



IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS PEPTÍDEOS ANTIGÊNICOS DA PROTEÍNA E1 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA ATRAVÉS DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

**EDUARDA TANNUS MENDES TORRES; RAFAELA SPESSEMILLE VALOTTO;
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARÃES**

RESUMO

O vírus Chikungunya é, atualmente, uma grande problemática na epidemiologia mundial e, constantemente, são buscadas melhorias nas formas de diagnósticos e tratamentos. O CHIKV é envelopado e possui 3 componentes de envelope. Com o reconhecimento dessas proteínas, torna-se possível identificar o vírus no soro humano. Isso posto que, no organismo humano, a ligação antígeno-anticorpo se faz presente nas tentativas do sistema imune de reconhecer e atacar um patógeno desconhecido. Analisando o potencial dessa ligação, tem-se uma forma de diagnóstico: o teste de captura de antígeno. Como forma de potencializar o desenvolvimento de um método de detecção de antígeno e o diagnóstico precoce, utiliza-se a bioinformática, com predições do antígeno. Dessa forma, o estudo tem como objetivo prever os epítomos da proteína E1, utilizando-se de softwares e bases de dados para esses princípios. As ferramentas utilizadas, ElliPro, Discotope, SEPPA 3.0, BepiPred 2.0, Kolaskar and Tongaonkar, Chou and Fasman, Emini, Parker, Jameson- Wolf, Karplus-Schulz e Kyte-Doolittle, determinam análises voltadas para antigenicidade, hidrofobicidade, flexibilidade, acessibilidade e volta-beta. Os resultados, a partir da conjugação dos dados obtidos, foram analisados e a partir das regiões de epítomos que foram demarcadas. Esses resultados determinam uma maior assertividade nas regiões resultantes, possibilitando maior confiabilidade em seus usos para uma possível forma de diagnóstico com possíveis aplicações nos países subdesenvolvidos. A possibilidade de desenvolvimento de um teste a partir dos dados de bioinformática, objetivando a captura do antígeno, é determinada como uma forma de testagem simples e barata. Esses diagnósticos podem, ainda, ser feitos no próprio ponto de atendimento ao paciente, sendo um teste de point-of-care, sem necessidade de grandes amostras para análise e possui aplicabilidade em massa, fatos esses que ressaltam a importância do estudo apresentado.

Palavras-chave: CHIKV; Antigenicidade; Predição.

1 INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é pertencente ao gênero Alphavirus, distribuído mundialmente de forma abundante, causando epidemias em diversas localidades. Suas primeiras aparições foram registradas no continente africano, ganhando amplo rearranjo ao longo dos anos. A taxa de mutações, resultando em variantes, foi um dos principais motivos para a melhor adaptação do vírus e para a expansão que ocorreu no início do século 21. Segundo Silva (2018), o primeiro caso de CHIKV nas Américas foi registrado em 2013, sendo, no Brasil, no ano de 2014 e notificado em crescentes atualmente, devido a sua similaridade com outras arboviroses também presentes no país.

O vírus Chikungunya é envelopado e as proteínas estruturais contêm três componentes de um envelope (E), sendo eles E1, E2 e E3. Essas proteínas estão presentes na superfície dos vírus, dessa forma, os agentes externos reconhecem essas (Silva, 2018). Tendo em vista o potencial de reconhecimento dessas proteínas, torna-se possível a utilização dessas estruturas

como forma de identificação desses vírus em soro humano, principalmente as proteínas E1 e E2 que são mais presentes. Essa nova alternativa apresenta-se como uma forma de diagnóstico da doença, trazendo benefícios clínicos para os pacientes e laboratoriais para os profissionais.

A imunologia é um estudo referente às propriedades de defesa fisiológica, junto das células presentes nesse sistema, consistindo, também, nas análises referentes a patologias. No que diz respeito a doenças virais, é de suma importância destacar o papel determinante da ligação antígeno-anticorpo. No organismo humano, essa ligação se faz presente nas tentativas do próprio sistema imune de reconhecer e atacar o patógeno desconhecido, visto que a imunidade adaptativa contra infecções virais é mediada pelos anticorpos (Abbas et al., 2023).

