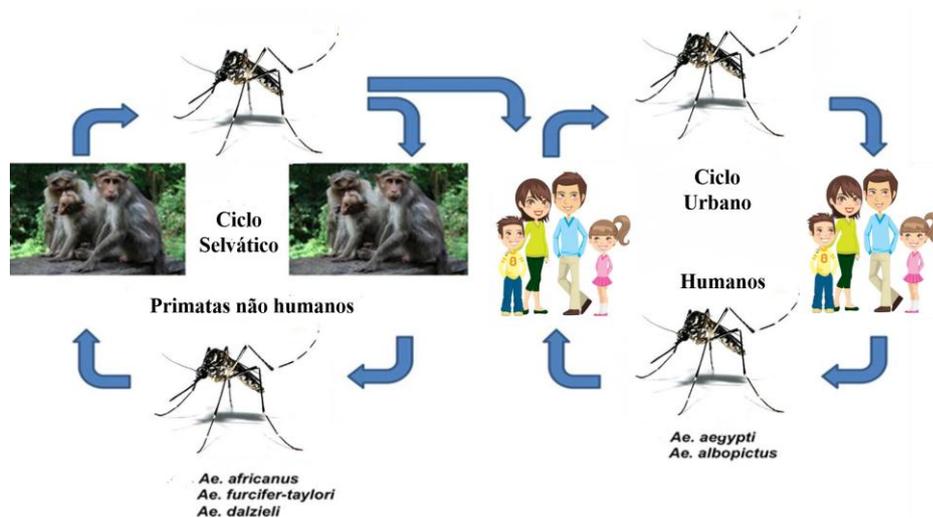


Figura 2. Ciclo de transmissão selvático e urbano do vírus Chikungunya.
Fonte: <http://pt.slideshare.net/Claupaiva/chikungunya-48632924>. Adaptada.

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Distribuição Geográfica do vírus Chikungunya no mundo

Atualmente três genótipos do CHIKV foram identificados e descritos desde sua descoberta em 1950 na África (África Ocidental (WA), África Oriental e Central-Sul (ECSA),

da Ásia e da linhagem do Oceano Índico (IOL)). O genótipo ECSA causou grandes epidemias entre 1950 a 1953. As primeiras evidências diretas de fora da África de pacientes acometidos com o CHIKV vieram de Bangkok, Tailândia, onde o CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1958, durante um surto associado à transmissão por *A. aegypti*. Subsequentemente, CHIKV também foi descoberto em epidemia na costa leste da Índia de Calcutá para Sri Lanka entre 1961 e 1964, em surtos que foram muitas vezes associados com o vírus da Dengue, pois na maioria dos casos o *A. aegypti* foi descrito como vetor (WEAVER, 2015). Foi essa epidemia que resultou no reconhecimento das diferenças clínicas pronunciadas entre síndromes causadas por vírus da dengue e vírus Chikungunya. Depois de 1964, o vírus Chikungunya aparentemente desapareceu da Índia, com os últimos casos registrados em 1972, mas continuou a circular no Sudeste Asiático, ocasionalmente como pequenas e médias epidemias (RANKALLE et al, 2007).

Em 2004, CHIKV pertencente à linhagem África Oriental e Central-Sul emergiu de Lamu e Mombaça na costa do Quênia e se espalhou para o arquipélago de Comores na África e mais tarde, para ilhas do Oceano Índico, incluindo La Réunion (SCHUFFENECKER et al, 2006). Entre 2005 e 2006, uma epidemia causada pelo vírus Chikungunya originada na África oriental foi observada na Ilha de Reunion, em seguida, nas ilhas Maurícias, Madagáscar, Mayotte e Seychelles. A epidemia logo se espalhou para o Sudeste Asiático e Índia, nessas regiões o vector predominante era o *Ae. Albopictus* transmitindo preferencialmente por uma variante do CHIKV que apresentava uma mutação no aminoácido 226 da proteína E1. Essa mutação contribuiu significativamente para o aumento da transmissão do vírus por *Ae. albopictus* na região (TSETSARKIN et al, 2007).

Em 2006, surtos de febre Chikungunya foram descritos em diferentes áreas do estado de Maharashtra na Índia e mais de 2000 casos foram relatados da cidade de Malegaon também na Índia, entre fevereiro e março do referido ano (KASHYAP et al, 2010). A variante IOL causou o primeiro surto do CHIKV na Europa e na Itália, em 2007. Desde 2008, as estirpes CHIKV IOL também foram importadas para o Sudeste Asiático: Malásia, Singapura, Tailândia, China, Camboja e Bhutan (WANGCHUK et al, 2013). Casos autóctones de CHIKV foram relatados em setembro de 2010, no sudeste da França, tendo o *Ae. albopictus* como o vector, este mesmo vetor encontra-se em vários países Europeus e juntamente com o *Ae. aegypti* e está bem estabelecido no sul dos Estados Unidos da América (PINTO, 2013). Em 2011 houve uma propagação do vírus para Américas e as preocupações com a dispersão e estabelecimento do vírus nas Américas e em outros países cresceram principalmente a partir

deste ano, quando um surto, com mais de 11.000 casos ocorreu na República Democrática do Congo (AZEVEDO et al., 2015). Com efeito, em outubro de 2013, dois casos de CHIKV autóctones foram confirmados em laboratório e detectados no território francês de Saint Martin Island, no Mar do Caribe. Surpreendentemente, a estirpe CHIKV isolada pertencia ao genótipo asiático e não o IOL, que surgiu em 2004 na Bacia do Oceano Índico e na Ásia. Essa estirpe foi filogeneticamente identificada na China em 2012 e Filipinas em 2013 (LEPARC-GOFFART et al., 2014; LANCIOTTI & VALADERE, 2014). A transmissão local dos casos importados também resultou em 11 casos autóctones na Flórida durante o verão de 2014 e, no mesmo ano no Sul da França houve um pequeno surto que teve como vetor o *Ae.albopictus* (WEAVER, 2015). Depois de chegar ao Caribe, após a sua descoberta inicial em St. Martin, a estirpe asiática do CHIKV a partir de 09 de janeiro de 2015 só aumentou. O Centro de Controle e Prevenção para Doenças dos EUA (OPS, 2011) relatou que a doença havia sido identificada em 42 países ou territórios no Caribe, América Central, América do Sul e América do Norte (HALSTEAD, 2015).

Essas recentes descobertas e a história do movimento CHIKV sugerem que ele continue a se espalhar por todas as Américas e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo onde circulam mosquitos vetores. A principal razão para o aumento da transmissão do CHIKV em todo o mundo são as viagens internacionais de pessoas virêmicas que retornam aos países onde os vetores competentes são autóctones. (Figura 3).

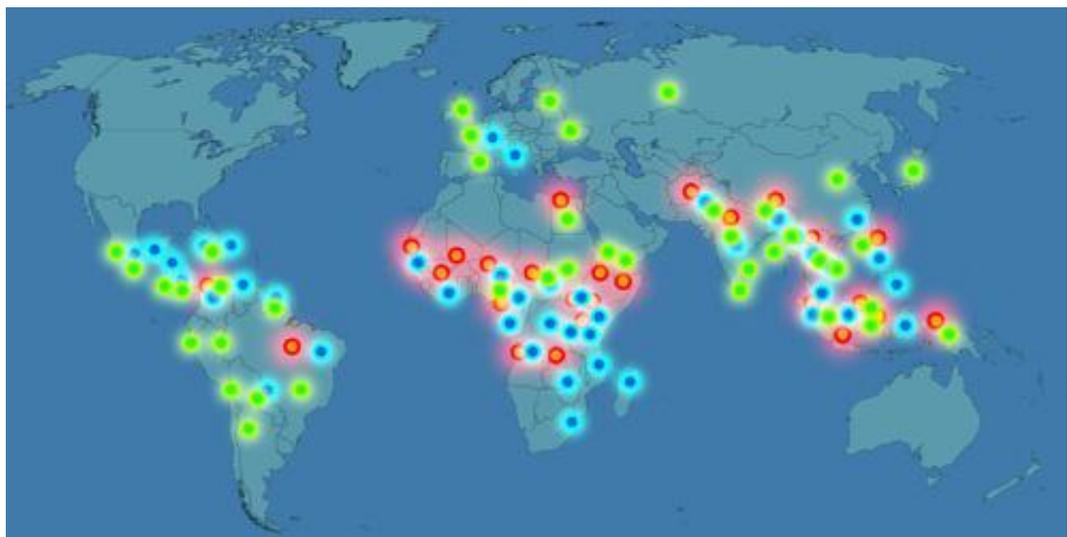


Figura 3. Os pontos coloridos demonstram onde os *Alphavirus* foram registrados. Os pontos em azul são os casos registrados de Chikungunya pelo mundo.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

1.3.2 No Brasil

Atualmente a febre chikungunya já ocorre nas Américas, África, Europa, Ásia e Oceania (DONALISIO & FREITAS, 2015).

O primeiro caso de febre chikungunya importado no Brasil em setembro de 2010, era um paciente do sexo masculino detectado em São Paulo, advindo da Indonésia (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

Em 13 de setembro de 2014 foram confirmados os primeiros casos autóctones no Brasil, em Oiapoque, Estado do Amapá. Sete dias depois, casos autóctones também foram confirmados em Feira de Santana na Bahia e em outros estados da federação, fechando o ano com cerca de 1.364 casos de febre chikungunya notificados ao Ministério da Saúde, destes, somente 71 foram importados (HONÓRIO et al, 2015). Os demais foram autóctones distribuídos nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul (WHO, 2016; FVS-AM, 2016; NILDIMAR et al., 2015).

Em 2015, o Ministério da Saúde notificou um total de 20.661 casos de CHIKV e 7.823 (38%) suspeitos. Destes, 35% foram confirmados por diagnóstico clínico e 3% por diagnóstico laboratorial, sendo notificados em 84 cidades no Brasil. Ainda segundo boletim epidemiológico do MS ocorreu um total de três nortes no Brasil em 2015, sendo duas na Bahia e uma em Sergipe (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016; MARIA RITA et al., 2015).

Este ano, até janeiro de 2016, haviam sido notificados 15.276 casos suspeitos de CHIKV, destes, 374 confirmados clinicamente (WHO, 2016). Em meados de março, porém, dados atualizados da Subsecretaria de Vigilância em Saúde do Rio de Janeiro, confirmou um surto de febre chikungunya na cidade, transmitido pelo mosquito *A. aegypti*. Segundo balanço estadual de 23 de março, um total de 235 casos suspeitos foi notificado no Estado com 26 confirmados. Entretanto, a Secretaria Municipal de Saúde informou que são 52 casos confirmados, só na capital. A Secretaria Municipal reforça que, a divergência dos dados deve-se ao fato de não terem ainda sido repassados de forma atualizada à secretarial estadual. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016)

1.3.3 No Amazonas

O estado do Amazonas, pelo clima equatorial úmido, é normalmente considerado como área de risco potencial para proliferação do mosquito *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (WEAVER, 2015).

Na capital do Amazonas, o primeiro caso de febre chikungunya foi registrado em junho de 2014, era um paciente oriundo de Porto Príncipe, Haiti. Posteriormente, ainda em 2014 na cidade de Manaus foram notificados 31 casos, desses 9 foram confirmados como febre chikungunya, todos importados (01 do Haiti, 02 da Guiana Inglesa, 04 da Venezuela, 01 da Colômbia e 01 do Suriname). Nos casos existe a suspeita de que a infecção tenha ocorrido nos países de origem ou durante deslocamento dos indivíduos.

Em julho de 2015 de acordo com a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) foi registrado o primeiro caso autóctone na Capital do Estado do Amazonas. Seguido de 165 casos suspeitos notificados no decorrer do ano, com 12 confirmados, desses, cinco autóctones (adquirido em Manaus) os demais importados (05 da Venezuela, 01 do México, e 01 do Suriname).

De acordo com a Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) “os casos importados de Chikungunya confirmados, até o momento, no Amazonas tiveram as seguintes procedências: Haiti (01), Guiana Inglesa (02), Venezuela (03), Colômbia (01), Suriname (01), México (01). Sendo que há, ainda, 21 casos suspeitos da doença que aguardam os resultados laboratoriais. O IEC, que é a única referência nacional para análise dos casos suspeitos da doença, tem levado, em média, dois meses para liberar os resultados” (Boletim de Vigilância em saúde, 2016).

Até a Semana epidemiológica 7 de 2016 existem 7 casos sob investigação de febre chikungunya na capital amazonense (WHO, 2016; FVS-AM, 2016).

1.4 Organização Genômica

O genoma CHIKV é formado por partículas virais icosaédricas, com cerca de 60 a 70nm de diâmetro, a proteína precursora de membrana (prM) juntamente com as glicoproteínas de envelope (E) formam o revestimento externo da partícula viral, o invólucro lipídico. Estas proteínas se associam a heterodímeros que formam trímeros, que se projetam

na superfície do vírus (THOMAS et al, 2013). O involucro cobre o nucleocapsídeo (proteína C) de 40nm de diâmetro e que está diretamente ligada ao material genético do vírus (PINTO, 2013) (Figura 4).

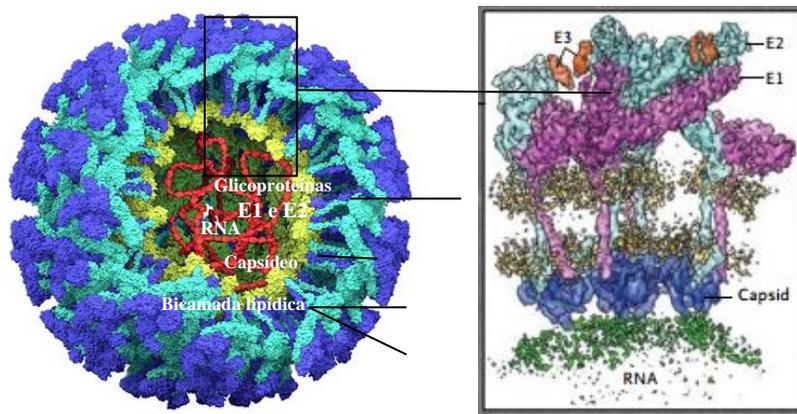


Figura 4. Estrutura esquemática da partícula viral do Chikungunya e as proteínas estruturais. Fonte: SCOTT, 2015, adaptada.

O genoma de CHIKV é composto por uma molécula de RNA de fita simples, linear, sentido positivo, medindo aproximadamente 11.8 kb. Possui duas grelhas abertas de leitura (ORFs), um *cap* na extremidade 5' e uma poli-A na extremidade 3' (Figura 5). A região 5' não traduzida (NTR) é composta de 76 nucleotídeos e a NTR 3' tem 526 nucleotídeos. Na região de junção há 68 nucleotídeos não traduzidos na duas ORFs. As sequências nas extremidades 5' e 3', bem como na região intergenica, conservam elementos de sequência repetida que desempenham papéis importantes na regulação da síntese de RNA viral.

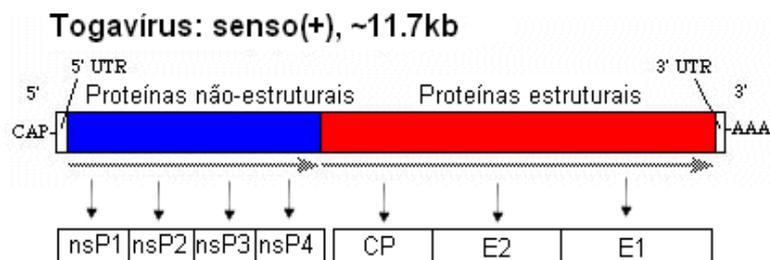


Figura 5. Genoma do vírus Chikungunya com suas proteínas estruturais e não estruturais. Fonte: <http://docplayer.com.br/4390910-Rubeola-a-doenca-o-virus.html>

As proteínas não estruturais são codificadas na região 5' do genoma viral (49s) por 2.474 aminoácidos, começa no códon de iniciação ATG (na posição 77 ± 79) e termina em

um códon de terminação TAG (posição 7499 ± 7501), formando às proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). Estas proteínas não estruturais são necessárias para a transcrição e a replicação do RNA viral. As proteínas estruturais são codificadas por 4.327 nucleotídeos situados em um ácido ribonucleico mensageiro subgenômico (RNAm 26S) que é colinear com o um terço do genoma, que começa na posição 7498 e exclui a cauda poli- A, por um códon de iniciação na posição 7567 ± 7569 e terminada por um códon de paragem na posição 11.299 ± 11.301 . Esta ORF codifica uma poliproteína de 1.244 aminoácidos, a partir do qual 5 proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, E1 e 6K) são formados após a clivagem proteolítica. O envelope das glicoproteínas E2 e E1 é transmembranar tipo I e aparecem como heterodímeros ancoradas às membranas. Estas glicoproteínas correspondem aos picos do envelope que revestem a superfície do vírus. E2 e E1 são responsáveis pelo reconhecimento do receptor e a entrada do vírus nas células alvo pela fusão de membrana (VOSS. et al. 2010).