Além disso, ao analisar o potencial dessa ligação antígeno-anticorpo como forma de diagnóstico é de extrema importância citar o teste de captura de antígeno. O desenvolvimento desse teste se baseia na detecção da presença de antígenos virais nas amostras analisadas e a utilização de anticorpos contra as sequências proteicas referentes à infecção em questão (Valotto, 2021). Essa análise possibilita uma detecção precoce, tendo em vista que as partículas antigênicas causadoras da doença estão no organismo desde o início do seu desenvolvimento. Nesse contexto, para o desenvolvimento de um método de detecção de antígeno, a bioinformática se faz presente como uma importante aliada no estudo de regiões virais que podem ser utilizadas nas áreas de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (Colombarolli, 2018).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de se obter informações referentes às predições desejadas, bancos de dados online e softwares foram utilizados. Inicialmente, o banco de dados online do UniProt foi utilizado para obtenção da sequência de aminoácidos referente à proteína de análise, a E1 do CHIKV (código F2YI14).

A partir dos resultados obtidos, usufrui-se do software online IEDB Analysis Resource para analisar predições lineares como: epítomos, antigenicidade, volta beta, superfície acessível e hidrofiliçidade. Em contrapartida, a sequência foi também aplicada no software ChimeraX, a fim de se obter a estrutura 3D esperada dessa proteína para que outras predições pudessem ser feitas a partir dessa análise.

As ferramentas utilizadas para as predições durante o projeto estão descritas a seguir:

- BepiPred Linear Epitope Prediction 2.0: prediz epítomos, representando as regiões da proteína onde há campo de interação com o sistema imune (JESPERSEN et al, 2017);
- Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity: determina a capacidade de uma sequência provocar resposta imune (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990);
- Chou and Fasman Beta-Turn Prediction: indica as sequências presentes em regiões de volta-beta (CHOU; FASMAN, 1978);
- ElliPro Antibody Epitope Prediction: determina áreas de epítomos descontínuos a partir da estrutura 3D da proteína (PONOMARENKO et al, 2008);
- Emini Surface Accessibility Prediction: a análise das regiões expostas determina a possibilidade da ligação com o anticorpo ocorrer de forma eficiente (EMINI, 1985);
- Parker Hydrophilicity Prediction: determina a probabilidade de uma sequência ser encontrada em meio hidrofílico, facilitando assim, a ligação com o anticorpo (PARKER, 1986);
- Jameson- Wolf Antigenicity: prediz determinantes antigênicos potenciais a partir de métodos de combinação para predições de estruturas de proteínas (JAMESON; WOLF, 1988);
- Discotope Structuer-based Antibody Prediction: utilizado para predizer epítomos descontínuos a partir de estruturas de proteínas 3D (ANDERSON; NIELSEN; LUND, 2006);
- SEPPA 3.0: determina predições de epítomos espaciais a partir de proteínas antigênicas (CAO, 2023);

- Karplus-Schulz Flexibility: indica a flexibilidade das cadeias das sequências referência (KARPLUS; SCHULS, 1985);
- Kyte-Doolittle Hydropathy: determina regiões de hidropatia em proteínas a partir das suas sequências de aminoácido (KYTE; DOOLITTLE, 1982).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Além da estrutura linear obtida a partir da sequência de aminoácidos, é essencial destacar a importância do modelo 3D para outras previsões relacionadas à temática. Isso está correlacionado com a realidade da ligação anticorpo-antígeno, visto que as proteínas não são encontradas em estruturas primárias, sendo essencial uma modelagem espacial para maior entendimento acerca dos parâmetros para tal ligação.

Dessa forma, o software ChimeraX foi utilizado a fim de se obter uma estrutura 3D final referente à proteína E1 do CHIKV. Essa ferramenta utiliza-se da sequência linear da proteína referida, em conjunto com bases de dados internas para proporcionar um resultado que se aproxime da realidade. No caso da E1, a situação tornou-se mais complicada, visto que a sequência de aminoácidos não estava diretamente relacionada com nenhuma modelagem 3D existente nos registros mundiais. Assim, o software utiliza um mecanismo para simular, próximo à realidade, a estrutura da proteína. Ele correlacionou a E1 com proteínas similares e já coexistentes, além de utilizar da estrutura da E1-E2 para oferecer a estrutura hipotética e esperada na proteína requerida. Com isso, um documento com a modelagem foi obtido e está representado na Figura 1.

Figura 1: Estrutura da proteína E1 em modelagem 3D obtida a partir do software ChimeraX.



Fonte: Autoria própria, 2024.

De posse da estrutura primária da E1 (sequência de aminoácidos), junto da modelagem 3D da proteína, foi possível iniciar-se as previsões necessárias para o desenvolvimento do estudo. Em relação ao material utilizado para as previsões, as análises são separadas em dois grupos: as que utilizaram sequência linear e as que utilizaram a modelagem 3D. As ferramentas ElliPro Antibody Epitope Prediction, Discotope Structure-based Antibody Prediction e SEPPA 3.0 utilizam-se da estrutura espacial para suas previsões, enquanto BepiPred Linear Epitope Prediction 2.0, Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity, Chou and Fasman, Beta-Turn Prediction, Emini Surface Accessibility Prediction, Parker Hydrophilicity Prediction, Jameson- Wolf Antigenicity, Karplus-Schulz Flexibility e Kyte-Doolittle Hydropathy são realizadas a partir da sequência primária linear da E1.

Após a inserção da sequência nos parâmetros das ferramentas de análise, os resultados foram obtidos. Em termos de análise geral, as previsões foram subdivididas em dois grandes grupos: o primeiro voltado para as características de antigenicidade da sequência referência, e o outro voltado para outras análises complementares, tais quais hidrofiliicidade, flexibilidade, acessibilidade e volta-beta, fatores que influenciam as possibilidades de ligação anticorpo-

antígeno.

Em relação à antigenicidade da sequência proposta, como dito anteriormente, os testes propostos foram: Jameson-Wolf, Kolaskar-Tongaonkar, Bepipred 2.0, ElliPro, Discotope e SEPPA 3.0, agrupando os dados referente a predições lineares com os significativos de superfície 3D. A junção dos resultados obtidos, de acordo com a sequência de aminoácido referência, foi organizado a fim de facilitar a comparação dessas informações, como visto na Figura 2, a seguir.

Figura 2: Resultados das predições relacionadas à antigenicidade da sequência de aminoácidos e da modelagem espacial da proteína E1 do CHIKV. Fonte: autoria própria, 2024.

Jameson-Wolf	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
Kolaskar-Tongaonkar	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
Bepipred 2.0	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
ElliPro	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
Discotope	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
SEPPA 3.0	YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV	60
Jameson-Wolf	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
Kolaskar-Tongaonkar	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
Bepipred 2.0	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
ElliPro	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
Discotope	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
SEPPA 3.0	KCCGTAECKDKNLPDYSCVFTGVYPFMWGGAYCFCDAAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS	120
Jameson-Wolf	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
Kolaskar-Tongaonkar	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
Bepipred 2.0	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
ElliPro	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
Discotope	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
SEPPA 3.0	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY	180
Jameson-Wolf	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
Kolaskar-Tongaonkar	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
Bepipred 2.0	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
ElliPro	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
Discotope	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
SEPPA 3.0	KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPEKSDVYANTQLVLRPAAGTVHVPYSQAPSGF	240
Jameson-Wolf	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
Kolaskar-Tongaonkar	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
Bepipred 2.0	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
ElliPro	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
Discotope	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
SEPPA 3.0	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCVGNMPSIDIPEAAFRVVDAPSLTDMS	300
Jameson-Wolf	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
Kolaskar-Tongaonkar	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
Bepipred 2.0	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
ElliPro	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
Discotope	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
SEPPA 3.0	ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKITGGVGLV	420
Jameson-Wolf	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360
Kolaskar-Tongaonkar	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360
Bepipred 2.0	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360
ElliPro	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360
Discotope	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360
SEPPA 3.0	CEVPACTHSSDFGGVAIIKYAASKKGKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL	360

Jameson-Wolf	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439
Kolaskar-Tongaonkar	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439
Bepipred 2.0	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439
ElliPro	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439
Discotope	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439
SEPPA 3.0	VAVAALILIVVLCVSFSRH	439

A outra análise proposta analisa volta-beta, superfície acessível, flexibilidade e hidrofobicidade (hidropatia). Para isso, as predições utilizadas foram: Chou and Fasman, Emini, Karplus-Schulz, Parker e Kyte-Doolittle. As características observadas auxiliam no desempenho desses aminoácidos como antígenos, além de contribuírem para uma melhor ligação antígeno-anticorpo, fatores que contribuem para o parâmetro em questão.