A proteína E3 (64 aminoácidos) funciona como uma chaperona, que possivelmente ajuda a glicoproteína E2 na sua conformação para formar os picos da superfície viral (SNYDERA, 2012). A proteína 6K é pequena, hidrofóbica e acilada rica em cisteína, está envolvida no processo de envelopamento de proteínas, na montagem do vírus e brotação, embora apenas pequenas quantidades de 6K sejam efetivamente incorporadas aos *virions* (ANTOINE et al, 2007).

A proteína C (261 aminoácidos), além de formar o núcleo capsídeo, desempenha um papel crucial na montagem e brotamento viral, pois tem capacidade de realizar funções inibidoras ou reguladoras. Possui três regiões I, II e III, cada uma com as suas respectivas funções separadas. Como mostrado na Figura 7. A Região I tem um elevado grau de carga positiva associada com a ligação não específica do RNA viral genômico, possui um determinante estrutural Helix 1, uma sequência de aminoácidos não carregadas envolvidas nas interações durante a formação do núcleo da proteína do nucleocápside e a sua estabilização. A região II contém a sequência mínima necessária para a ligação específica de RNA, enquanto o domínio da protease do terminal C- (região III) forma os capsômeros no núcleo da nucleocápside e interage com a glicoproteína E2 (KHAN et al., 2002; GOH et al., 2015) (Figura 6).

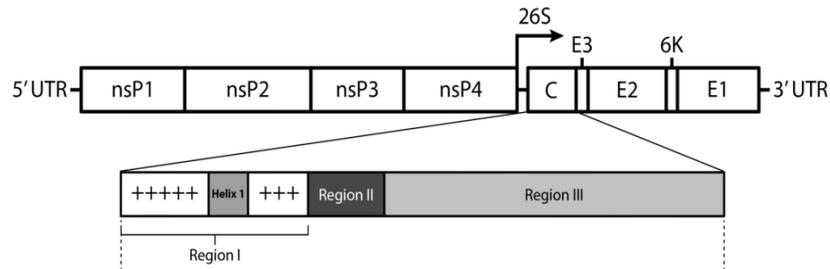


Figura 6. Componentes estruturais que formam a proteína do Capsídeo do vírus Chikungunya.

Fonte: GOH et al, 2015.

1.5 Ciclo de replicação do vírus dentro do hospedeiro humano

Os mosquitos que transmitem o vírus Chikungunya se alimentam várias vezes durante o seu tempo de vida podendo ingerir variantes geneticamente distintas da mesma espécie de vírus ou até mesmo vírus a partir de diferentes famílias. Uma vez que um vírus infectou as glândulas salivares do mosquito, este torna-se capaz de transmitir a infecção para o próximo hospedeiro vertebrado, geralmente pelo resto de sua vida (COFFEY, et al 2014).

O vírus Chikungunya penetra nas células alvo por endocitose. Após endocitose, o meio ácido do endossoma desencadeia mudanças conformacionais no envelope viral expondo o péptido E1. Esse processo promove a fusão da membrana do vírus na célula hospedeira, permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (CHO, 2008). Dois precursores de proteínas não estruturais (NSP) são convertidos a partir do RNAm viral, quando estes precursores são clivados geram as proteínas não estruturais NSP1 e NSP4. A NSP1 está envolvida na síntese da cadeia negativa do RNA viral, a NSP2 expõe a RNA helicase, RNA trifosfatase e a atividade de proteinase, está diretamente envolvida no desligamento da transcrição da célula hospedeira, a NSP3 faz parte da unidade de replicase e a NSP4 representa a RNA polimerase viral. Estas proteínas se juntam para formar o complexo de replicação viral e serve de molde para a síntese de ambos as regiões subgenômicas 26S e 49S. O RNA subgenômico dirige a expressão do precursor das proteínas estruturais as C-pE2-6K-E1, que são processadas por uma protease a serina autoproteolítica (SOLIGNAT et al., 2009). A proteína do capsídeo (C) é libertada, e as glicoproteínas pE2 e E1 são geradas por processamento adicional. Estas por sua vez são exportadas para o Complexo de Golgi e posteriormente para a membrana plasmática, a pE2 é clivada em E2 que está envolvido na ligação ao receptor e a E3 que medeia a dobragem correta de pE2 e sua subsequente associação com a E1. Deste modo, a montagem viral é promovida pela ligação do

nucleocapsídeo viral ao RNA viral e o recrutamento das glicoproteínas do envelope associada à membrana. Nesta fase, a partícula viral completa ou *virion* está pronta para ser liberada para o meio extracelular. (SNYDERA & MUKHOPADHYAY, 2012; MAXIME et al., 2009) (Figura 7).

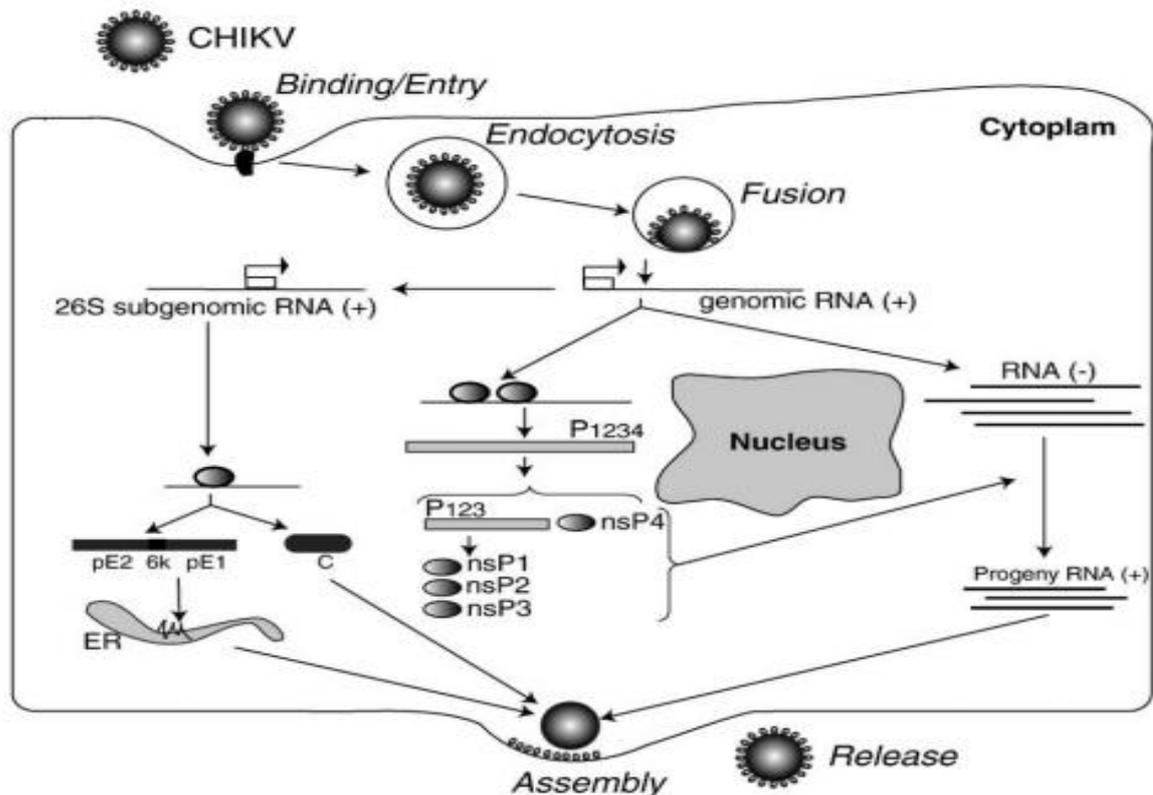


Figura 7. Ciclo de replicação do vírus Chikungunya, os estágios e as proteínas.
Fonte: SOLIGNAT et al., 2009.

1.6 Resposta do sistema imunológico ao CHIKV

Estudos mostram que todos os indivíduos desde que não tenham sido previamente expostos ao CHIKV estão sob o mesmo risco de infecção e de desenvolver a doença, uma vez que só a infecção confere imunidade ao indivíduo. A resposta imune inata seria, assim, importante fator na defesa contra a infecção pelo CHIKV uma vez que a resposta à infecção viral é determinada por uma série de interações entre o vírus e o sistema imunológico de cada indivíduo. A infecção por CHIKV pode se manifestar de diferentes formas clínicas, sendo as mais comuns a febre e a dor nas articulações (PETITDEMANGE et al., 2015).

No caso da infecção por CHIKV os mecanismos não específicos de defesa têm papel fundamental. Por outro lado, a infecção por CHICKV muda a estrutura dos receptores das células Natural killer (NK) para ativador de CD94/NKG2C. O que leva a crer que o CHIKV evoluiu para escapar das respostas imunes celulares por antiviral. Um exemplo dessa estratégia é o que acontece com a proteína CHIKV nsP2, que tem sido demonstrada como indutora da degradação da polimerase II, subunidade de RNA celular, indispensável para a transcrição celular. Ou seja, atua diretamente bloqueando a ativação de vários genes, inclusive aqueles envolvidos na resposta antiviral (AKHRYMUK et al., 2012).

Mediante análise de amostras de plasma durante a epidemia de Gabão Libreville em 2007 ficou demonstrado que os interferons, as citocinas e quimiocinas têm papel primordial no sistema de defesa durante infecção por CHIKV. Uma vez que todos apresentaram índices elevados durante os primeiros quatro dias de infecção. O Interferon é uma proteína produzida pelos leucócitos e fibroblastos para interferir na replicação de vírus no início do processo, bem como na infecção por bactérias e células de tumores estimulando a atividade de defesa de outras células. Existem três tipos de Interferon, tipo I, II e III classificados de acordo com o receptor celular e resposta que os ativam, outros receptores também, já as citocinas e as quimiocinas ativam a resposta específica (PETITDEMANGE et al., 2015).

Em estudo realizado em modelo animal usando o Interferon do tipo-I (IFN- α/β), por exemplo, foi demonstrado que o IFN-I parece desempenhar um papel importante na resposta imunológica inata do hospedeiro durante infecção causada pelo CHIKV. Nesse estudo demonstrou-se que após a infecção, os fibroblastos do hospedeiro produziram Interferon tipo alfa e beta (IFN α e β) (WAUQUIER et al., 2011).

Na fase crônica, sugere-se que a persistência viral ou a falta de exclusão total do antígeno, ou ambos, contribuam para a dor nas articulações. A resposta inflamatória durante a fase aguda e crônica da doença resulta, em parte, de interações entre o vírus e monócitos e macrófagos.

Os níveis elevados de citocinas específicas têm sido associados à doença aguda mais severa e crônica, bem como a dor nas articulações persistente que tem sido associada a níveis elevados de IL-6 e fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). No entanto, há pouca evidência ligando doença do vírus Chikungunya crônica e o desenvolvimento de autoimunidade (COUDERC & LECUIT, 2015).

Embora a imunidade inata desempenhe papel importante na fase inicial da infecção por CHIKV, a imunidade adaptativa vem em seguida para dar respostas de memória específicas prolongada ao vírus (McCANCE & HUETHER, 2014). Há poucos estudos sobre o papel das células T em doentes acometidos pelo CHIKV, mas as células T CD8+ dominam as fases iniciais da doença, juntamente com as células T CD4+ que aparecem mais tarde para ajudar na produção da resposta humoral específica-CHIKV. Também tem sido relatado que as células T CD4+ foram detectadas na membrana sinovial de um doente sofrendo de inflamação crônica pós-infecção por CHIKV (FOK-MOON & LISA, 2015).

As Células B e anticorpos específicos de CHIKV foram caracterizados extensivamente durante os últimos anos. Anti-CHIKV imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) são detectados nos soros de pacientes infectados, durante a fase aguda da doença. Estes anticorpos exibem uma elevada atividade neutralizante, importante para proteção contra a infecção por CHIKV (MOHD ZIM et al, 2013).

1.7 Patologia

Após ser picado por um mosquito infectado com CHIKV e adquirir a febre chikungunya (CHIKF), a maioria dos indivíduos apresenta sintomas depois de um período de incubação que pode variar do primeiro ao decimo dia. No entanto, nem todos os indivíduos infectados desenvolvem sintomas, estudos sorológicos indicam que cerca de 3% a 28% das pessoas apresentam anticorpos contra a infecção pelo CHIKV sendo estas assintomáticas (OPS, 2011). O CHIKV pode causar doença aguda, subaguda e crônica.

A CHIKF aguda geralmente dura entre 3 e 10 dias, caracterizada por início súbito de febre alta acima de 39°C, dores severas nas articulações, dor de cabeça, dor nas costas, mialgia, náuseas, vômitos, poliartrite, erupção cutânea e conjuntivite. Indivíduos com febre chikungunya aguda, com manifestações clínicas ou assintomáticos podem contribuir para a propagação da doença, se vetores que transmitem o vírus estirem presentes convivendo na mesma área (SIMON et al, 2011).

A fase subaguda a CHIKF permanece cerca de um mês a três meses após a fase aguda da doença, durante essa fase o principal sintoma é a artrite, no entanto alguns pacientes podem apresentar distúrbios dos vasos sanguíneos, como fenômeno de Raynaud (condição em

que há diminuição do fluxo de sangue para as mãos e pés em resposta ao frio ou estresse em seu corpo).

A fase crônica da doença acontece pela persistência de alguns sintomas característicos da CHIKF, na maioria dos pacientes, as dores nas articulações desaparecem em algumas semanas, no entanto, a artrite pode persistir em cerca de 33% dos pacientes durante 4 meses, 15% durante 20 meses, e em 12% durante 3 a 5 anos. Os pacientes infectados podem ainda manifestar poliartrite inflamatória, grave tenossinovite subaguda ou bursite nas mãos, pulsos, e exacerbação da dor ao movimento nas articulações previamente lesadas. As pessoas mais idosas e aqueles com doenças articulares reumáticas e traumáticas subjacentes parecem ser mais vulneráveis a desenvolver a fase crônica (MOHAN et al, 2010). Certas manifestações atípicas são mais comuns em determinados grupos. Por exemplo, meningoencefalite e dermatose vesicular são observadas mais frequentemente em crianças e recém-nascidos, respectivamente (RAJAPAKSE, 2010).

A idade contribui para o desenvolvimento de outras doenças mais graves nos indivíduos que são acometidos pela CHIKF, crianças e idosos estão mais predispostos. Além da idade, doenças subjacentes, também são consideradas fatores de risco para evolução da doença. Por outro lado, estudos relatam que mulheres grávidas que estão com a CHIKF, não transmitem o vírus para o feto (TOURET, 2006). No entanto, uma pesquisa feita por pesquisadores do Instituto Pasteur /Avenir Inserm U604, na Ilha La Réunion em 2008, descreveu casos de infecção da mãe para o feto. O estudo também mostrou que, um em cada dois casos de crianças que contraíram o vírus Chikungunya por transmissão materno-fetal podem desenvolver uma forma mais grave da doença, como encefalopatia resultando em edema cerebral e complicações hemorrágicas (GÉRARDIN, 2008; GOH et al., 2013). Os idosos são mais propensos a desenvolver a doença atípica grave levando estes a óbito. Indivíduos com idade acima de 65 anos apresentaram uma taxa de mortalidade 50 vezes maior do que adultos com menos de 40 anos. Embora não esteja totalmente claro o motivo pelo qual os idosos estão em maior risco de doença grave, pode ser que ocorrem mais frequentemente doenças subjacentes ou concomitante diminuição da resposta imunológica.

Atualmente não há tratamento antiviral específico para CHIKF (PETITDEMANGE, 2015). O tratamento é direcionado principalmente para aliviar os sintomas, inclui repouso, líquidos, analgésicos e antipiréticos, mas estes tratamentos são incapazes de prevenir a progressão crônica da doença. O tratamento com corticosteroides pode ser necessário para os doentes que desenvolvem sintomas da doença subaguda ou crônica (SCOTT et al., 2015).

Para não contrair a CHIKF o ideal é prevenir, usando repelente contra os mosquitos, principalmente, idosos, crianças e mulheres gestantes, ou ainda o uso de vestimentas mais fechadas, redes mosquiteiras para proteger da picada de mosquitos infetados. Em nível comunitário, o controle do mosquito e seus *habitats* e aplicações adequadas de larvicida e adulticida, a eliminação de lixo e construção de tanques de água adequados para o armazenamento de água podem reduzir a disseminação viral. Porém, estas medidas se tornam insuficientes para o controle da transmissão da doença, mesmo nos países desenvolvidos (WHO, 2016).

1.8 Diagnóstico

Atualmente pouco se sabe sobre a patogenia e resposta imunológica específica ao vírus, o diagnóstico de CHIKV é realizado com base em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, uma vez que as manifestações clínicas são muito semelhantes às de outras doenças, provocadas por diferentes arbovírus principalmente aos da Febre da Dengue. Isso é devido principalmente à sobreposição geográfica dos dois vírus e da capacidade que os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* têm de transmitir as duas febres, causando altas taxas de morbidade e mortalidade em diferentes faixas etárias. Com isso, é possível que surtos provocados pelo CHIKV tenham sido erradamente atribuídos ao vírus da dengue.

O diagnóstico laboratorial de CHIKV pode ser realizado por sorologia, reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) tradicional e PCR em tempo real, isolamento viral e teste rápido. As amostras utilizadas são geralmente sangue ou soro, mas em casos com características neurológicas podem também ser obtidos líquidos cefalorraquidiano (LCR) (PONGSIR et al., 2012; OPS, 2011).

O isolamento do vírus pode ser feito a partir de mosquitos recolhidos em amostras de campo ou de soro na fase aguda da doença, por volta de 8 dias. O soro obtido a partir de sangue total recolhido durante a primeira semana da doença pode ser inoculado em linhagem celular susceptível ou em camundongos. O CHIKV típico produz efeitos citopáticos (CPE) no prazo de três dias após a inoculação em uma variedade de linhagens celulares, incluindo C6/36. O isolamento do vírus pode ser realizado em frascos de cultura e confirmado por imunofluorescência (IF) utilizando anti-soro CHIKV, ou por RT-PCR do sobrenadante de cultura em suspensão (cérebro de ratinhos).

A técnica de RT-PCR para detectar RNA do CHIKV é realizada a partir da extração do RNA viral, em seguida este material é transcrito em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa. O cDNA pode ser amplificado por PCR tradicional ou por PCR em tempo real (Sybr Green ou sondas Taqman), gerando milhares de cópias dos genes alvo, de modo a servir tanto para detecção quanto também para quantificação da carga viral no soro do hospedeiro (LEE et al., 2015). Os ensaios de PCR em tempo real são realizados em sistema fechado oferecendo maior sensibilidade e menor risco de contaminação (PRESTI et al., 2014).

Os testes sorológicos disponíveis incluem inibição da hemaglutinação (HI), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), diretos e indiretos ou/e teste de neutralização de redução de placas (PRNT). O diagnóstico sorológico pode ser feito pela pesquisa de anticorpos IgM ou IgG específicos para CHIKV ou por um aumento de quatro vezes no título de PRNT em amostras de fases aguda e convalescente. Anticorpos IgM específicos para CHIKV são confirmados pela utilização de técnicas que detectam o anticorpo imunoglobulina M (IgM) como o ELISA de captura (MAC-ELISA) seguida do PRNT com vários protocolos detalhados para ELISA IgM e IgG. O PRNT é utilizado para confirmar os resultados do MAC-ELISA pelo fato de reatividade cruzada no MAC-ELISA entre alguns membros do gênero *Alphavirus* ter sido observado (GOH et al., 2015; MARDEKIAN & ROBERTS, 2015). O PRNT, utilizado para confirmar o MAC-ELISA ou demonstrar um aumento de quatro vezes em amostras nas fases aguda e convalescente, é realizado usando normalmente outros vírus do mesmo gênero a fim de validar a especificidade da reatividade, sendo vantajoso por detectar no soro imunoglobulinas produzidas em 5 dias da doença ou até meses após infecção (OPS, 2011; SAM et al., 2011).

Os testes rápidos distribuídos para o diagnóstico do vírus Chikungunya são realizados em amostras coletadas do primeiro ao oitavo dia de início de sintomas. Um teste rápido, conhecido como imunocromatografia, ou teste de migração lateral, possui uma membrana de nitrocelulose no formato de fita. Impregnada em cada trecho com antígenos específicos, esta fita reage com o sangue coletado para o exame, indicando ou não a existência da doença. A leitura do resultado, semelhante à dos testes com fita para gravidez, é feita a olho nu e independe de especialistas (GRUPO FLEURY, 2014).

Atualmente, o laboratório de referência para realizar o diagnóstico laboratorial do Chikungunya é o Instituto Evandro Chagas, do Ministério da Saúde, localizado no Pará. Porém, outros laboratórios de saúde pública como Instituto Adolfo, Fundação Oswaldo Cruz e

alguns Lacs, estão em fase de treinamento para realizar o exame de detecção do vírus CHIKV.

Além do diagnóstico laboratorial campanhas de conscientização através de órgãos públicos têm contribuído para reduzir a disseminação dos mosquitos transmissores do vírus, porém, não são suficientes para erradicar os mosquitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A falta de uma medicação específica e vacinas contra o Chikungunya cria uma necessidade de se produzir técnicas laboratoriais específicas e sensíveis para diagnosticar CHIKV e diferencia-lo de outras arboviroses e *Alphavirus* ou arbovírus co-circulantes para aperfeiçoar as estratégias epidemiológicas, e direcionar os cuidados com os indivíduos acometidos pelo vírus que tenham desenvolvido quadros mais graves após a adquirir a CHIKV.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir antígeno recombinante a partir da clonagem e expressão da proteína do capsídeo (C) do CHIKV visando à detecção imunoenzimática de anticorpos em amostras de soro humano.

2.2 Objetivo específicos

- Desenhar um gene sintético a partir de sequências nucleotídicas do gene que codifica a proteína do capsídeo (C) do vírus Chikungunya;
- Clonar e expressar o gene sintético em linhagens de vetor plasmidial pGEM-T *Easy* e pET-23a +- *Escherichia coli*, respectivamente;
- Testar a proteína C recombinante em soro de pacientes infectados ou não por CHIKV e avaliar o seu desempenho como método imunoenzimático para detecção de anticorpos IgM e IgG do vírus Chikungunya.

3. Material e Métodos

3.2. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo descritivo que visa o desenvolvimento de um teste imunoenzimático a partir da clonagem e expressão da proteína C sintética do vírus Chikungunya.

3.3. Locais de estudo

Este estudo foi conduzido na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, nas dependências dos laboratórios do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) que compreende os blocos G e M, setor sul da Universidade Federal do Amazonas e laboratório de Biossegurança Nível 2 (NB2) da Gerência de Virologia na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

3.4. Etapas do estudo

O desenvolvimento deste estudo compreende duas etapas distintas: a primeira que consistiu no desenvolvimento do teste imunoenzimático, que resumidamente, envolveu o desenho de um gene sintético correspondente à proteína C do CHIKV, a clonagem do gene sintético, sequenciamento, expressão e purificação da proteína C recombinante para ser usada como antígeno recombinante na captura de anticorpos IgM e IgG para CHIKV; a segunda etapa consistiu na realização de testes imunoenzimático frente a amostras clínicas e validação do ensaio sorológico na detecção do CHIKV.

Abaixo segue o fluxograma de desenvolvimento das atividades previstas no projeto.

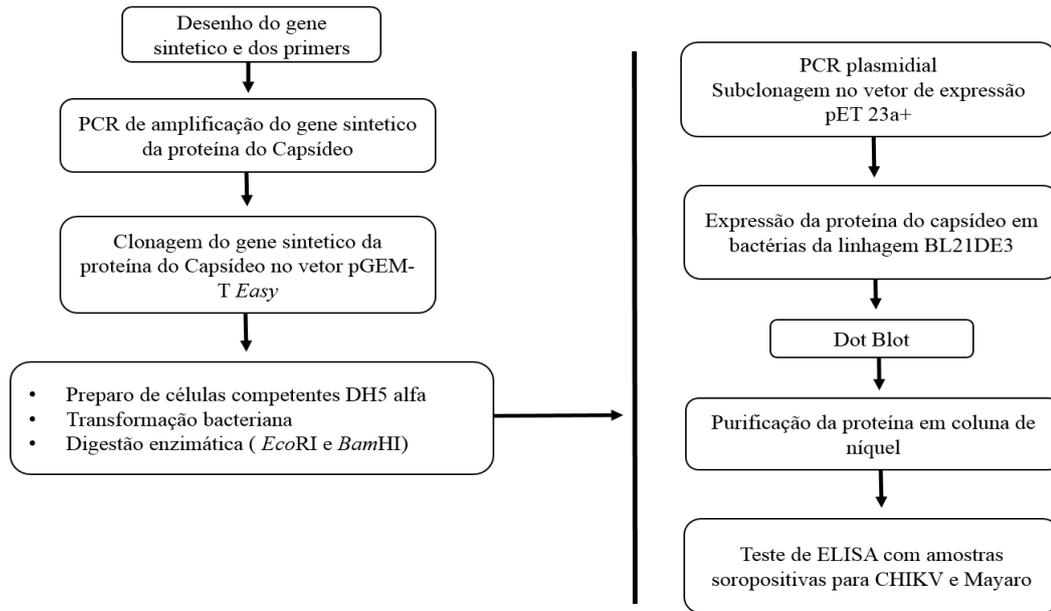


Figura 8. Fluxograma de atividades do projeto.

3.5. Estratégia de clonagem do gene que codifica a proteína do capsídeo (C) do vírus Chikungunya

Originalmente, a partir de uma sequência nucleotídica do vírus Chikungunya, obtida no *GenBank*, número de acesso: AF369024.2 foi desenhado um gene sintético de 800 pares de bases (pb), correspondente a proteína C do capsídeo viral. O fragmento selecionado foi traduzido e em cada extremidade da sequência de aminoácidos foi adicionado sítios de clivagem para as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* (Figura 9) a fim de posteriormente prepara-la para o processo de clonagem, respeitando a fase de leitura correta do gene.

```

METEFIPTQTFYNRRYQPRPWTPRPTIQVIRPRPRPQRQAGQLAQLISANKL
TMETRAVPQQKPRKNRKNKKQKQKQAPQNNNTNQKKQPPKKKPAQK
PGRRERMETCMETKIENDCIFEVKHEFI....GKVTGYACLVGDKVKPAHVKG
TI
DNADLAKLAFKRSSKYDLECAQIPVHMKSDASKFTHEKPEYYNWHHGAVQY
SGGRFTIPTGAGKPGDSGRPIFDNKGRVVAIVLGGNEGARTALSVVTWNKDI
VTKITPEGAEWS.
  
```

Figura 9: Sequência completa da proteína C de 800 pb do vírus Chikungunya.

A partir da sequência original foi retirada a sequência sinal da proteína do capsídeo e adaptado o uso de códons preferenciais para expressão em *E. coli*. O produto final foi uma sequência otimizada denominado comercialmente de *GBlock*® *Gene fragments*, sintetizada pela *Integrated DNA Technologies* (IDT)

Em virtude das dificuldades para clonagem direta da proteína C completa (800pb), no presente estudo, porém, foi utilizado um fragmento de 400 pb do mesmo gene que codifica a proteína C do capsídeo (Figura 10).

```

M E T E F I P T Q T F Y N R R Y Q P R P W T P R S A I Q I I R P R P
R P Q R Q A G Q L A Q L I S A V N K L T M E T R A V P Q Q K P R
R N R K N K K Q K Q K Q Q A P Q N N T N Q K K Q P P K K K P A
Q K K K K P G R R E R M E T C M E T K I E N D C I F E V K H E F I

```

Figura 10: Sequência da proteína C parcial do Chikungunya (400 pb).

A estratégia de clonagem foi alterada, realizando-se primeiramente a amplificação por PCR e depois a clonagem do produto da PCR. Para isso foi desenhado o par de *primers* CHIKV1 5'-AAAAGGATCCATGGAAACGGAATT-3' (*forward*) e CHIKV2 5'-AAAACTCGTGCTTAACTTCAAAGAT-3' (*reverse*). Quatro adeninas foram adicionadas nas extremidades 5' de cada primer formando uma calda poli(A). Essa estratégia foi usada a fim de conferir estabilidade e maior capacidade de hibridização a molécula alvo. A síntese dos *primers* também foi realizada pela IDT.

3.6. Amplificação do gene sintético da proteína do capsídeo (C) do vírus Chikungunya

As reações de PCR para a amplificação do GBlock de 400pb foram feitas nas seguintes condições: 0,4µM de DNA sintético, 1X *buffer* PCR, 0,4µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada um dos *primer forward* e *reverse* (CHIKV1 e CHIKV2), 2,0 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 50µL.

A reação foi realizada em termociclador *Proflex PCR Sistem* (Applied Biosystems), programado para as seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 98°C por 30s (desnaturação), 53°C por 30s (hibridização) e 72°C por 30s (extensão), a extensão final foi a 72°C por 5min, sendo mantida a 4°C ∞.

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio (0,1µg/mL), usando como marcador de peso molecular o *Ladder* de 100pb (Invitrogen). Na eletroforese utilizou-se tampão 1X TAE (80mM Tris, 40mM ácido acético glacial, 2,5mM EDTA, pH 8,3), submetido a corrente elétrica de 80V por 60 min. As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV e a captura de imagens para fotodocumentação no *software Major Science*.

3.7. Purificação do produto amplificado por PCR

Após amplificação do gene sintético e confirmação do tamanho esperado, 25µl do produto da PCR foi aplicado em gel de agarose, conforme descrito anteriormente. Após eletroforese as bandas de interesse foram excisadas com lâminas de bisturi estéreis e purificadas utilizando kit comercial *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Para confirmar a eficiência da purificação, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,1µg/mL), acima descrito. Em seguida foi quantificado usando o sistema NanoDrop 2000c only (*Thermo Scientific*).

3.8. Clonagem do produto de PCR no vetor de Clonagem pGEM-T Easy – Reação de ligação

Para a clonagem foi selecionado o sistema pGEM-T *Easy* (Promega) que tem como característica um plasmídeo linear com uma deoxitimidina (T) em cada uma das suas extremidades 3`e que permite a inserção direta de produtos de PCR adenilado, formando assim um plasmídeo recombinante a ser introduzido posteriormente dentro da bactéria *Escherichia coli* visando a propagação plasmidial

A sequência codificada do gene de interesse, amplificada foi inserida no vetor pGEM-T *Easy* através de uma reação de ligação. Utilizando: 3,0µl do produto da PCR, 1,0µl da enzima T4 ligase (6U), 5,0µl do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (2X Rapid Ligation Buffer), 1,0µl da solução contendo o vetor pGEM-T *Easy* (50ng/µl) e água Mili-Q para completar o volume total de 10µl. A reação foi mantida a 16°C por 20 horas. Em seguida, as misturas do sistema de ligação foram utilizadas na transformação por choque térmico em células competentes *E.coli* DH5α.

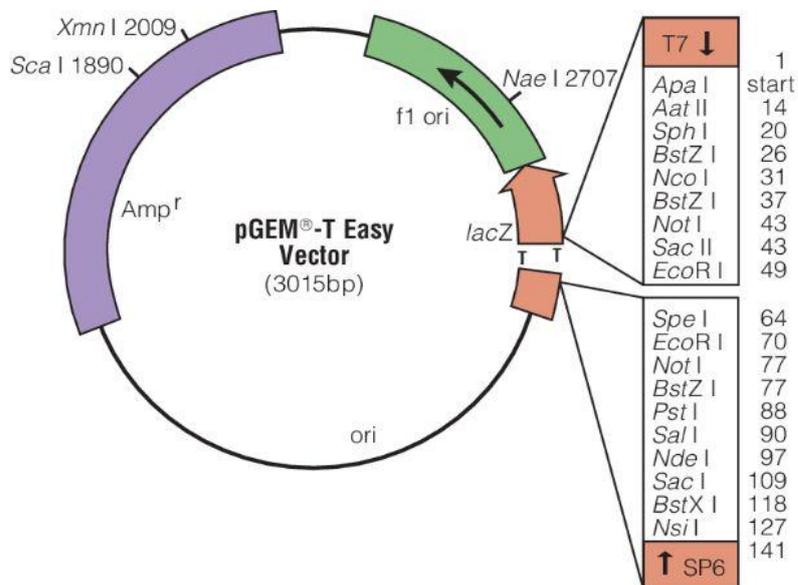


Figura 11. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T *Easy*.

Fonte: www.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem_t-easy-vector-systems/

3.9. Transformação da bactéria *Escherichia coli* DH5α com os plasmídeos recombinantes

A célula competente de *Escherichia coli* DH5α foi transformada, adicionando-se 2,0µl da reação de ligação para cada 300µl de célula competente. Esse sistema foi incubado por 30 minutos no gelo e choque térmico a 37°C por 10 minutos, mantendo no gelo por 5 minutos. Ao conteúdo dos tubos foi adicionado 250µL de meio líquido SOC e deixados sob agitação (*Shaker*) a 37°C, 150 rpm por 60 minutos. Em seguida, a solução de cultura foi plaqueada em placa de petri contendo 25µL de meio Luria-Bertani sólido (LB) (10g tripton, 5,0g extrato de levedura, 10g NaCl, 15g ágar/1.000 mL) e ampicilina (100 mg/mL), IPTG (isopropylthio-β-D-gactoside) e X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), usado

como marcador de colônias de bactérias transformadas com plasmídeo com o gene lacZ truncado. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C em estufa.

3.10. Extração, análise de restrição e PCR dos plasmídeos recombinantes pGEM-T Easy de *E.coli* DH5α

Após o período de incubação acima, algumas colônias brancas resistentes (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas para repique.

As colônias previamente selecionadas foram repicadas, individualmente em tubos com 5,0mL de meio LB líquido (10g triptona, 5g extrato de levedura, 10g NaCl), completando-se para 1000mL com água destilada) 5,0µl de com ampicilina (100 mg/mL) (pré-inoculo). Os tubos contendo a cultura de bactérias foram incubados sob agitação de 150 rpm, a 37°C, por 16 horas. Após, foi realizada extração do DNA plasmidial utilizando o kit comercial *Illustra PlasmidPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A extração com kit comercial proporciona materiais livres de contaminantes como DNA genômica, RNA, proteínas e macromoléculas, sendo mais indicado para alguns procedimentos como a subclonagem em plasmídeos de expressão. A quantificação do DNA plasmidial foi feita no espectrofotometro NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*).

Após quantificação, o DNA plasmidial foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). Como marcador de peso molecular foi usado o *Ladder* de 1Kb (*Invitrogen*) as imagens foram fotodocumentadas usando o *software* Major Science.

A reação de restrição foi preparada com 2,5µl de tampão de enzima 10x, 2,0µl *EcoRI*, 2,0µl *BamHI* (*BioLabs*), 10,0µl de DNA plasmidial, 0,75µl de BSA e água ultrapura para completar o volume de 25,0µl incubada por 3 horas a 37°C e 20 min por 65°C para inativar a enzima. A reação de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% previamente acrescido brometo de etídio 0,5µg/mL, visualizado sob a luz ultravioleta. A banda correspondente a 400pb o gene da proteína do capsídeo foi excisada do gel de agarose e purificada usando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (*GE*).

3.11. Preparação do plasmídeo pET-23a+ para Subclonagem

3.11.1. Características do vetor

O vetor pET-23a+ possui uma sequência que codifica a cauda de histidina na região N-terminal da proteína, uma origem de replicação (455pb), as regiões do promotor, a sequência referente ao *operon* da lactose, LacI (1079pb) e o gene que confere resistência a Ampicilina (857pb). Os promotores do T7 RNA polimerase consistem em uma sequência altamente conservada de 16 pb que marca o local do início da transcrição (+1) e estende por 3'-17 a 5'+6. Além disso, apresenta também uma região com múltiplos sítios de clonagem, que podem ser clivados por enzimas de restrição (Figura 11).

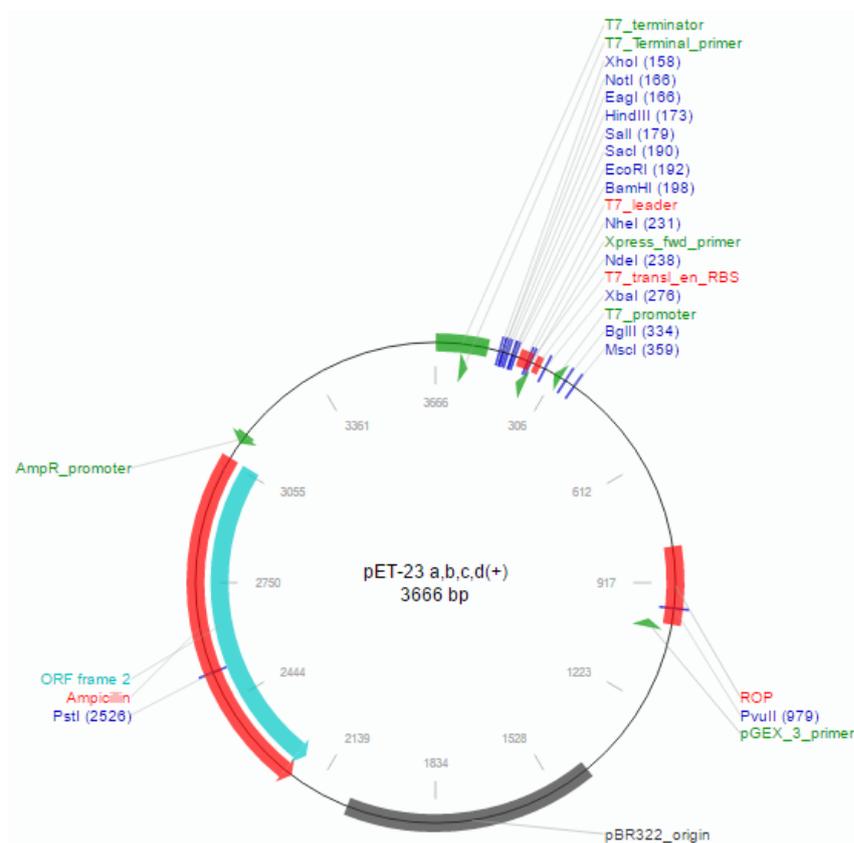


Figura 12. Mapa do vetor pET-23a+ e sequencias de pontos de referências.

Fonte: <http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/files/mappet23d.pdf>

3.10.2 Procedimentos

3.10.2.1 Digestão por endonucleases e digestão do pET-23a+

O vetor de expressão pET-23a+ foi linearizado por dupla digestão com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI* usando 1,5µl de tampão de enzima 10x, 1,0µl

EcoRI, 1,0µl *BamHI* (BioLabs), 10,0µl de DNA (127, 48 ng) plasmidial, 0,15µl de BSA e água ultrapura para completar o volume de 15,0µl a 37°C por 3 horas, seguido de inativação a 65°C por 20 min. Este procedimento foi realizado para deixar as extremidades coesivas do vetor iguais às do inserto para posterior subclonagem. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 0,8%. A banda correspondente ao vetor pET-23a+ foi excisada do gel e purificada usando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE).

3.11 Subclonagem do gene no plasmídeo de expressão pET-23a+

Para a ligação do fragmento codificante da proteína C ao vetor de expressão pET-23a+ os produtos da PCR purificado acima (item 3.10) foram ligados usando o seguinte sistema de ligação: 5,0µl inserto, 2,0µl pET-23a+, 1,0µl Tampão 10X, 1,0µl T4-DNA ligase durante 24 horas a 16°C. As quantidades de vetor e inserto utilizadas foram obtidas de acordo com a fórmula abaixo.

$$\frac{X \text{ (ng)} = Y \text{ (pb inserto)} \times Z \text{ (ng vetor)}}{\text{Tamanho do vetor (pb) 1:1}}$$

A nova ligação foi utilizada na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* DH5α para a nova propagação plasmidial.

O Procedimento empregado na transformação das células competentes *E. coli* DH5α no vetor de expressão pET-23a+ foi o mesmo descrito anteriormente na tópico 3.8.

3.12 Extração, análise de restrição e sequenciamento do plasmídeo pET-23a+ das células competentes *E.coli* DH5α

Após ligação, as colônias foram repicadas individualmente em tubos estéreis com 5,0mL de meio LB líquido contendo 5,0µl de Ampicilina (100 mg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C *overnight* sob agitação de 150 rpm. A partir dessa cultura, as células tiveram

seus DNAs plasmidiais extraídos utilizando o kit comercial *Illustra PlasmidPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, e quantificados em NanoDrop 2000c only (*Thermo Scientific*). O DNA também foi analisado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio a 0,5µg/mL e foto documentado.

Para confirmar a presença do inserto no vetor de expressão, foi realizada digestão enzimática e sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi feita como uma segunda forma de confirmar se nos plasmídeos extraídos do processo de subclonagem estava presente o gene sintético e para verificar a correta orientação e localização do inserto dentro do vetor. A reação de sequenciamento foi usado 1,0µl de Big Dye terminator Cycle Sequencing v.3.1 (*Applied Biosystems*), 2,0µl de tampão de sequenciamento 5X, 0,5µl de “primer” *Sense* ou *anti sense*, 5,0µl (20 ng) do produto de PCR purificado e água ultra pura completar o volume final de 10µl. A reação foi realizada em termociclador Veriti 96-Well (*Applied Biosystems*), com ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 4°C infinito..

A reação foi purificada utilizando 2,0µl de acetato de sódio/EDTA (1,5M NaAc e 259 mM EDTA) e 60µl de etanol absoluto, seguido de centrifugação a 4000rpm/4°C por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre papel toalha, foi adicionado 150µl etanol 70% e centrifugado por 15 min a 4000rpm/4°C, descartado o sobrenadante, repetido o passo acima por duas vezes e deixado secar em temperatura ambiente por 1 hora. O *pellet* foi ressuspendido em 10,0µl de formamida, a placa contendo as amostras foi aquecida por 1 minuto e levada ao sequenciador automático ABI 3130XL (*Applied Biosystems*).

As sequências geradas foram analisadas no programa UniProt – base de conhecimentos na internet sobre proteínas – com referência disponível em: <http://www.uniprot.org/blast/> e no programa BioEdit v.7.2.5/2014.

3.13 Transformação da bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo recombinantes

O plasmídeo pET-23a+, contendo o inserto com sua fase de leitura correta, foi selecionado para ser transformado em células competentes de *E. coli*. Da linhagem BL21(DE3).

A bactéria BL21(DE3) é uma linhagem lisogênica muito utilizada no sistema pET de expressão. Ela é obtida pela infecção da *E. coli* pelo fago DE3, um derivado do fago λ , que contém clonado o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor LacUV5, sendo capaz de produzir T7 RNA polimerase, quando o promotor LacUV5 for induzido com isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) adicionado ao meio de cultura. A T7 RNA polimerase produzida transcreve o DNA clonado no vetor pET, produzindo grandes quantidades de mRNA que é então utilizado pela bactéria para produzir grandes quantidades da proteína recombinante.

Inicialmente, a bactéria *E. coli* (BL21-DE3) foi transformada com a construção plasmidial pET-23a+ e CHIKV. Adicionando-se 10,0 μ l desta mistura a 80,0 μ l de cada cultura de células competentes em tubos, seguido de incubação por 30 minutos no gelo e choque térmico por 10 minutos 37°C e depois colocada no gelo por 5 minutos, ao conteúdo dos tubos foi adicionado 250 μ l de meio líquido SOC, estes foram levados para agitação (*shaker*) de 150 rpm, por 60 minutos, à 37°C. Posteriormente foram plaqueadas em placa de petri contendo 25 μ l de meio Luria-Bertani sólido (LB) (10g triptona, 5,0g extrato de levedura, 10g NaCl, 15g ágar, completando o volume para 1.000mL com água destilada) com ampicilina (100 mg/mL) e as placas incubadas a 37°C *overnight*.

3.14 Indução da expressão em *E.coli* BL21 (DE3)

Uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) transformada com plasmídeo recombinante foi transferida para 5,0mL de meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de Ampicilina. Esse meio de cultura foi incubado a 37°C sob agitação por 16 horas. No dia seguinte, 200 μ l dessa cultura foram transferidos para 10mL de meio LB líquido contendo antibiótico e incubado a 37°C até atingir a O.D (densidade óptica) de 0,6 a 0,8. Ao atingir esta faixa foi adicionado 1mM de IPTG para fazer a indução e a cultura foi incubada por 4 horas a 25°C. Após este período, 1mL da cultura foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao sedimento 100 μ l de água e 100 μ l de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X (Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 300 mM, 2mM β -mercaptoetano 15%, azul de bromofenol 2%, Tritin X-10 0,5% e glicerol 10%). Em seguida, a mostra foi ressuspensionada e fervida por 5 minutos para posterior análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE solução de Comassie-*blue*.

3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Com objetivo de visualizar a proteína recombinante secretada após o processo de indução esta foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme metodologia descrita por Sambrook et al., (1989), modificada. Uma alíquota 50µl foi ressuspensa em 100µl tampão de amostra 1X para SDS-PAGE, fervida por 5,0 minutos e mantida em gelo até aplicação no gel.

As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 5,0% e separador de 12%. O gel foi polimerizado em placa de vidros em sistema vertical, usando tampão de corrida Tris-Glicina (50mM Tris, pH 8,6 1,92M glicina e 1% SDS). O peso molecular da proteína obtida foi comparado com padrão de peso molecular de proteínas Bench Mark TM Protein Ladder (Invitrogen) de 250 KDa.

A eletroforese foi efetuada sob uma tensão de 120 V, após 2 horas de separação eletroforética, o gel foi posto em uma solução fixadora (38 mL de água, 50 mL de metanol 50% e 12 mL de ácido acético) por 60 minutos e em solução de corante *Comassie Brilliant Blue 250R* (Coomassie blue R250 0,25%, metanol 50%, ácido acético 10 %) por 4 horas, respectivamente. Para visualização das bandas, o gel foi descorado em solução de ácido acético 7% por 2 horas. A visualização do gel foi feita no equipamento (TYPHOON FLA 9000 - GE HEALTHCARE).

3.16 Dot Blot com anti-His (C-Terminal)

Para verificar a expressão da proteína recombinante obtida foi realizada a técnica de Dot-Blot utilizando anticorpos específicos para detecção da cauda de histidina *His-tag* C-terminal.

Nesse experimento, uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foi sensibilizada com conjugado *His-tag* e em uma placa de petri, foi posta em contato direto com as colônias selecionadas por um período de 24horas em temperatura ambiente. Após, a membrana com as colônias transferidas para ela, foi lavada três vezes com TBST (TBS + 0,1% volume/volume de Tween 20) durante 5 minutos. Em sequência, a reação foi bloqueada com 10mL de tampão de bloqueio (PBS-T 0,1% e leite em pó desnatado a 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana lavada com

20mL de água ultrapura por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado a membrana 10mL de Solução do Anticorpo primário diluído 1:2000, incubada por 1 hora a 37°C em shake de rotação. Passado o tempo a solução foi descartada e a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com 10 mL de solução de lavagem e incubada com 10mL de Solução de Anticorpo secundário por 30 minutos sob agitação, respectivamente. Novamente a membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem e adicionado 20mL de água por duas vezes e adicionado 5mL de substrato de cromogênio durante 1 a 60 minutos até que os spots na membrana aparecessem. Para bloquear a ação do substrato, a membrana foi lavada com 20mL de água e finalmente seca em papel filtro ou toalha, fotodocumentado e armazenada.

3.17 Purificação da Proteína do Capsídeo em coluna de Níquel

A purificação da proteína C foi realizada utilizando a Cromatografia líquida de alta eficiência- HPLC, através de coluna de níquel, o que só foi possível devido à cauda de histidina inserida no gene sintético. Foi utilizada a coluna de 24 sepharose-níquel HisTrap™ acoplada ao cromatografo. A coluna foi equilibrada com 15mL de tampão A (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, NaCl 300mM, 2 mM β-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,5 Triton X-100) que imobiliza a cauda de histidina presente na proteína. Em seguida foi adicionado 8,0mL do sobrenadante. A dissolução da proteína imobilizada na membrana da coluna foi feita por três lavagens com tampão B (Tampão A + 0,5M imidazol) em frações de 30mL de cada alíquota obtida da proteína purificada. A purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE 12%.

3.18 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A fim de validar a eficiência da proteína recombinante produzida como antígeno foi realizado testes imunoenzimático anti-IgM e anti-IgG com amostras clinicas utilizando o seguinte protocolo:

1. Sensibilização de placas (Prolab) de titulação por adsorção física de 50,0μl de antígenos protéicos totais (Proteína C) de três frações de proteínas (14, 15, 16 e

- 17) diluídas 1:250 em solução de Carbonato pH9.6, seguida de incubação a 4°C em câmara úmida por 24 horas.
2. A placa foi lavada 3X com tampão PBS+Tween 0,05% e seca. Em seguida foi adicionado 150 µl de PBS+LPD 10% na placa e incubada a 37°C por 2 horas em câmara úmida, seguida de 4 lavagens e secagem.
 3. Na placa seca foi adicionado 50µl de amostra de soro humano em triplicatas juntamente com os controles negativos em duplicatas. As amostras foram diluídas em tampão PBTS+LPD 10%, diluições de 1:100, 1:250, incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida, lavada 4 vezes e seca sobre a amostra de soro
 4. Posteriormente, em cada poço da placa foi adicionado 50µl do conjugado Anti-IgM e Anti-IgG humano marcado com peroxidase diluída 1:2000 em PBST+LPD 10%, incubada a 37° por uma hora em câmara úmida, lavada 5 vezes e seca. 100µl de substrato ABTS a 50% (solução A + solução B) foi adicionada na placa, nesta etapa a incubação durou entre 15 a 20 minutos, na estufa a 37°C coberta com papel alumínio e em câmara úmida. A reação enzimática foi interrompida com 50µl de HCl 1M. A reatividade foi avaliada pela densidade óptica (OD) de cada poço feita por espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm (Multiskan, MMC, Thermo Electron Corporation). Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma OD superior a 3,0 vezes a média da OD dos controles negativos.
 5. Para calcular a média e o desvio padrão foi usado o Programa ALEA – base de conhecimentos na internet sobre média e desvio padrão – com referência disponível em: <http://www.alea.pt/html>.

4. Resultados

4.1 PCR do gene sintético da proteína do capsídeo do Chikungunya

Ao traçar os objetivos deste estudo tomou-se como referência a metodologia original descrita por Khan et al., 2002, adaptada para este estudo, a qual consistiu em desenhar um par de *primers* e um gene sintético de 400pb (*GBlock*® *Gene fragments*) referente à proteína C do CHIKV (acesso AF369024.2). Na sequência de aminoácidos do *Gblock* foi inserido sítios de restrição para as endonucleases *EcoRI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3' respectivamente, o que nos permitiu realizar o processo de clonagem no pET-23a+ com sucesso, pois o produto obtido foi uma sequência otimizada com códons preferenciais para expressão em *E. coli*. Por outro lado, a adição da cauda poli A nas extremidades dos *primers* tornou possível a ação da Taq polymerase a partir da extremidade 3'OH e consequente inserção do DNA da proteína C no vetor de clonagem pGEM-T *Easy*.

Dessa forma, as condições e os ciclos usados nas reações da PCR permitiram à amplificação específica do fragmento de DNA sintético de 400pb, conforme esperado. A Figura 13 mostra o perfil eletroforético do produto da PCR visualizando as bandas equivalentes a 400pb correspondentes ao gene da proteína C, determinado de acordo com o marcador de peso molecular de 100pb.

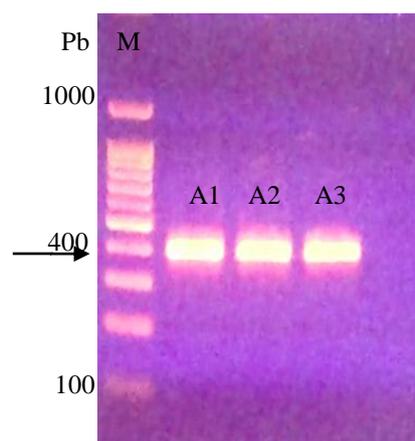


Figura 13. Perfil eletroforético dos produtos da PCR obtidos após amplificação do gene sintético da proteína C do Vírus Chikungunya. A1, A2 e A3= genes. M= marcador de peso molecular 100pb (Promega).

4.2 Clonagem do gene sintético da proteína do capsídeo do Vírus Chikungunya

Após o processo de clonagem e transformação por quimiocompetência na hospedeira *E. coli* com o vetor pGEM-T *Easy* obteve-se clones transformantes que haviam crescido no meio de cultura LB com 100µg/ml de Ampicilina e IPTG e que foram fenotípicas selecionados (Figura 14).

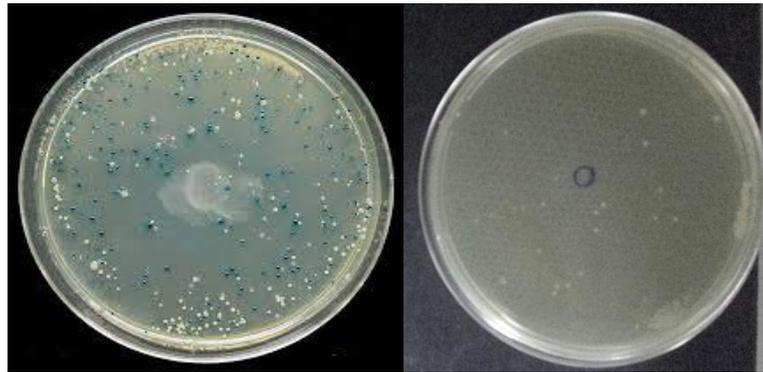


Figura 14. Placas de petri evidenciando as colônias transformadas usando o pGEM- T *Easy*.

A partir do resultado da transformação acima, selecionou-se aleatoriamente 5 clones transformantes para a confirmação da inserção do inserto CHIKV no plasmídeo. Na Figura 15 está o resultado obtido da eletroforese em gel de agarose após extração do DNA plasmidial das colônias, as bandas demonstram a presença de DNA plasmidial e que, portanto, o processo de transformação foi obtido.

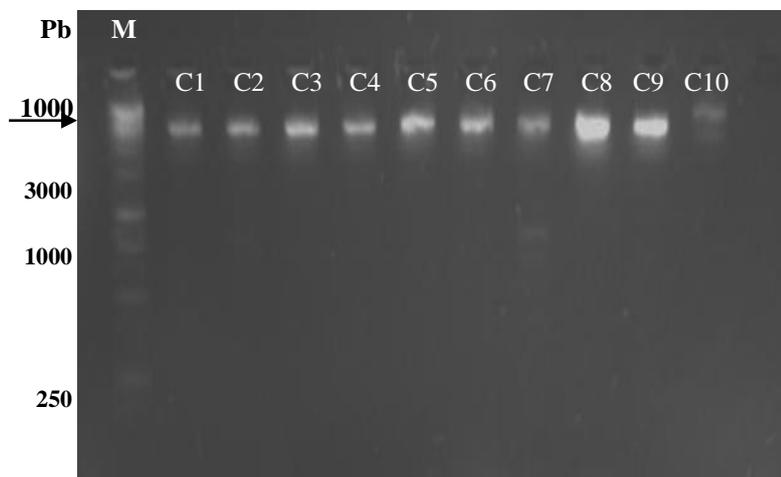


Figura 15. Perfil eletroforético dos produtos da extração plasmidial das colônias transformantes. C1-6= DNA plasmidial das colônias; M= Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega).

4.3 PCR de colônia para o gene sintético da proteína do capsídeo do Chikungunya

Após confirmação do processo de transformação foi necessário confirmar a inserção do inserto do CHIKV no plasmídeo. Para isso foi realizada amplificação por PCR de colônia. Foram selecionadas duas colônias I1 e I2 para amplificação com os *primers* específicos para sequência do inserto sintético da proteína C do CHIKV. Na figura 16 está a visualização do resultado da PCR, sendo observadas as bandas de 400pb das duas colônias (conforme esperado), confirmando assim, o processo de clonagem do gene sintético CHIKV no vetor pGEM-T *Easy*.

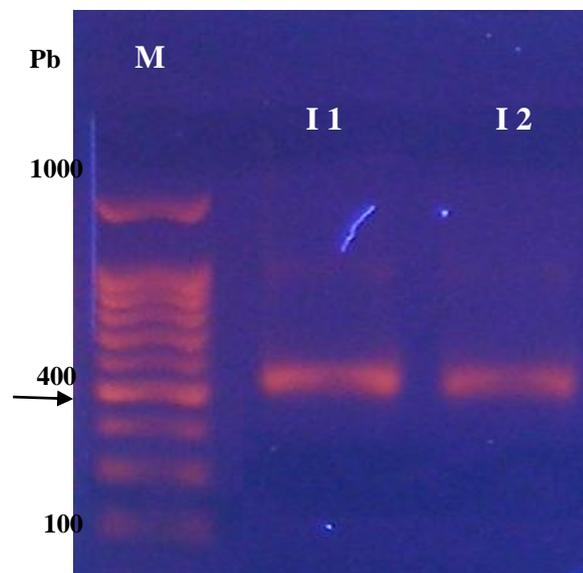


Figura 16. Perfil eletroforético do gene sintético ChikV de 400pb, após clonagem no vetor pGEM-T *Easy*, visualizado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. M=marcador molecular *Ladder* de 100pb; I1 e I2= insertos ChikV amplificados da PCR de colônias.

4.4 Sequenciamento

As análises pós sequenciamento do nucleotídeo de 2 clones bacterianos transformados no vetor pGEM-T *Easy* e produto de PCR, revelou índice de similaridade = 93,8% das sequencias do estudo com sequências depositadas no banco de dados do UniProt, confirmando, portanto, a amplificação e o processo de clonagem genica da proteína C do CHIKV (Figura 17).

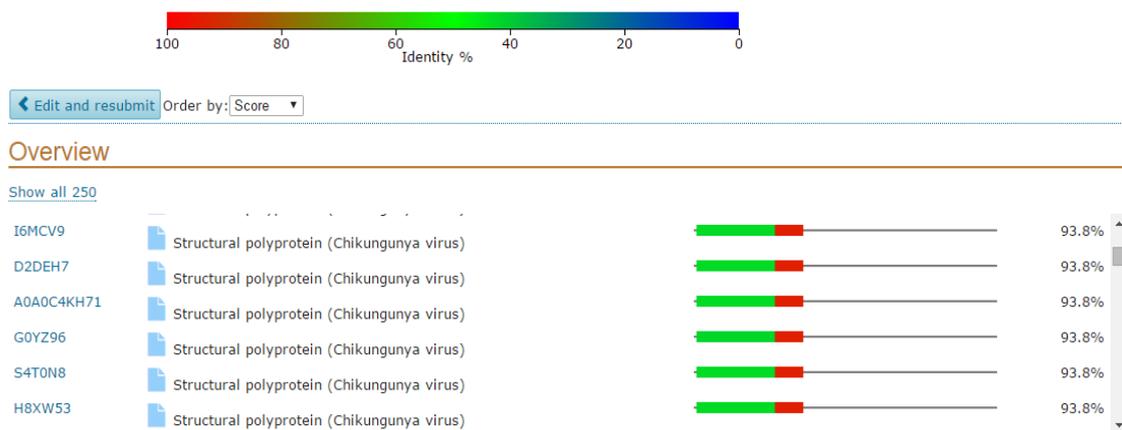


Figura 17. Análise de similaridade entre as sequências nucleotídicas obtidas no estudo e sequências do genoma Chikungunya depositadas no UniProt.

O sequenciamento do inserto e do plasmídeo foi importante, pois além de confirmar o processo de clonagem do *gBlock* no vetor pGEM-T *Easy*, também permitiu confirmar a ligação correta do fragmento da sequência da proteína C ao vetor e desta forma garantir a expressão da proteína C.

4.5 Digestão plasmidial com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *BamHI*

Confirmada a inserção via amplificação por PCR de colônia e sequenciamento, foram selecionados DNAs plasmidiais de 02 clones recombinantes de *E. coli*, para a análise de restrição por digestão com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*. Isso para reforçar a confirmação da presença do inserto do gene sintético da proteína C no vetor pGEM-T *Easy*. A escolha dos clones para extração de material plasmidial baseou-se na visualização de maior intensidade de banda no gel de agarose.

Na Figura 18 podemos visualizar a imagem da eletroforese dos fragmentos digeridos por *EcoRI* e *BamHI*.

A análise por digestão enzimática do inserto nos DNAs extraídos dos clones além de reforçar a confirmação da presença do *gBlock* no vetor de clonagem, ainda é importante na análise dos dados de sequenciamento para que se saiba a orientação em que a sequência é analisada. A partir desses dados confirmatórios seguiu-se então para a construção do vetor de expressão.

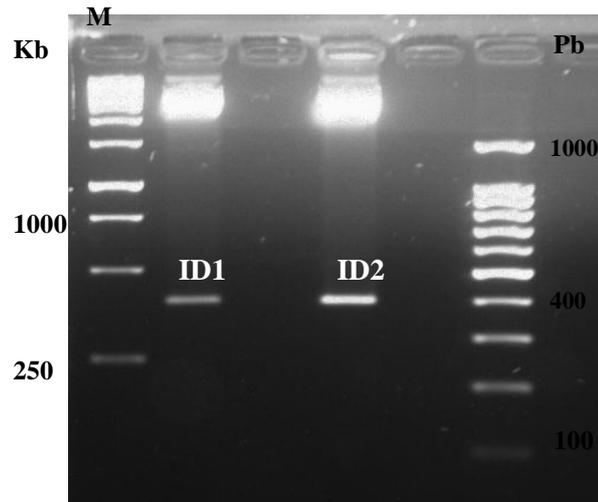


Figura 18. Perfil eletroforético do processo de digestão enzimática com *EcoRI* e *BamHI*, visualizado em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular de 1Kb e 100pb, respectivamente; C1 e C2= plasmídeos; ID1 e ID2= insertos digeridos.

4.6 Construção do vetor de expressão pET-23a+

Para a expressão do CHIKV na bactéria *E. coli* foi utilizado o vetor de expressão pET-23a+ (ver Figura no item 10.10.1). Para montar o vetor de expressão pET-23a+ os DNAs plasmidiais extraídos do pGEM-T *Easy* foram misturados e digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para liberação do fragmento do inserto sintético da proteína C do capsídeo. O vetor pET-23a+ intacto também foi clivado com as mesmas endonucleases afim de se obter extremidades coesivas semelhantes para direcionar a clonagem do inserto neste vetor de expressão.

A clivagem do vetor de clonagem pGEM-T *Easy* liberou um fragmento com peso molecular equivalente a 400pb, o qual era esperado para o gene sintético da proteína C, Figura 18 (ID1 e ID2).

Na Figura 19 é observado o perfil eletroforético resultante da digestão do vetor de expressão pET-23a+ com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*. Na coluna 1 e 2 visualiza-se o vetor linearizado e na coluna 3 o vetor não linearizado, mostrando, portanto, que o vetor está apto a receber o fragmento do gene sintético CHIKV.

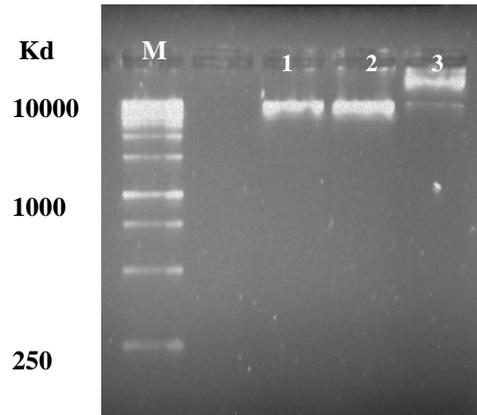


Figura 19. Análises eletroforética mostrando o vetor pET-23a+ linearizado com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1 e 2= pET-23a+ digerido; 3= pET-23a+ não digerido.

Na Figura 20 pode ser visualizado o perfil eletroforético obtido após linearização do vetor pET-23a+ e o fragmento de 400bp liberado do vetor pGEM-T *Easy*, respectivamente, ambos foram purificados do gel de agarose para construção do vetor de expressão.

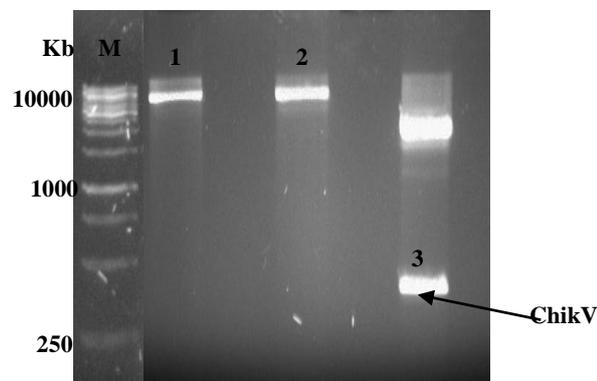


Figura 20. Perfil eletroforético do processo de digestão enzimática visualizado em gel de agarose 0,8%. M= marcador de peso molecular de 1Kb; 1 e 2= pET-23a+ linearizado, 3= inserto CHIKV digerido do pGEM-T *Easy*.

4.7 Identificação do inserto no vetor pET-23a+ por PCR de colônia e confirmação da correta construção por análise de restrição com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*

Após a ligação do inserto no vetor de expressão pET-23a+ por ação da enzima T4 DNA Ligase, células da bactéria de *E. coli* foram transformadas por quimiotransformação e entre os clones transformantes foram selecionados aleatoriamente 09 colônias para análise da inserção do gene sintético da proteína C no novo vetor. Para confirmar quais clones

carregavam o plasmídeo recombinante (pET-23a+ com inserto), foi realizada uma PCR de colônia destes clones utilizando os iniciadores específicos do gene sintético.

Na Figura 21 podemos visualizar o resultado da PCR de colônias com os clones transformantes usados como fonte de DNA. Dos 10 clones selecionados, 08 apresentaram o inserto clonado no vetor de expressão. Pois de acordo com a análise do produto da PCR em gel de agarose frente ao marcador de peso molecular de 100pb obteve-se uma banda correspondente a 400pb, conforme esperada para o gene sintético da proteína C, confirmando assim, a clonagem da proteína C no vetor de expressão pET-23a+.

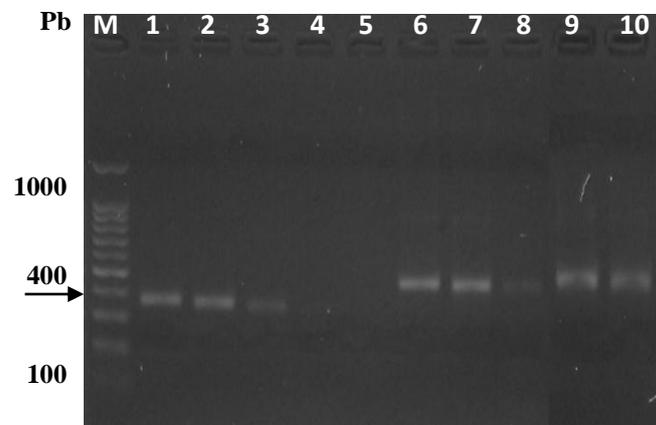


Figura 21. Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do gene sintético da proteína C por PCR de colônia. M= marcador molecular de 100pb, 01 a 10= Clones analisados.

A partir destes resultados, utilizou-se os oitos clones (01, 02, 03, 06, 07, 08, 09, 10) que continham o plasmídeo recombinante para extração do DNA plasmidial.

Para verificar a construção correta do pET-23a+, o DNA plasmidial de 05/8 clones selecionados foram submetidos a dupla digestão com *EcoRI* e *BamHI*. Na Figura 22 encontra-se a foto do gel de agarose onde pode ser observado o resultado da clivagem do pET-23a+ com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. A clivagem liberou o fragmento de 400pb (colunas 01, 03, 05, 07, 09) correspondente ao gene sintético da proteína C, evidenciando, portanto, o sucesso da clonagem.

O plasmídeo recombinante foi introduzido em uma cepa de *E.coli* (BL21 DE3) eletrocompetente. A transformação usando a cepa BL21 permite posteriormente a expressão da proteína recombinante no vetor pET-23a+.

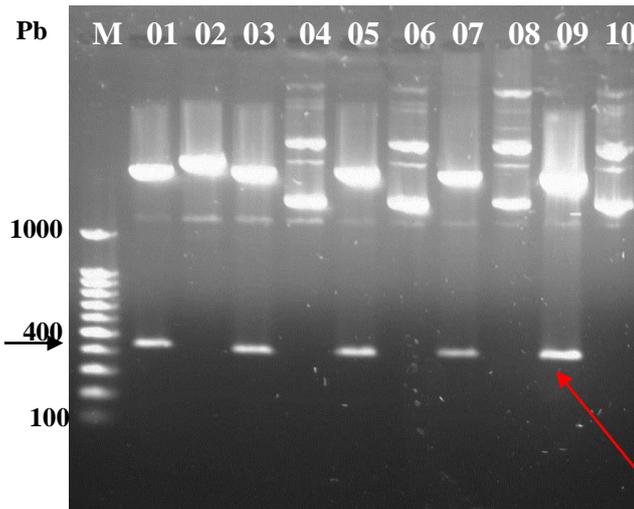


Figura 22. Perfil eletroforético do produto da dupla digestão dos plasmídeos pET-23a+ com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. M= Marcador de peso molecular 100pb; 01, 03, 05, 07, 09 – plasmídeos pET-23a+ duplamente digeridos com *EcoRI* e *BamHI*; 02, 04, 06, 08, 10 – pET-23a+ não digerido. A seta indica o fragmento do DNA sintético.

4.8 Expressão do gene sintético da proteína do capsídeo do vírus Chikungunya na hospedeira *E. coli* BL21 DE3

A produção da proteína recombinante foi realizada inicialmente por indução da expressão sem IPTG a 37°C em fracos sob agitação. Nestas condições não houve produção de proteína recombinante. Porém, utilizando o sistema de expressão da protease no sistema pET (Novagen), adaptado. Isto é, com adição IPTG (1mM) e temperatura de expressão a 25°C por um período de 4 horas obteve-se a expressão da proteína recombinante, confirmada pela análise de solubilidade em SDS-PAGE (Figura 23) e Dot blot (Figura 24).

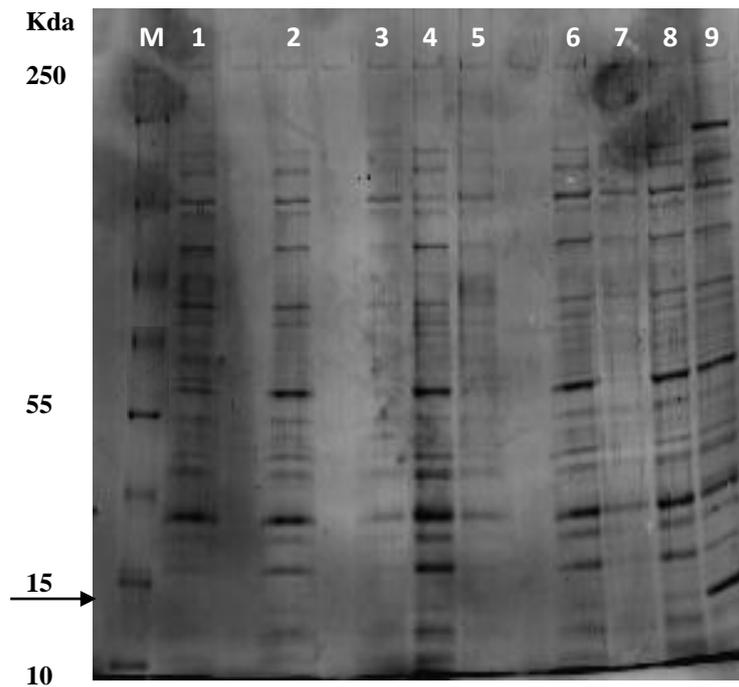


Figura 23. Gel de SDS-PAGE 12%, mostrando a expressão da proteína recombinante a 25°C por 4 horas. M- marcador de peso molecular de 250 Kda, 1- BL21DE3 com IPTG sem vetor de expressão, 2 ao 9 BL21DE3 com vetor de expressão contendo o gene de interesse.

4.9 Análise da expressão da proteína C pela técnica de Dot Blot

Após a indução da expressão proteica, a proteína recombinante CHIKV pôde ser detectada utilizando um anticorpo anti-histidina resultante da técnica de Dot Blot, como visualizado na Figura 24. As marcações na membrana de nitrocelulose são resultantes da reação específica entre CHKV e anticorpo anti-histidina e reveladas a partir dos conjugados imunoenzimáticos constituídos pela peroxidase. Foram visualizadas marcações com intensidades variadas para os clones selecionados indicando níveis diferentes de expressão da proteína de interesse.

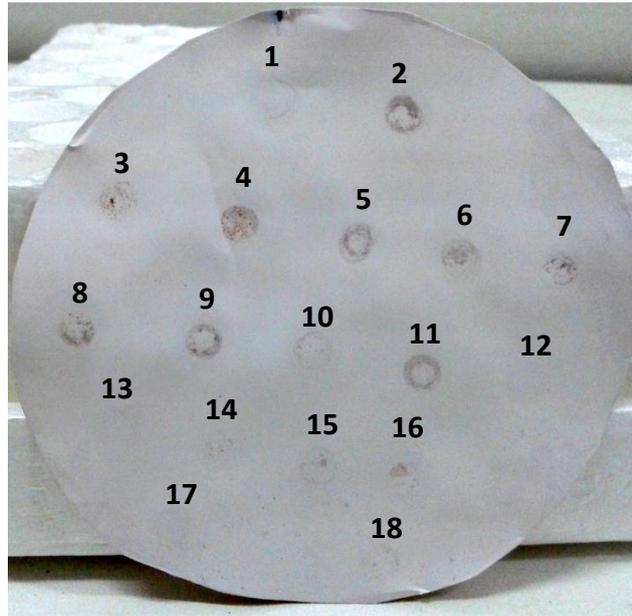


Figura 24. Dot blot de colônias. As amostras 1 e 17, são os controles negativos (BL21DE3); 2 e 18 controles positivos (BL21DE3/tGH-HisTag); de 3 a 16 são células da hospedeira BL21DE3/pET23a+CHIKV.

4.10 Purificação da Proteína do Capsídeo do vírus Chikungunya por coluna de níquel

Na Figura 25 visualiza-se em gel de poliacrilamida a proteína C recombinante purificada pela coluna de níquel, onde a banda corresponde a proteína de 15 KDa aparece, de acordo com o esperado

As frações solúveis das culturas derivadas da lise celular foram submetidas a cromatografia de afinidade por coluna de níquel (com níquel imobilizado), a resina foi lavada com imidazol para contribuir na retirada de possíveis contaminantes que estariam presentes junto a proteína. As frações eluídas durante o processo de purificação cromatográfica foram analisadas por SDS-PAGE, a 12%.

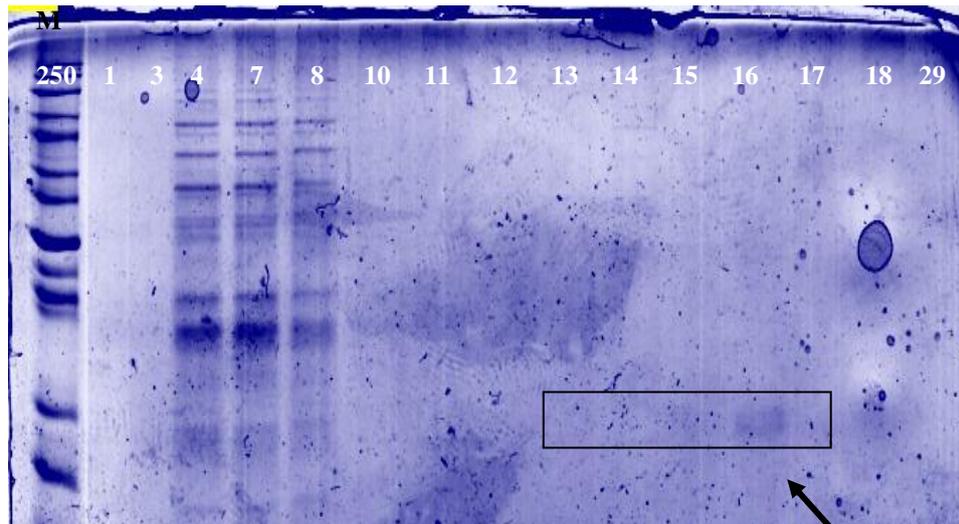


Figura 25. Gel de poliacrilamida 12%, com amostras da proteína purificada. M- Marcador de peso molecular, 1 a 10- solução com tampão de lavagem e água sem proteína, 11 a 18- amostras da proteína recombinante purificada, 19- água.

4.11 Teste imunoenzimático (ELISA) para validar a proteína do capsídeo do Chikungunya como antígeno recombinante

De modo a testar a eficiência da proteína C recombinante produzida na detecção do vírus Chikungunya, foi realizado uma série de ensaios imunoenzimáticos usando amostras de soro de pacientes com diagnóstico confirmado de infecção específica por ChikV, bem como a especificidade para o vírus Mayaro também pertencente ao gênero *Alphavirus*.

Utilizou-se nestes testes as amostras 14, 15, 16 e 17 apresentadas na Figura 25, que são proteínas purificadas e confirmadas por SDS-PAGE. A quantificação das proteínas recombinantes produzida foi realizada pelo método de Bradford. As concentrações obtidas no final do processo para cada fração foram 14= 1,3mg, 15=1,1mg, 16=1,0mg e 17=800mg de proteína.

O método de *Bradford* é simples, preciso e rápido e por isso mais indicado para detecção e quantificação de proteínas solubilizadas em meios sem detergentes. Pois requer poucas etapas de misturas, não necessita de aquecimento e possui uma grande estabilidade colorimétrica. A absorbância pode ser medida em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

As frações da proteína C acima foram diluídas 1:250 em tampão de diluição e usadas no teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM e IgG, em amostras de

soro humano. Três ensaios foram realizados, sendo uma fração IgG usando amostras sororeativas para CHIKV e Citomegalovírus testadas em duplicatas nas diluições de 1:200 e dois para fração IgM, sendo um com amostras sororeativas para CHIKV e vírus Oropouche (Figura 26) e outro com amostras sororeativas para CHIKV e vírus Mayaro (Figura 27). As amostras sororeativas para o vírus Mayaro, Oropouche e Citomegalovírus foram usadas como controles negativos. Nos dois últimos testes as amostras de CHIKV foram testadas em triplicatas e Mayaro e Oropouche em duplicatas, todos na diluição 1:250.

Foram testadas quatro amostras para a fração IgG foram soronegativas (dados não mostrados), para o antígeno recombinante. Posteriormente, verificou-se que as amostras de CHIKV utilizadas foram coletadas na fase aguda da infecção (2-7 dias), as amostras de Citomegalovírus.

No teste para fração IgM foram usadas quatro amostras sororeativas para CHIKV e quatro para Oropouche. De acordo com leitura óptica somente as amostras soropositivas para Chikungunya apresentaram reatividade para o antígeno recombinante.

Após análise do cálculo do Desvio Padrão da placa obteve o seguinte resultado $S=0,141$ e $Cut\ off = 0,424$ a partir desse resultado foram selecionadas duas amostras que apresentaram $Cut\ off \Rightarrow 0,424$ (AM1=0,545, 0,578 e AM2=0,838) para os ensaios posteriores (Figura 27).

	Resultado da Placa IgM											
	14	14	14	14	15	15	15	15	C-14	C-14	C-15	C-15
A	0.244	0.226	0.245	0.101	0.171	0.209	0.210	0.104	0.249	0.233	0.260	0.260
B	0.333	0.322	0.237	0.134	0.210	0.255	0.253	0.143	0.267	0.249	0.301	0.408
C	0.288	0.230	0.251	0.147	0.175	0.231	0.193	0.142	0.219	0.134	0.322	0.147
D	0.070	0.068	0.068	0.068	0.075	0.094	0.072	0.073	0.070	0.066	0.074	0.075
E	0.099	0.093	0.087	0.121	0.110	0.114	0.114	0.075	0.113	0.095	0.122	0.100
F	0.319	0.271	0.328	0.143	0.236	0.223	0.273	0.175	0.208	0.111	0.083	0.114
G	0.229	0.285	0.578	0.252	0.251	0.284	0.274	0.181	0.369	0.299	0.244	0.307
H	0.217	0.232	0.545	0.142	0.277	0.838	0.243	0.133	0.288	0.254	0.295	0.252
	16	16	16	16	17	17	17	17	C-16	C-16	C-17	C-17

Figura 27. Esquema da placa de ELISA com 96 poços. As linhas A, B e C, contem as triplicatas das amostras soropositivas para Chikungunya e Oropouche, sensibilizadas com as frações 14 e 15 dos antígenos recombinantes. Nas linhas D e E, são poços contendo os antígenos sem amostras virais. Nas linhas F, G e H os poços contem as triplicatas das amostras soropositivas para Chikungunya e Oropouche, sensibilizadas com as frações 16 e 17, dos antígenos recombinantes.

No teste usando a fração IgM para amostras de CHIKV e Mayaro (diluição 1:100) lavado 3 vezes, confirmou a reatividade do CHIKV.

Porém, o antígeno recombinante reagiu também com anticorpos do vírus Mayaro (Figura 29). De acordo com o *Desvio Padrão*= 0,2443 e o *Cut off* = 2,831, os resultados para Mayaro estão muito elevados para serem usados como parâmetro de comparação para as amostras de CHIKV, o processo de diluição 1:100 pode ter interferido para estes valores.

Resultado da Placa IgM								
	14	14	15	15	C-14	C-14	C-15	C-15
A	1.121	0.561	1.055	0.518	2.641	2.570	2.702	2.711
B	1.080	0.588	1.078	0.551	2.570	2.507	2.538	2.567
C	0.987	0.497	0.778	0.403	0.085	0.095	0.092	0.093
D	0.075	0.087	0.087	0.083	0.078	0.096	0.095	0.082
E	0.095	0.117	0.107	0.102	0.114	0.095	0.101	0.092
F	1.079	0.538	0.860	0.417	0.082	0.074	0.077	0.083
G	0.877	0.521	0.957	0.428	2.540	2.572	2.534	2.399
H	0.952	0.611	0.945	0.445	2.660	2.676	2.648	2.556
	16	16	17	17	C-16	C-16	C-17	C-17

Figura 29. Placa de ELISA com 96 poços. As linhas A, B e C, contem as triplicatas das amostras soropositivas para CHIK, A e B contem duplicatas para Mayaro, sensibilizadas com as frações 14 e 15 dos antígenos recombinantes. Nas linhas D e E, são poços contendo os antígenos sem amostras virais. Nas linhas F, G e H os poços contem as triplicatas das amostras soropositivas para CHIK, G e H contem duplicatas das amostras soropositivas para Mayaro, sensibilizadas com as frações 16 e 17, dos antígenos recombinantes.

5. Discussão

O vírus Chikungunya tem sido arrolado como responsável por grandes surtos em áreas onde o vírus está circulando. Como os que ocorreram na África, Ásia, Europa e ilhas do oceano Índico e Pacífico (WEAVER et al., 2015).

No Brasil, desde 2010, quando surgiu o primeiro caso importado de CHIKV na cidade de São Paulo, este se espalhou por várias regiões do país, inclusive região norte. Nesta região, devido principalmente as condições climáticas, como abundância de chuvas, alta umidade e temperatura favorecem a densidade dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, principais vetores do vírus Chikungunya.

Assim, desde 2014 quando foi registrado o primeiro caso importado de Chikungunya no Amazonas que o número de casos só tende aumentar. Sendo que naquele mesmo ano foi notificado mais 31 casos suspeitos com 9 confirmações. Todos importados de países como Haiti, Guiana Inglesa, Venezuela, Colômbia e Suriname.

De acordo com o boletim epidemiológico da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) do Amazonas, em julho de 2015 foram registrados os primeiros casos autóctones de Chikungunya na Capital do Estado, porém, no decorrer do ano, foram notificados mais 165 casos, 12 desses confirmados. O número de casos autóctones subiu para 05.

No presente ano até o mês de fevereiro já são 94 casos registrados sob investigação no Sistema de Informação/SINAN.NET (FVS, 2016).

A partir desses dados agravados pela epidemia do vírus Zika no país, o governo do Estado do Amazonas publicou o Decreto nº 36.520, de 03 de dezembro de 2015 que declara “Situação de Emergência no Estado, em virtude da probabilidade do desenvolvimento de situação epidêmica determinadas pelos vírus da Dengue, Chikungunya e Zika”.

É importante salientar que em relação ao diagnóstico laboratorial da febre chikungunya, até então, o único laboratório de referência do MS era do Instituto Evandro Chagas. Neste sentido, com o intuito de contribuir para acessibilidade ao diagnóstico sorológico do vírus Chikungunya na região, o presente trabalho teve como objetivo central a expressão de uma proteína sintética do capsídeo C do vírus Chikungunya em *E. coli* para produção de antígeno recombinante e validação como imunodiagnóstico.

Deste modo, para a produção do antígeno recombinante utilizou-se a estratégia de desenhar um gene sintético referente à proteína do capsídeo C do vírus Chikungunya, bem como primers para amplificar essa sequência de forma específica. Esse gene sintético é denominado comercialmente de gBlock (*gBlocks Gene Fragments*) que são fragmentos

dupla fita de DNA quimicamente sintetizados. Essa metodologia é usada nos mais variados tipos de experimento e aplicações, incluindo a produção de antígenos para imunodiagnóstico. Uma das grandes vantagens desse método é que não precisamos ter amostras biológicas para realizar a pesquisa, além disso, são relativamente simples de serem sintetizados e os custos são consideravelmente menores em relação aos procedimentos para produção de uma proteína inteira, geralmente os peptídeos sintéticos apresentam maior especificidade no imunoensaio quando comparados aos antígenos biológicos e o risco de contaminação dos profissionais durante a manipulação do gene sintético não existe. Deste modo, a produção desses peptídeos fornece ferramentas confiáveis, reprodutíveis e econômicas na obtenção de antígenos para imunoenaios (FARIA & ANDRADE, 2012). No presente trabalho esses fatores foram essenciais para a escolha da metodologia, principalmente no início do processo devido à necessidade de amostras biológicas para os procedimentos de produção do antígeno. Todos esses fatores contribuíram para justificar o uso do gene sintético, principalmente por não usar soro humano positivo para o vírus Chikungunya como matéria prima para isolar o ácido nucleico viral, isto é, material biológico altamente infeccioso para os profissionais.

Conforme mostrado em nossos resultados, a primeira tentativa de clonar o gene sintético de 800 pb diretamente no sistema pGEM-T *Easy* não foi bem sucedida. A partir do resultado obtido, fez se algumas modificações na metodologia a fim de permitir o sucesso do estudo usando a mesma sequência de *gBlock*. Dentre essas, reduzir o tamanho do *amplicon* da proteína sintética de 800 para 400pb. Desenhou se então um par de *primer* com adição da cauda poli A nas extremidades dos mesmos. Essa estratégia permitiria a ação da enzima Taq DNA polymerase a partir da extremidade 3'OH e consequente amplificação do fragmento de 400pb do gene sintético. Outra estratégia importante foi respeitar a inserção do sítio de restrição para as endonucleases *EcoRI* e *BamHI* nas extremidades 5' e 3' da sequência de aminoácidos do *gBlock* original. Obtendo assim, uma sequência otimizada com *códons* preferenciais para expressão em *E.coli*. Esse novo sistema permitiu realizar com sucesso o processo de clonagem e subclonagem nos vetores pGEM-T *Easy* e pET-23a+, respectivamente.

Após amplificação do *gBlock* e clonagem, para dar continuidade ao estudo, usamos diferentes ferramentas para confirmar se o processo de clonagem do gene sintético tinha sido realizado. Essas metodologias foram PCR usando os *primers* específicos para amplificação do

gene sintético, digestão com endonucleases *EcoRI* e *BamHI*, cujos sítios estavam presentes na sequência e por último o sequenciamento nucleotídico tanto do vetor quanto do inserto. Os resultados obtidos de todos esses procedimentos confirmaram a presença do gene sintético no vetor. Salientando que o sequenciamento além de confirmar a presença do gene sintético no vetor pGEM-T *Easy* também revelou alto índice (>93%) de similaridade das sequências do estudo com sequências do vírus Chikungunya depositadas no banco de dados do UniProt.

Conforme descrito na metodologia, subitem 3.11, no processo subclonagem usou-se o vetor de expressão pET-23a+, um plasmídeo muito utilizado na expressão heteróloga de proteínas. Dentre as principais características deste vetor ressalta-se, os múltiplos sítios de clonagem que podem ser clivados por diferentes enzimas de restrição e um gene que confere resistência a Ampicilina, usado como marcador de seleção das colônias transformadas. Outra característica deste vetor é que permite produção de proteínas fusionadas com uma região de poli-histidina (*His-tag*) que possibilita a purificação da proteína pelo processo de cromatografia de afinidade (FILHO, 2010). No presente estudo essas características foram importantes para seleção deste vetor, pois obteve-se a digestão do mesmo e liberação do fragmento de 400 pb, conforme esperado e a cauda *His-tag* contribuiu para o processo de purificação da proteína C recombinante pela Cromatografia de afinidade.

A proteína C do CHIKV é uma nucleoproteína com 264 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 30 kDa (KHAN et al., 2002). Considerando estas características, na tentativa de produzir e purificar a proteína de 400 pb com massa molecular de 15 kDa na forma solúvel, optamos pelo sistema de expressão utilizando a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, uma célula procariota que permite expressão de proteínas heterólogas e a técnica de SDS-PAGE para visualização dos resultados. O gel de SDS-PAGE possibilita uma melhor visualização de proteínas expressas com até 30 kDa (SCHÄGGER & JAGOW, 1987). De acordo com os resultados obtidos (Figura 25) a técnica se mostra eficiente para visualização da proteína.

A expressão da proteína do capsídeo foi detectada também pela técnica de Dot blot, que utilizou anticorpo específico para detectar a presença da cauda de histidina His-Tag C-terminal. O Dot blot foi realizado com o intuito de verificar se a proteína foi realmente expressa na forma solúvel ou como corpos de inclusão, que são proteínas inativas. A escolha deste teste é que o mesmo dispensa o uso de equipamentos sofisticados para visualização dos resultados. No presente estudo o teste mostrou-se eficaz, pois pode-se confirmar a presença da proteína C nas colônias impregnadas na membrana de nitrocelulose pela presença ou ausência de cor nas mesmas. Esse processo ocorre pela reação do anticorpo específico para cauda de

histidina His-tag C-terminal com a proteína C (His).

Para purificar e isolar a proteína C recombinante o processo utilizado foi o sistema de expressão de proteínas por afinidade com a cauda de Histidina em coluna de níquel, sem adição de proteases. De acordo com a literatura a cauda de Histidina em suas extremidades N-terminal e C-terminal facilita o processo de purificação de proteínas de interesse, pois determinados resíduos de aminoácidos interagem com íons metálicos imobilizados em suportes sólidos (PORATH, 1992; IWASHITA, 2012). Os resultados obtidos usando essa metodologia mostraram que as frações da proteína do capsídeo do Chikungunya obtida foram purificadas ficando livre dos resíduos de outras proteínas insolúveis, o que poderia interferir na produção do antígeno recombinante.

Em relação à febre chikungunya o diagnóstico pode ser dado por diversos métodos laboratoriais tais como sorologia, reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) tradicional e PCR em tempo real, isolamento viral e teste rápido. Conforme mencionado anteriormente, até 2015, no Brasil, todas essas técnicas estavam disponíveis no Instituto Evandro Chagas, único laboratório de referência da rede pública, do Ministério da Saúde. Atualmente, considerando o cenário epidemiológico causado pelo Zika vírus, o Governo Federal por meio da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2016, autorizou a importação de um Kit de diagnóstico sorológico para Zika, Dengue e Chikungunya (ANVISA, 2016) e ampliou para mais 7 Lacens (três na região Sudeste, dois na região Nordeste, um na região Sul e outro na DF) estão sendo capacitados para realizar o exame para Chikungunya. Na região norte, o laboratório de referência continua sendo o Instituto Evandro Chagas, no Pará, que em média, demora dois meses para emitir um laudo (ANVISA, 2016).

Em relação aos métodos sorológicos, se mostram como ferramentas poderosas para o auxílio no diagnóstico de doenças e na pesquisa. Podendo ser usado tanto na rotina de diagnóstico laboratorial, como em estudos soropidemiológicos, pois possibilitam trabalhar com um grande número de amostras ao mesmo tempo. Outros parâmetros favoráveis são não necessitar de laboratórios com infraestrutura sofisticada o que implica na redução de custos, facilidade de processamento, rapidez, simplicidade, possibilidade de automação, disponibilidade de reagentes no mercado e aceitação (URDEA et al., 2006; GOH et al., 2015). Uma das grandes limitações do imunodiagnóstico é que podem apresentar reações cruzadas. Isto é, podem estar positivos para mais de um tipo de doença, apesar de na grande maioria dos casos somente uma estar acontecendo. Uma reação cruzada é resultado da similaridade tridimensional entre duas moléculas de antígenos diferentes. Um anticorpo

gerado contra uma das moléculas pode reagir com a outra, ainda que sua afinidade seja mais baixa (URDEA et al.,2006).

No presente estudo o antígeno recombinante foi testado para detectar anticorpos IgG e IgM. No primeiro ensaio usamos quatro amostras de soros com diagnóstico confirmado de infecção por Chikungunya e amostras positivas para Citomegalovírus (controle negativo). O resultado deste teste mostrou que não houve reatividade ou foi muito baixa entre o antígeno recombinante e anticorpo anti-CHIKV nos poços contendo os controles negativos também não houve evidencia de reação enzimática.

Analisando posteriormente as condições de coleta das amostras, verificou-se que tinham sido coletadas durante a fase aguda, isto é, nos primeiros 8 dias após início dos sintomas. Infelizmente por não dispor de amostras coletadas na fase de convalescência não foi possível repetir este ensaio.

Ao testar o antígeno recombinante contra a fração IgM usando as mesmas amostras de soro positivas para CHIKV e Citomegalovírus acima. Verificou-se uma rápida reação enzimática na placa, demonstrando que os antígenos recombinantes estavam reagindo com anticorpos anti-CHIKV presentes na amostra. Salientando que nos poços contendo amostras de Citomegalovírus não foi observado reação enzimática, conforme pode ser observado na Figura 26. Diante dos resultados obtidos nos dois ensaios (IgG e IgM) não podemos dizer que a captura de anticorpos da classe IgG foi ineficiente, visto que o antígeno não foi confrontado com amostras da fase de convalescência, isto é, preferencialmente coletadas de 15 a 45 dias após o início dos sintomas, ou 10-14 dias após a coleta da amostra na fase aguda. Portanto, é necessário continuar realizando esses testes incluindo amostras de soro da fase de convalescência.

Diante das dificuldades acima mencionadas, deu-se continuidade ao estudo pesquisando somente a fração IgM de anticorpos.

Sabe-se que um dos maiores desafios dos testes imunoenzimáticos é o problema de análise com reações cruzadas. Situação muito comum em testes com amostra para Chikungunya, documentada inclusive pelo instituto Evandro Chagas, conforme debatido no Seminário *Vigilância em Saúde das Doenças Virais Chikungunya, Zika e Dengue: desafios para o controle e a atenção à saúde* em 2015. Diante dessa possibilidade acrescentamos nos ensaios soros positivos para os vírus Oropouche (Bunyaviridae), Mayaro (Togaviridae-*Alphavirus*) e Citomegalovírus (*Herpesvirus*). De acordo com os resultados obtidos, no ensaio contendo amostras positivas de CHIKV e Oropouche, o antígeno recombinante reagiu somente com amostras de CHIKV, confirmando a presença de anticorpos Anti-CHIKV nas

mesmas e ausência de Oropouche e Citomegalovírus, excluindo assim, a possibilidade de reação cruzada com anticorpos dos outros dois vírus.

Porém, quando incluímos amostras de soros positivas para o vírus Mayaro, evidenciou-se a presença de reação cruzada entre eles, conforme pode ser visualizado na Figura 28.

Os vírus Chikungunya e Mayaro são *Alphavirus* que apresentam um elevado nível de homologia em suas estruturas proteicas (FIGUEIREDO, 2014) o que dificulta a especificidade dos testes imoenzimáticos.

É importante ressaltar que assim como este ensaio, existem técnicas laboratoriais que são pouco sensíveis ou não são específicos para uso em diagnóstico, entretanto, podem ser utilizadas no caso de falta ou da dificuldade de realização de testes mais sensíveis embora não possam ser conclusivos no diagnóstico. Ressalta-se também que as metodologias indiretas podem apresentar resultados falso-positivos devido às denominadas reações cruzadas com outros vírus da mesma família, em particular os Flavivírus, como é o caso do vírus da Dengue e da Febre Amarela. O kit sorológico liberado pela ANVISA, por exemplo, apresenta sensibilidade e especificidade em torno de 96,8% - 100% e 96,6% - 100%, respectivamente. O que levou o Ministério da Saúde a estabelecer o algoritmo de testes para detecção de arbovírus, que em casos de suspeita de Zika, Chikungunya ou Dengue, devem ser confirmados por teste molecular (PCR em Tempo Real- qPCR) (ANVISA, 2016).

Assim, apesar deste teste somente auxiliar no diagnóstico do grupo *Alphavirus*, é outra ferramenta que pode ser usado para diferenciar os *Alphavirus* de outros arbovírus. Além disso, os testes moleculares que detectam a presença do vírus no sangue ou na urina do paciente por meio de amplificação do seu material genético, o RNA podem ser utilizados para confirmar o diagnóstico de infecção por Chikungunya triado pelo teste em questão, diminuindo consideravelmente a quantidade de amostras e conseqüentemente os custos dos testes moleculares.

Diante do exposto concluímos que a expressão da proteína C recombinante do vírus Chikungunya mostrou-se promissora, como pode ser evidenciado pelos resultados obtidos referentes à ligação do gene sintético da proteína C no vetor de expressão pET-23a+ e transformação em bactérias modificadas *E. coli* cepas BL21(DE3). Pois a quantidade de proteína produzida foi satisfatória, conforme marcação obtida no teste de Dot Blot, gel de SDS-PAGE e Cromatografia de Afinidade. Entretanto, nos testes imoenzimáticos, observou-se efeito de reação cruzada com anticorpos do vírus Mayaro. Abrindo possibilidades para testes com diferentes condições de indução da proteína C recombinante

completa, visando aumentar a especificidade e sua utilização em ensaios de diagnóstico imunoenzimáticos do vírus Chikungunya.

Em suma, acreditamos que a proposta de clonagem e expressão da proteína C do vírus Chikungunya a partir de um gene sintético para uso no diagnóstico imunoenzimático cumpriu seu propósito.

6. Conclusões

Mediante os objetivos propostos e resultados obtidos neste estudo concluímos que:

1. O fragmento de DNA sintético (*gBlock*) de 400pb que codifica a proteína do capsídeo C do vírus Chikungunya, desenhado para o estudo, foi ideal para o processo de amplificação, clonagem e subclonagem nos vetores pGEM-T *Easy* e pET-23a+- *Escherichia coli*;
2. A proteína C recombinante expressa em cultura de célula de *E. coli* BL21 (DE3) apresentou quantidade satisfatória do antígeno recombinante para os testes imunoenzimáticos;
3. O ensaio de purificação da proteína recombinante por Cromatografia de Afinidade possibilitou obter proteínas livre de impurezas ideais para os testes imunoenzimático;
4. Nos ensaios imunoenzimáticos com o antígeno recombinante contra a fração IgG de amostras positivas para Chikungunya, Citomegalovírus e Oropouche, não houve reatividade para nenhuma das amostras testadas;
5. Nos ensaios contra a fração IgM com as mesmas amostras acima, houve reatividade somente para Chikungunya;
6. No teste usando amostras de soro positivas para Chikungunya, Mayaro, Oropouche e Citomegalovírus observou-se reação cruzada entre as amostras de Chikungunya e Mayaro;
7. A proteína C recombinante obtida poderá ser utilizada na construção de um painel sorológico para validação do imunodiagnóstico da Febre Chikungunya.
8. A baixa especificidade observada sugere a utilização de uma combinação de técnicas moleculares para confirmação do Chikungunya em soro de pacientes.
9. O antígeno utilizado neste trabalho é a primeira proteína recombinante produzida de forma sintética no Amazonas. E apresentou um grande potencial para aplicação no diagnóstico da Chikungunya.

7. Perspectivas e recomendações:

Os testes imunoenzimáticos realizados com proteínas recombinantes, particularmente genes sintéticos (*gBlock*), ainda são razoavelmente recentes. Existem basicamente duas grandes vantagens de se trabalhar com essa metodologia, a primeira é que não necessita de amostras biológicas para se obter o DNA molde, o que anula o risco de infecção dos profissionais durante os experimentos; a segunda é a rapidez (4 a 7 dias) para se obter o produto de clonagem. Porém, na construção de *gBlock* é necessário lançar mão de algumas estratégias para facilitar a clonagem e expressão em células hospedeiras.

Os resultados dos ensaios imunoenzimático mostrou que o antígeno recombinante produzido é capaz de detectar anticorpos CHIKV, mas apresenta reação cruzada com outros vírus do gênero *Alphavirus* também.

Portanto, como perspectivas, pretende-se dar continuidades ao trabalho aperfeiçoando as metodologias de amplificação, clonagem, expressão e purificação da proteína do capsídeo inteira. Neste momento, novos *primers* já foram adquiridos e a amplificação já foi realizada. Pois conforme observamos no presente trabalho e na literatura existe a dificuldade em se obter antígenos que não reaja com outros vírus do mesmo gênero principalmente quando se trata de proteínas pequenas. A partir disso, pretendemos dedicar maior esforço para se obter uma proteína que funcione como antígeno específico na detecção do Chikungunya em soro humano.

8. Referencias Bibliograficas

1. S, C, Ujvari. Pandemias - A humanidade em risco. **Editora Contexto; P53-69, 2011.**
2. A, Mohan; D, H, N, Kiran; I, C, Manohar; D, P, Kumar. Epidemiology, Clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian J. Dermatol. 55 (1): 54-63. 2010.**
3. E, Oliveira. Caracterização da resposta imune citocínica na infecção humana pelo Vírus Oropouche e sua relação com o padrão de soroconversão e a presença de sintomas. **Tese. Univ. Fed. Pará. 2015.**
4. B, S, Hollidge; F, González-Scarano; S, S, Soldan. Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergenci and Pathogenesis. **Journal Neuroimmune Phamacology. v. 5, No. 3, p. 428-442, 2010.**
5. A, R, Casseb; et al. Abovírus: Importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Vet. e Zootec. set. 20(3). 2013.**
6. G, H, N, Grimmer Davis. Estudos epidemiológicos sobre Arbovírus em populações rurais e urbanas do Estado do Amazonas. **Dissertação. Univ. Fed. Am. 2009.**
7. M, M, Gibrail, Detecção de anticorpos para Arbovírus em primatas não humanos no município de Goiânia. **Dissertação. Univ. Fed. Goiás. 2015.**
8. ICTV - International Committee On Taxonomy Of Viruses. Virology division – IUMS. Virus taxonomy. Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. **Acessado em: 12/01/2016.**
9. A, P, A, Travassos Da Rosa; J, F, S, Travassos Da Rosa; F, P, Pinheiro; P, F, C, Vasconcelos. Arboviroses. In: Leão RNQ. Doenças infecciosas e parasitárias – enfoque amazônico. **Belém: CEJUP; UEPA; Instituto Evandro Chagas; p.207-25. 1997.**
10. E, J, I, Kucharz. Cebula-Byrska. Chikungunya fever European. **Journal of Internal Medicine 23: 325–329. 2012.**
11. M, R, Donalisio; A, R, R, Freitas. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Rev Bras Epidemiol Jan-Mar; 18(1): 283-5, 2015.**
12. N, A, Honório; D, C, P, Câmara; G, A, Calvet. BRASIL P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 31(5):906-908, mai, 2015.**
13. A, H, Nildimar; C, P, C, Daniel; A, C, Guilherme; B, Patrícia. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 31(5):906-908, mai, 2015.**

14. D, Maria Rita; R, R, F, André. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Ver. Bras. Epidemiol. Vol. 18(1): 283-5. Jan-Mar 2015.**
15. G, C, Roberta. Risco de introdução da transmissão do vírus Chikungunya no Brasil. **Diss. Mod. Epid.Saúde Pública. Ed. 16. Brasília, Dezembro de 2012.**
16. C, Weber; S, M, Büchner; B, S, Schnierle. A Small Antigenic Determinant of the Chikungunya Virus E2 Protein is Sufficient to Induce Neutralizing Antibodies which are Partially **Protective in Mice. PLOS Neglected Tropical Diseases DOI:10.1371/journal.pntd.0003684. April 23, 2015.**
17. D, Fischer; S, M, Thomas; J, E, Suk; B, Sudre; A, Hess; ET AL. Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. **Int. J. Health Geogr. 12: 51. DOI: 10.1186/1476-072X-12-51 PMID: 24219507. 2013.**
18. T, P, C, Pinto. Expressão e purificação da proteína E3 do vírus chikungunya (CHIKV) **Diss. Mestrado. Univ. Nova Lisboa. Julho de 2013.**
19. J, R, Powell; W, J, Tabachnick. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - **A Review Mem Inst Oswaldo Cruz. Dec; 108(Suppl 1): 11–17.doi:10.1590/0074-0276130395 PMCID: PMC4109175. 2013.**
20. V, A, Arankalle; S, Shrivastava; S, Cherian; R, S, Gunjekar; A, M, Walimbe; S, M, Jadhav; et al. Genetic divergence of chikungunya viruses in India (1963–2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. **J Gen Virol.;88:1967–76. 2007.**
21. I, Schuffenecker; I, Iteman A, Michault; S, Murri; L, Frangeul; M, C, Vaney; R, Lavenir; N, Pardigon; J, M, Reynes; F, Pettinelli; et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med. 2006.**
22. K, A, Tsetsarkin; R, Chen; M, B, Sherman; S, C, Weaver. Chikungunya vírus: Evolução e determinantes genéticos de emergência. **Curr. Opin. Virol. 1: 310-317. doi: 10.1016. 2011.**
23. K, A, Tsetsarkin; D, L, Vanlandingham; C, E, Mcgee; S, Higgs. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog. 2007.**
24. S, Wangchuk; P, Chinnawirotpisan; T, Dorji; T, Tobgay; T, Dorji; I, K, Yoon; S, Fernandez. Chikungunya fever outbreak, Bhutan, 2012. **Emerg. Infect. Dis., vol. 19, 1681–1684. 2013.**

25. R, S, S, Azevedo; C, S, Oliveira; P, F, C, Vasconcelos. Risco do chikungunya para o Brasil. **Rev Saúde Pública** 2015;49:58.
26. I, Leparc-gffart; A, Nougairède; S, Cassadou; C, Part; X, Lamballerie. Chikungunya in the Americas. **Lancet**. Pg. 383-514. 2014.
27. R, S, Lanciotti; A, M, Valadere. Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus. **Emerg. Infect. Dis.** 20. pg. 1400-1402. 2014.
28. Organización Panamericana De La Salud (OPS). Centers For Disease Control And Prevention. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. **Washington, 2011.**
29. S, B, Halstead. Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 21, No. 4, April, 2015.
30. WHO – world health organization. <http://www.who.int/csr/don/23-fever-2016-chikungunya/en>. 2016.
31. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas/FVS-AM. <http://www.fvs.am.gov.br>. 2016. 37. Secretaria estadual de saúde. <http://noticias.r7.com/rio-de-janeiro/rj-tem-surto-de-febre-chikungunya-capital-tem-52-casos-confirmados-2403>. 2016
32. Boletim de vigilância em saúde. <http://www.fvs.am.gov.br/images/pdf/2016/dve-boletim-de-vigilancia-em-saude-01-ano-05-edicao-marco>. 2016.
33. S, Thomas; J, Rai; L, John; S, Schaefer; B, M, Pützer; O, Herchenröder. Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. **Virology Journal**. Vol. 10:269. DOI: 10.1186/1743-422X-10-269, 2013.
34. C, Scott; M, D, Marc Lecuit. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **N Engl J Med** 2015; 372:1231-1239. DOI: 10.1056/NEJMra1406035. March 26, 2015.
35. J, E, Voss; M, Vaney; S, Duquerroy ; C, Vonrhein; C, Girard-Blanc; C, Elodie; T, Andrew; B, Gérard; A, R, Félix . From Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. doi: 10.1038 / nature09555. **Natureza** 468, pg. 709-712. 02 Dezembro 2010.
36. A, J, Snyder; S, Mukhopadhyay. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **J. of Virol.** p. 13609 –13620. Volume 86; Number 24. December 2012.
37. S, Maxime; G, Bernard; H, Stephen; B, Laurence; D, Christian. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. doi:10.1016. **J.Virol.** 2009.

38. A, F, Antoine; C, Montpellier; K, Cailliau; E, B, Poly; J, P, Vilain; J, Dubuisson. The Alphavirus 6K Protein Activates Endogenous Ionic Conductances when Expressed in *Xenopus* Oocytes. **Journal of Membrane Biology**. Volume 215, Issue 1, pp 37-48. 05 May 2007.
39. A, H, Khan; K, Morita; Parquet Md Mdel, C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. and Igarashi, A. Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J. Gen. Virol.** 83 (Pt 12), 3075-3084. 2002.
40. L, Y, H, Goh; J, Hobson-Peters; N, A, Prow; K, Baker; T, B, H, Piyasena; C, T, Taylor; A, Rana; M, L, Hastie; J, J, Gorman; A, Hall. The Chikungunya Virus Capsid Protein Contains Linear B Cell Epitopes in the N- and C-Terminal Regions that are Dependent on an Intact C-Terminus for Antibody Recognition. **Viruses**. Vol. 7(6), 2943-2964; doi: 10.3390/v7062754. 2015.
41. L, L, Coffey; A, Failloux; S, C, Weaver. Chikungunya Virus–Vector Interactions. **Rev. Viruses**. 6, 4628-4663; DOI:10.3390/v6114628. 2014.
42. B, Cho; J, Kim; B, Jeon; J, Noh; J, Kim; M, Park; S, Park. Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection. **Journal of virologist**. Vol. 154, Ed. 1-2. pg. 154-159. 2008.
43. M, Solignat; G, Bernard; H, Stephen; B, Laurence; D, Christian. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Rev. Virology**. Vol. 393. 183–197. 2009.
44. C, Petitdemange; N, Wauquier; V, Vieillard. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Volume 135, Issue 4, Pages 846–855. April 2015.
45. I., Akhrymuk; S, V, Kulemzin & E, I, Frolova. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. **J Virol** 86, 7180–7191. 2012.
46. N, Wauquier; P, Becquart; D, Nkoghe; C, Padilha; A, Ndjoyi-Mbiguino; E, M, Leroy. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with Strong innate immunity and TCB8 cell activation. **J. Infect. Dis.** 204, 115-123. 2011.
47. T, Couderc; M, Lecuit. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antiviral Research** 121. 120–131. 2015.
48. K, L, Mccance; S, E, HUETHER. Pathophysiology: The biological basis for disease in adults and children. **Elsevier Health Sciences**. 2014.

49. L, Fok-Moon; F, P, Lisa. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research. Vol.120, pg.165–174. August 2015.**
50. M, A, Mohd Zim; I, C, Sam; S, F, Omar; Y, F, Chan; S, Abubakar; A, Kamaulzaman. Chikungunya infection in Malaysia: comparison with dengue infection in adults and predictors of persistent arthralgia. **J. Virol. Vol. 56. pg. 141-145; 2013.**
51. S, Rajapakse; C, Rodrigo; A, Rajapakse. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg. 104(2):89-96. 2010.**
52. Y, Touret; H, Randrianaivo; A, Michault; et al. Early maternal-fetal transmission of the chikungunya virus. **Presse Med. 35(11 Pt 1):1656-1658. 2006.**
53. P, Gérardin; G, Barau; A, Michault; M, Bintner; H, Randrianaivo; G, Choker; Y, Lenglet; Y, Touret; A, Bouveret; P, Grivard; L, K, Roux; S, Blanc. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus **Infections on the Island of La Réunion. PLoS Medicine, 18 mars 2008.**
54. L, Y, H, Goh; J, P, Hobson-Peters; J, Gardner; H, Bielefeldt-Ohmann; A, T, Pyke; A, Suhrbier; R, A, Hall. Neutralizing monoclonal antibodies to the E2 protein of chikungunya virus protects against disease in a mouse model. **Clinical Immunology. Vol. 149, 487–497. 2013.**
55. P, Pongsir; K, Praianantathavorn; A, Theamboonlers; S, Payungporn; Y, Poovorawan; P, Pongsiri. et al. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 342-346. 2012.**
56. V, J, Lee; A, Chow; X, Zheng. et al. Simple clinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases, vol. 6, no. 9, Article ID e1786. View at Publishe. 2012.**
57. A, L, Presti; A, Lai; E, Cella1; G, Zehender; M, Ciccozzi. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 925-932. 2014.**
58. L, Y, H, Goh; Y, Kam; S, W, Metz; J, Hobson-Peters; N, A, Prow; S, Mccarthy; D, W, Smith; G, P, Pijlman; L, F, P, Ng; R, A, HALL. A sensitive epitope-blocking ELISA for the detection of Chikungunya virus-specific antibodies in patients. **Journal of Virological Methods. Vol. 222. 55–61. 2015.**
59. C, Sam; L, C, Chua; Y, F, Chan. Chikungunya virus diagnosis in the developing world: a pressing need. **Expert Rev. Anti Infect. Ther. Vol. 9(12), 1089–1091. 2011.**
60. Grupo Fleury. Laboratório lança teste para diagnosticar chikungunya. **Ciência & vida, 2014.**

61. J, Sambrook; E, F, Fritschi and Maniatis, T. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.**
62. A, R, Faria & H, M, Andrade. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Rev Pan-Amaz Saúde; 3(2):47-57. 2012.**
63. I, C, B, Filho. Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionado à alta congelabilidade do sêmen. **Porto alegre – RS. 2010.**
64. H, Schägger & G, von Jagow. Tricine–sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDa. **Anal. Biochem. 166, 368–379. 1987.**
65. J, Porath. Protein Expr Purif. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Aug.(4):263-81. Published by Elsevier Inc. 1992.**
66. C, Iwashita. Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação VII e proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia. **São Paulo 2012.**
67. 72. M, L, G, Figueiredo; L, T, M, Figueiredo. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(6):677-683, Nov-Dec, 2014.**
68. ANVISA – Agência Nacional de vigilância Sanitária. **<http://portal.anvisa.gov.br/>. 2016.**
69. M, Urdea et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world – **Nature S1, 73-79 . doi:10.1038/nature05448. 2006**