Após a obtenção das informações previamente demonstradas, foi desenvolvida a análise desses dados e a interpretação dos resultados presentes. Antigenicidade diz respeito à capacidade de interação entre a sequência analisada e o anticorpo relacional e, dessa forma, ao analisar as predições representadas na Figura 2 e levando em consideração uma maior confiabilidade nas predições de modelos 3D (devido à maior proximidade com a realidade), é possível observar regiões de aminoácidos que apresentam uma maior afinidade com o anticorpo. Apesar de todas as ferramentas analisarem uma mesma variável, ainda é possível notar uma amplitude de “respostas” encontradas, fatos que ressaltam a necessidade de se ter mais de um teste para análise. Um exemplo é apresentado na Figura 3, a seguir, na qual uma sequência de 5 aminoácidos encontram-se como positivos nos testes Jameson-Wolf, Bepipred 2.0, ElliPro e SEPPA 3.0, respectivamente. Além disso, percebe-se que duas das predições foram relacionadas à modelagens espaciais, fato que contribui para a veracidade e aplicabilidade na prática.

Figura 3: Recorte dos resultados das predições relacionadas à antigenicidade da sequência de aminoácidos e da modelagem espacial da proteína E1 do CHIKV, presente entre os aminoácidos 300 e 360.



Fonte: autoria própria, 2024.

Como agregador para as análises de antigenicidade, os testes complementares feitos auxiliam para uma maior confiabilidade dos resultados obtidos. A análise da volta-beta, determinada na ferramenta Chou and Fasman, indica as regiões da sequência que passam por processo de formação incompleta. Devido à essa má-formação, os recortes que são positivos para a volta-beta na predição apresentam maiores dificuldades para desenvolver uma ligação com o anticorpo. Por isso, com objetivo de maximizar os resultados, na Figura 4, os resultados negativos à predição foram detalhados com a cor lilás, visto que o resultado negativo condiz com uma maior capacidade de ligação, fato desejado na análise.

Outrossim, a ferramenta Emini, que analisa superfície acessível, indica as regiões da sequência da proteína que mais estão propensas a serem acessadas por partículas externas, como o anticorpo. Dessa forma, as informações que indicam positivo para essa predição são os recortes com essa maior acessibilidade, como demonstrado com a coloração verde na Figura 4.

Além disso, os testes de flexibilidade feitos com a ferramenta Karplus-Schulz determinam o potencial de flexibilização das cadeias da proteína, apresentando os resultados positivos como apontados com a cor vermelha na Figura 4.

Por fim, o estudo da hidrofiliicidade e hidropatia das regiões da sequência, feitos através dos instrumentos de Parker e Kyte-Doolittle, respectivamente, analisam os epítomos hidrofílicos, a fim de que esses recortes possibilitem uma aplicação em meio aquoso. As cores utilizadas e representadas na Figura 4 foram azul para as predições com Parker e amarelo para as com Kyte-Doolittle.

Figura 4: Recorte dos resultados das predições complementares referentes à sequência de aminoácidos da proteína E1 do CHIKV, presente entre os aminoácidos 60 e 120.



Fonte: autoria própria, 2024.

Tendo analisado ambas as comparações referentes às Figuras 2 e às predições complementares, é possível obter-se as regiões mais marcadas que coincidem nestes dois dados. A partir disso, a Tabela 1 apresenta os fragmentos de aminoácidos que, teóricamente, de acordo com a bioinformática, apresentam maiores probabilidades de se ligarem aos anticorpos.

Tabela 1: Correlação dos resultados obtidos na Figura 2, em adição às predições complementares. As regiões positivadas para no mínimo 4 predições foram anotadas e comparadas entre si, resultando nas sequências apresentadas. Fonte: autoria própria, 2024.

Aminoácidos em comum (numericamente)	Sequência referente
101-103	TQL
208-210	PES
216	N
246	E
324-326	KKG

Levando-se em consideração os dados já obtidos, é possível comparar os resultados com as informações encontradas na literatura. Ao relacionar os resultados obtidos com o estudo feito por Bagno, 2018, percebe-se a grande variação nos dados relacionados à ferramenta BepiPred. A autora utilizou variações nos parâmetros padrões da análise, reduzindo o grau de assertividade da predição, visto que ela identificou quase toda a proteína como região de epítopo. Além disso, o uso exclusivo dessa ferramenta reduz a confiabilidade do resultado.

Por outro lado, ao analisar os resultados do presente estudo com os obtidos por Anwar e colaboradores (2019), é notável uma maior semelhança entre alguns resultados acerca das predições feitas com BepiPred e Emini. Porém, apesar dessa proximidade, é possível notar ainda uma falta de assertividade quanto ao potencial de estudo sobre os parâmetros da proteína E1.

4 CONCLUSÃO

O vírus Chikungunya é hoje responsável por uma grande problemática presente nos

países subdesenvolvidos. A arbovirose que recebe o nome de seu vírus causador é um assunto recorrente na epidemiologia mundial e ainda requer maiores estudos para prognósticos sobre sua situação.

Nessa vertente, a Bioinformática vem como forma de auxiliar os países com poucos recursos na área da pesquisa, como o Brasil, visto que possibilita uma maior veracidade dos resultados feitos na prática. Além disso, o uso de maiores quantidades de ferramentas é essencial para uma maior confiabilidade do estudo, visto que cobre as maiores falhas possíveis. Ao analisar esse fato, destaca-se a importância desse trabalho ao utilizar multi ferramentas que, em oposição aos registros bibliográficos citados anteriormente, possibilitam resultados mais confiáveis e aplicáveis.

Portanto, assegura-se o atual trabalho como uma busca por garantia de uma melhora no cenário mundial da Chikungunya, possibilitando novas descobertas e aprimoramentos em testes e diagnósticos.

REFERÊNCIAS

ABBAS A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. 10ª edição. Rio de Janeiro: GEN – Grupo Editorial Nacional S.A., 2023.

ANWAR, S.; MOUROS, J. T.; KHAN, F.; HOSEN, M. J. Prediction of Epitope-based Peptide Vaccine Against the Chikungunya Virus by Immuno-informatics Approach. *Bentham Science*, n.21, p. 325-340, 2019.

BAGNO, Flávia Fonseca. *Produção Heteróloga, em Sistema Procarioto, de Proteínas Estruturais dos Vírus Zika e Chikungunya e Avaliação de seu Potencial para o Uso em Ferramentas Diagnósticas*. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

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

COLOMBAROLLI, Stella Garcia. *Identificação de Antígenos Específicos para o desenvolvimento de um Sistema de Diagnóstico Sorológico Diferencial para Zika e Dengue*. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Minas, Minas Gerais.

DONALISIO, M.R. e FREITAS, A.R.R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *Revista Brasil Epidemiologia*. JAN-MAR 2015. p. 283-285.

EMINI E. A., HUGHES J. V., PERLOW D. S., BOGER J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985; v. 55, p. 836-839.

FUMAGALLI, Marcílio Jorge. *Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro*. 2018. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

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

JESPERSEN M. C., PETERS B., NIELSEN M., MARCATILI P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* 2017

KARPLUS P. A., SCHULZ G. E. Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens. *Naturwissenschaften* 1985; v. 72, p. 212-213.

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

KRINGELUM J. V., LUNDEGAARD C., LUND O., NIELSEN M. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput Biol*. 2012.

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

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

PONOMARENKO J., BUI H. H., LI W., FUSSEDER N., BOURNE P. E., SETTE A., PETERS B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*. 2008 Dec; v. 2; n. 9 p. 514.

SILVA, João Paulo da Cruz. Mapeamento de epítomos das proteínas estruturais do vírus Chikungunya. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VALOTTO, Rafaela Spessemille. Caracterização de Antígenos e Produção de Anticorpos Anti-Peptídeos dos Vírus Dengue, Zika e Chikungunya. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo.