



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - PPGCBM**

EMANUELA LIMA TEIXEIRA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chikungunya virus* E INVESTIGAÇÃO
DOS ARBOVÍRUS *Dengue virus* e *Mayaro virus* NO ESTADO DO PIAUÍ**

**PARNAIBA-PI
MARÇO - 2018**

EMANUELA LIMA TEIXEIRA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chikungunya virus* E INVESTIGAÇÃO
DOS ARBOVÍRUS *Dengue virus* e *Mayaro virus* NO ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas – PPGCBM da Universidade Federal do Piauí – UFPI, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

PARNAIBA-PI
MARÇO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

B277c Barros, Emanuela Lima Teixeira.

Caracterização molecular de *Chikungunya virus* e investigação dos arbovírus *Dengue virus* e *Mayaro virus* no estado do Piauí [manuscrito] / Emanuela Lima Teixeira Barros. – 2018.

87 f. : il.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos

1. Arbovírus. 2. Diagnóstico Molecular. 3. Vigilância Epidemiológica. I. Título.

CDD: 616.9

EMANUELA LIMA TEIXEIRA BARROS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chikungunya virus* E INVESTIGAÇÃO DOS ARBOVÍRUS *Dengue virus* e *Mayaro virus* NO ESTADO DO PIAUÍ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas – PPGCBM da Universidade Federal do Piauí – UFPI, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM: 29/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso - PI
Presidente

Prof^a. Dr^a. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso - PI
Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Cintia Martins Perinotto
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso - PI
Membro Externo

Suba o primeiro degrau com Fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Antônia Gomes e ao meu companheiro, Ricardo César por serem os maiores incentivadores da minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a DEUS pela vida, por tudo que tenho e que sou, pela saúde e proteção, por todas as bênçãos concedidas, por ser minha força e amparo.

Ao meu anjo guardião que me protege, guia, ilumina e governa sempre!

Aos meus pais José Maria Teixeira Barros (*in memoriam*) e Antônia Gomes de Lima Barros pelo amor, cuidado, apoio, auxílio e por sempre acreditar em mim.

Ao meu companheiro, Ricardo César, presente de Deus, por ser meu ponto de apoio, pela paciência, amor, pelos incentivos diários e por ser a pessoa que mais acredita no meu potencial e que nunca me deixa desistir diante dos obstáculos! Te amo vida!

A todos os familiares em especial ao meu irmão, Lucas Lima, que mesmo longe, sempre torceu por minhas conquistas.

À Conceição de Maria, Ricardo Cezar, Larissa Alves, Augusto Cezar e Rodrigo, por todo o auxílio e incentivo para continuar batalhando.

Aos poucos e sinceros amigos que conquistei (antes e durante o mestrado). Cada amizade contribuiu de alguma forma para meu crescimento pessoal (seja pelos incentivos e pela força durante os momentos de tristeza e solidão) e profissional (muitos me mostraram que dificuldades são um passo para evolução).

À Sidely Gil, Luiz Gonzaga e Maria do Socorro Alves por todo auxílio, apoio, carinho, por acreditarem em mim e por serem exemplos de força e humildade, meus grandes incentivadores. Muito Obrigada!

À Silveny Meiga, pela amizade e carinho, por todos os incentivos, ajuda, disponibilidade, força e confiança!

Aos queridos amigos Felipe Daniel e Thiago Gomes por toda a paciência deste planeta, ensinamentos, incentivo, apoio, carinho, palavras de conforto. Muito obrigada por tudo!

Aos queridos colegas Felipe Rodolfo, Larissa Pessoa, Bruna Souza, por todo o auxílio, incentivos e por tornarem essa caminhada mais leve.

A todos do Laboratório BIOMIC que me proporcionaram auxílio e conhecimento durante esses 2 anos de mestrado. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido! Às mestrandas Silveny Meiga, Julianna Queiroz, Vanessa Poleanna e Nayane Carvalho pelo apoio, carinho, ajuda e troca de conhecimentos. Às mestras Laís Souza, Vanessa Vale e Tereza Garcês, por terem aberto um caminho para que eu chegasse onde cheguei! Às alunas de iniciação científica, amigas e companheiras Dacylla Sampaio e Lorena Teles pelas maravilhosas conversas, amizade verdadeira, risadas, amparo, auxílio e incentivo nos momentos de angústia de tristeza. Adoro vocês, de coração! Ao auxílio e competência dos demais alunos de Iniciação Científica Vinícius Moraes, Aline Pinto, Mariella Maciel, Jaiane e Phillipe que sempre se mostraram disponíveis para prestar ajuda em qualquer momento. Aos demais colegas do BIOMIC, em especial Lucas Arruda e Mayck Barbosa pelas maravilhosas conversas e por toda a ajuda e apoio. A todos aqueles que passaram pelo laboratório e deixaram sua contribuição, em especial a Juana Brandão, Mariana, Deuzair Neves e Daniela Rocha, por todo carinho, auxílio, atenção e força!

À todos os colegas do laboratório de Genética Humana e Medica, em especial à Hygor Fernandes, Francisco Carlos (Carlinhos) e Andreia por toda ajuda, apoio, disponibilidade e assistência prestada.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Portela Ferreira pela oportunidade de ingressar na carreira científica, pela paciência, competência, ensinamentos, confiança, pelas críticas e “puxões de orelha” que contribuíram para meu amadurecimento profissional.

Aos colaboradores de Minas Gerais Prof. Dra Betânia Drumond e à Doutoranda Izabela Rezende por toda assistência, auxílio, disponibilidade e paciência em esclarecer minhas dúvidas.

À Prof^a Dra. Fernanda Machado pela disponibilidade e pelas contribuições valiosas durante a qualificação.

À Profª Dra. Anna Carolina Pereira pela competência, pelas considerações e sugestões importantes feitas durante a qualificação. Obrigada também pela disponibilidade por aceitar contribuir avaliando este trabalho.

À Profª Dra. Cintia Perinotto pela disponibilidade para avaliar este trabalho e pelas contribuições valiosas.

À coordenação dos técnicos de laboratório da UFPI, em especial à Juelina, Sansara e Francisco César pela disponibilidade, auxílio, assistência e apoio.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e à Prefeitura Municipal de Parnaíba, pelos financiamentos concedidos aos projetos vinculados a esta pesquisa.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, em especial ao coordenador Prof. Dr. Giovanni Rebolças, por ser um exemplo de profissional, pela atenção e disponibilidade.

À TODOS que participaram e contribuíram, de alguma forma para a realização deste trabalho, bem como para meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional. MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Arbovírus.....	4
2.2 <i>Flavivirus</i>	8
2.2.1 <i>Dengue virus</i>	10
2.2.1.1 Diversidade Genética.....	10
2.2.1.2 Epidemiologia.....	11
2.2.1.3 Ciclos de Transmissão.....	12
2.2.1.4 Patogênese e Aspectos Clínicos.....	13
2.3 <i>Alfavirus</i>	15
2.3.1 <i>Chikungunya virus</i>	18
2.3.1.1 Diversidade Genética.....	18
2.3.1.2 Epidemiologia.....	20
2.3.1.3 Ciclos de Transmissão.....	21
2.3.1.4 Patogênese e Aspectos Clínicos.....	21
2.3.2 <i>Mayaro virus</i>	24
2.3.2.1 Diversidade Genética.....	24
2.3.2.2 Epidemiologia.....	24
2.3.2.3 Ciclos de Transmissão.....	26
2.3.2.4 Patogênese e Aspectos Clínicos.....	26
2.4 Diagnóstico Clínico e Laboratorial das Arboviroses.....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Aspectos Éticos e Legais.....	31
4.2 Coleta de Amostras e Obtenção de Dados Clínico-Laboratoriais dos Pacientes.....	31
4.3 Diagnóstico Molecular.....	31
4.3.1 Extração de RNA Viral e Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	31
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.3.2.1 PCR para amplificação do gene <i>NS5</i> dos <i>Flavivirus</i>	33
4.3.2.2 PCR para amplificação do gene <i>NS5</i> dos <i>Flavivirus</i> seguida por Multiplex Nested-PCR para sorotipagem de DENV.....	34
4.3.2.3 PCR para amplificação do gene <i>E1</i> de CHIKV.....	35
4.3.2.4 PCR para amplificação do gene <i>E2</i> de CHIKV.....	35
4.3.2.5 PCR para amplificação do gene <i>nsP1</i> dos <i>Alphavirus</i> seguida por Multiplex Nested-PCR para detecção de MAYV.....	36

4.3.2.6 PCR para amplificação do gene <i>E1</i> de MAYV	37
4.3.2.7 PCR para amplificação dos genes <i>E2/E3</i> de MAYV	37
4.3.3 Visualização dos Produtos Amplificados	38
4.4 Sequenciamento dos genes <i>E1</i> e <i>E2</i> de CHIKV e Análise das Sequências	38
4.4.1 Análise Filogenética	39
4.5 Acompanhamento clínico dos pacientes positivos para CHIKV	39
5. RESULTADOS.....	41
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE I.....	84
APÊNDICE II.....	86
APÊNDICE III.....	87

RESUMO

Arbovírus são vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos que podem causar doenças em animais e seres humanos. *Dengue virus* (DENV) é um arbovírus que encontra-se mundialmente distribuído e no Brasil, circula de forma endêmica desde a década de 80. A ocorrência de surtos anuais tem sido facilitada pela co-circulação dos quatro sorotipos (DENV1-4) em vários municípios. Mais preocupante ainda, é que grande parte das infecções são assintomáticas e quando sintomáticas, podem evoluir com manifestações hemorrágicas ou neurológicas fatais. Adicionalmente, outros arbovírus como *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Mayaro virus* (MAYV) estão emergindo de forma alarmante em diversas regiões brasileiras. O primeiro, foi inserido no Brasil em 2014 e desde então disseminou-se rapidamente por vários estados, causando surtos e epidemias de uma doença debilitante que cursa com intensa e prolongada artralgia. Já MAYV, apresenta-se prevalente na região Norte e vem se destacando pelo aumento da incidência em áreas não endêmicas, com sintomas semelhantes aos ocasionados por CHIKV. Estas arboviroses representam um sério desafio à saúde pública, pois podem ser transmitidas por mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes*, que estão amplamente distribuídos em áreas urbanas e peri-urbanas. Além disso, as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes podem ser agravadas em casos de co-infecções (entre arbovírus) ou na presença de outras comorbidades, dificultando tanto o diagnóstico diferencial como as ações de vigilância em saúde associadas ao monitoramento e controle dos surtos. Diante do aumento no número de casos, este estudo objetivou investigar a dinâmica de circulação dos arbovírus *Dengue virus*, *Chikungunya virus* e *Mayaro virus* no Estado do Piauí nos anos de 2016 e 2017. Foram coletadas 578 amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção por arbovírus. Destas, 115 foram extraídas e analisadas através da técnica de RT-PCR, utilizando iniciadores que amplificam a região dos genes que codificam as glicoproteínas NS5 de DENV, E1 e E2 de CHIKV e E1, E2 e E3 de MAYV. Do total de amostras testadas, três foram positivas para detecção de DENV, sendo possível identificar os sorotipos DENV-2 e DENV-4. Um paciente apresentou-se co-infectado por DENV-1 e CHIKV. Por outro lado, 32 amostras foram positivas para detecção de CHIKV, indicando a circulação e disseminação crescente deste vírus no estado. Uma amostra foi positiva para MAYV, sugerindo possível infecção por este arbovírus. A partir destes resultados, treze amostras foram enviadas para o sequenciamento parcial dos genes E1 e E2 de CHIKV para confirmação da circulação. A análise filogenética revelou que a linhagem circulante no Piauí pertence ao genótipo do Oeste-Central-Sul Africano (ECSA), que foi introduzido no Brasil em 2014 através do estado da Bahia. Adicionalmente, observamos que os vírus isolados neste estudo agruparam-se com outros isolados brasileiros da região Nordeste. O monitoramento clínico de pacientes acometidos por CHIKV mostrou que 14 dos 32 pacientes positivos evoluíram para a fase crônica, apresentando sintomas cuja duração variou de 4 a 12 meses. Em conjunto, estes dados poderão auxiliar a vigilância epidemiológica a traçar estratégias eficazes de monitoramento da circulação viral e controle vetorial, na tentativa de prevenir futuras epidemias arbovirais na população piauiense.

Palavras-chave: Arbovírus, Diagnóstico Molecular, Vigilância Epidemiológica.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses transmitted by hematophagous arthropod vectors that can cause diseases in animals and humans. *Dengue virus* (DENV) is an arbovirus that is globally distributed and, it has been endemic since the 1980's in Brazil. The occurrence of annual outbreaks has been facilitated by the co-circulation of the four serotypes (DENV1-4) in several municipalities. Another worrying issue is the fact that most infections are asymptomatic and, when symptomatic, they can develop fatal haemorrhagic or neurological manifestations. In addition, others arboviruses such as *Chikungunya virus* (CHIKV) and *Mayaro virus* (MAYV) are emerging alarmingly in several Brazilian regions. The first one was introduced in Brazil in 2014, and it has been spread rapidly through several states, causing outbreaks and epidemics of a debilitating disease which occurs with intense and persistent arthralgia. In contrast, MAYV is prevalent in the North region and it has been highlighted by the increase in the incidence in non-endemic areas, with effects similar to those caused by CHIKV. These arboviruses represent a serious challenge to public health as they can be transmitted by anthropophilic mosquitoes of the genus *Aedes*, which are widely distributed in urban and peri-urban areas. In addition, clinical manifestations presented by patients may be exacerbated in cases of co-infections (among arboviruses) or in the presence of other comorbidities, making both differential diagnosis and health surveillance actions associated with the monitoring and control of outbreaks difficult. Considering the increased number of cases, this study aimed to investigate the circulation dynamics of the arboviruses *Dengue virus*, *Chikungunya virus* and *Mayaro virus* in the Piauí State between 2016 and 2017. 578 serum samples from patients with suspected arbovirus infection were collected. From these, 115 samples were extracted and analyzed by the RT-PCR technique, using primers that amplify the encoding genes region of E1 and E2 glycoproteins for CHIKV and NS5 for DENV. From the total of samples tested, three of them were positive for DENV detection, and they were identified as DENV-2 and DENV-4 serotypes. One patient was co-infected with DENV-1 and CHIKV. On the other hand, 32 samples were positive for CHIKV detection, indicating an increasing circulation and dissemination of this virus in the Piauí State. One sample was positive for MAYV, suggesting a possible infection by this arbovirus. From these results, thirteen samples were sent for partial sequencing of the CHIKV genome. A phylogenetic analysis revealed that the Piauí circulating lineage belongs to the West-Central-South African genotype (ECSA), which was introduced in Brazil through the Bahia State. Clinical monitoring of patients with CHIKV showed that 14 of the 32 positive patients evolved to chronic phase, presenting symptoms ranging from 4 to 12 months. Together, these data can help the epidemiological surveillance to devise effective monitoring viral circulation strategies and vector control in order to prevent future arboviral epidemics in the Piauí population.

Keywords: Arbovirus, Molecular Diagnosis, Epidemiological Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos ciclos de transmissão dos arbovírus (Fonte: WEAVER e BARRET, 2004 - Adaptado).	7
Figura 2. Organização do genoma do <i>Flavivirus</i> e suas proteínas Estruturais e Não Estruturais resultantes (Fonte: BECK et al., 2013 - Adaptado).	9
Figura 3. Principais manifestações clínicas da Dengue. De acordo com a classificação antiga proposta pela OMS (1997), as caixas azuis representam as manifestações clássicas da FD, as caixas vermelhas representam as manifestações da FHD, e as caixas verdes representam complicações raras. (Fonte: JOHN et al, 2013 – Adaptado).	14
Figura 4. Organização do genoma dos Alfavírus e suas proteínas Não Estruturais e Estruturais resultantes. (Fonte: WEAVER e LECUIT, 2015 - Adaptado).	17
Figura 5. Mapa mostrando a propagação histórica do CHIKV para a Ásia, Europa e Américas a partir do ciclo enzoótico na África (TSETSARKIN et al., 2016 - Adaptado).	19
Figura 6. Representação esquemática da disseminação do CHIKV após a picada do mosquito (KAM et al., 2009 - Adaptado).	22
Figura 7. Representação da distribuição de MAYV nas Américas do Sul e Central (Fonte: MOTA et al., 2015 - Adaptado).	25
Figura 8. Métodos de identificação laboratorial utilizados no diagnóstico de infecção por arbovírus (Fonte: PEELING et al., 2010 – Adaptado).	28
Figura 9. Esquema representativo da metodologia utilizada para detecção molecular do DENV, CHIKV e MAYV.	33
Figura 10. Representação gráfica das principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes nos anos de 2016 e 2017.	41
Figura 11. Esquema representativo de amostras submetidas à sorologia para detecção de anticorpos anti-DENV e anti-CHIKV e valores absolutos e relativos de amostras positivas nos anos de 2016 e 2017.	42
Figura 12. Árvore filogenética com treze genomas parciais (434 pb) de CHIKV isolados no Piauí, Brasil. A árvore foi construída utilizando o programa Mega v.7.0, com um <i>bootstrap</i> de 1.000 replicatas. A história evolutiva foi inferida utilizando o	

método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura Nei. Os isolados deste estudo estão marcados em vermelho.....45

Figura 13. Árvore de máxima credibilidade de clado com treze genomas parciais (434 pb) de CHIKV isolados no Piauí, Brasil. Os isolados deste estudo estão marcados em vermelho. A árvore foi reconstruída usando o modelo de substituição de nucleotídeos HKY com distribuição de gama (quatro categorias), sob o relógio molecular e o método Bayesiano46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais funções das proteínas Estruturais e Não-Estruturais do genoma dos <i>Flavivirus</i>	9
Tabela 2. Principais funções das proteínas Não Estruturais e Estruturais do genoma dos <i>Alfavirus</i>	16
Tabela 3. Sequência de iniciadores descritos por Chao e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene <i>NS5</i> com os respectivos tamanhos dos produtos.	33
Tabela 4. Sequência de iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) para amplificação da região de interesse no gene <i>NS5</i> com os respectivos tamanhos do produtos.	34
Tabela 5. Sequência de iniciadores descritos por Kumar e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene <i>E1</i> com sua localização e tamanhos do produto.	35
Tabela 6. Sequência de iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004) para amplificação da região de interesse no gene <i>E2</i> com sua localização e tamanhos do produto.	35
Tabela 7. Sequência de iniciadores descritos por Bronzoni (2005) para amplificação da região de interesse no gene <i>Nsp1</i> com sua localização e tamanhos do produto.....	36
Tabela 8. Sequência de iniciadores desenhados por BARROS, 2018 para amplificação da região de interesse no gene <i>E1</i> com sua localização e tamanhos do produto	37
Tabela 9. Sequência de iniciadores desenhados por Talarmin e colaboradores (1998) para amplificação da região de interesse no gene <i>E2/E3</i> , com sua localização e tamanhos do produto.....	37
Tabela 10. Descrição de amostras positivas por RT-PCR quanto ao sexo, idade, dias de sintomas, testes sorológicos, testes moleculares e manifestações clínicas.....	43
Tabela 11. Descrição de amostras positivas para CHIKV (pacientes contactados) de acordo com a idade, duração dos sintomas e principais manifestações clínicas de fase aguda e crônica.....	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BIOMIC – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas

cDNA – DNA complementar

CDC – Center of Disease Control

CHIKV – *Chikungunya virus*

DENV – *Dengue virus*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

ELISA – Teste imunoenzimático (do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

GelRed – Gel corante de ácido nucleico

Kb - Kilobases

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga

MAYV – *Mayaro virus*

MMLV – Enzima com atividade de Transcriptase Reversa (do inglês “*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*”)

nsP – Proteína não estrutural (do inglês “*Non Structural Protein*”)

Pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

RT-PCR – Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*”)

SNC – Sistema Nervoso Central

SLEV – *Encefalite Saint Louis virus*

OROV – *Oropouche virus*

VEEV- *Virus da Encefalite Equina Venezuelana*

Waf - Linhagem Ocidental Africana

ECSA - Linhagem do Leste/Centro/Sul Africano

IOL - Linhagem do Oceano Indico

WNV- *West Nile virus*

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores artrópodes hematófagos (arboviroses) são zoonoses que acometem milhões de pessoas em todo o mundo, implicando em sérios problemas econômicos e sociais. De um modo geral, os arbovírus são capazes de causar grandes surtos e epidemias, refletindo no aumento dos índices de morbidade e mortalidade (WEAVER e REISEN, 2010; DONALÍSIO et al., 2017). Estes vírus apresentam uma rápida e extensiva capacidade de disseminação, sendo isto facilitado por diversos fatores, dos quais destacam-se o desmatamento, mudanças climáticas, deslocamento de pessoas, o aumento da urbanização e a adaptação de vetores ao meio urbano (MURPHY, 1998, VASCONCELOS et al., 2001; RUST, 2012). A emergência e reemergência de determinados arbovírus em regiões não endêmicas tem se tornado um desafio preocupante, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical (LIANG et al., 2015).

No Brasil, as arboviroses representam um grave problema de saúde pública. Isto ocorre principalmente porque este país apresenta condições favoráveis para reprodução dos vetores responsáveis pela dispersão arboviral no meio urbano. Atualmente, diferentes arbovírus estão em circulação em todo o país, principalmente, aqueles pertencentes à família *Flaviviridae*, tais como *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV) e *West Nile virus* (WNV) (SARDI et al., 2016; VIEIRA et al., 2015). No entanto, *Mayaro virus* (MAYV) e *Chikungunya virus* (CHIKV), ambos membros da família *Togaviridae*, vem se destacando pelo aumento da incidência em regiões não endêmicas e pela debilitante e duradoura artralgia relatada pelos pacientes acometidos (CASSEB et al., 2013; FIGUEIREDO, 2015; MOTA et al., 2016; DONALÍSIO et al., 2017).

O DENV apresenta quatro sorotipos (DENV1-DENV4) que estão amplamente distribuídos em diversas regiões tropicais do mundo. Este vírus tem sido o responsável por surtos em diferentes países das Américas e no Brasil, tornou-se um preocupante problema de saúde pública devido à elevada incidência anual, que leva grande parte da população à procura por atendimento aos serviços de saúde. Grande parte das infecções são assintomáticas e quando sintomáticas podem evoluir para a cura ou para quadros hemorrágicos/neurológicos. A gravidade da doença está associada a diversos fatores, dos quais se destacam: a resposta imunológica produzida diante de infecções sequenciais e co-infecções por diferentes

sorotipos, a virulência apresentada por alguns genótipos e características genéticas do hospedeiro (HALSTEAD, 2007; GUZMAN e HARRIS, 2015).

O MAYV é um arbovírus endêmico nas Américas e no Brasil, tem causado surtos esporádicos especialmente nas regiões Norte e Centro-Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Já o CHIKV é implicado como responsável por provocar grandes epidemias, principalmente em países de clima tropical e subdesenvolvidos. Sua introdução no Brasil aconteceu no ano de 2014 e desde então, vários surtos ocorreram em diferentes estados (COLUCCI, 2016). Ambos os vírus exibem potencial epidêmico, pois podem ser transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*. As manifestações clínicas (em especial a artralgia intensa) geralmente evoluem de forma duradoura e debilitante, podendo ser agravadas na presença de outras comorbidades pré-existentes, tornando-se um desafio para a saúde pública.

O estudo da epidemiologia baseado na genética viral é de extrema relevância para o entendimento da doença, pois fornece informações sobre a dinâmica de surtos e epidemias, permitindo conhecer tanto a virulência das linhagens circulantes como a diversidade e gravidade das manifestações clínicas dos indivíduos acometidos (GUBLER, 1998; GUZMAN e KOURI, 2002; MIAGOSTOVICH, et al. 2003; OHAINLE, et al. 2011; GUZMAN e HARRIS, 2015). Além disso, o estudo da epidemiologia molecular é importante para o entendimento das interações entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro, bem como na resposta do hospedeiro à tratamentos com fármacos antivirais.

O Piauí é um estado da região Nordeste que tem se mostrado endêmico para a circulação de diferentes arbovírus (FIGUEIREDO et al., 2014; VIEIRA et al., 2015). Além de apresentar condições climáticas e ambientais favoráveis para a reprodução dos vetores (MONTEIRO et al., 2009), faz fronteira com outros estados (como Ceará, Maranhão, Pernambuco e Bahia) em que a circulação de diferentes arbovírus é crescente (CASTRO et al., 2003). Sabe-se que esta região é endêmica para o DENV desde a década de 90 e recentemente, Santos (2013), Vale (2015) e Garcês (2016) identificaram a circulação dos quatro sorotipos no Piauí. Esta situação associada ao aumento da circulação de CHIKV pela região Nordeste vem preocupando as autoridades de saúde pública, principalmente diante de uma possível circulação de MAYV.

Diante das informações apresentadas e do pouco conhecimento sobre a real situação epidemiológica dos casos de arboviroses no estado do Piauí, torna-se necessária uma investigação molecular sobre a dinâmica de circulação de DENV, CHIKV e MAYV. O acompanhamento das manifestações clínicas permitirá ter uma estimativa sobre a morbidade ocasionada por estas enfermidades. Estudos de filogenia poderão fornecer informações a respeito da diversidade genética viral, evidenciando os possíveis genótipos que possam circular no Estado. Os resultados do presente estudo poderão auxiliar a vigilância epidemiológica no mapeamento das áreas de risco endêmicas, bem como na adoção de estratégias mais eficazes de monitoramento da circulação viral e controle vetorial, a fim de evitar tanto a disseminação arboviral para outras regiões, como futuras epidemias na população piauiense.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arbovírus

O termo arbovírus deriva da expressão inglesa “*arthropod born viruses*”, é usado para designar um grupo de vírus causadores de doenças, transmitidos por insetos vetores artrópodes hematófagos (em especial mosquitos e carrapatos). A manutenção do ciclo biológico normalmente ocorre entre hospedeiros vertebrados susceptíveis (peixes, equídeos, aves, anfíbios, répteis, roedores, suínos, humanos, e primatas não humanos) e invertebrados (CALISHER, 1998; GUBLER, 2001; LOPES et al., 2014; LIANG et al., 2015). Estes vírus estão agrupados em diferentes famílias virais, no entanto, as principais famílias de interesse para a saúde pública são: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Reoviridae* (HOLLIDGE et al., 2010; RUST, 2012; WEAVER e REISEN, 2010).

Os arbovírus estão geograficamente dispersos em todo o mundo, havendo relatos da circulação em todos os continentes, exceto na Antártida (FORRESTER et al., 2012; LOPES et al., 2014). Sua ocorrência se dá principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, em que o ciclo de transmissão se mantém constante durante o ano inteiro. Contudo, estes vírus também estão presentes em países de clima temperado, embora, a reprodução de insetos vetores seja interrompida durante o inverno e reiniciada durante o verão (WEAVER e REISEN, 2010; CASSEB et al., 2013; LIANG et al., 2015).

Nas últimas décadas, diversos fatores provocados pelo homem tais como desmatamento, mudanças climáticas, aumento da urbanização, intercâmbio internacional, precariedade das condições sanitárias (principalmente em países subdesenvolvidos), facilitaram o surgimento de grandes surtos e epidemias de doenças em diversas partes do mundo (MURPHY, 1998, VASCONCELOS et al., 2001; RUST, 2012; MOTA et al., 2016; DONALÍSIO et al., 2017). Além disso, os arbovírus desenvolveram diferentes estratégias evolutivas (como mutações e recombinação genética) que aumentaram a virulência de novas estirpes com potencial epidêmico e favoreceram sua adaptação à novos ambientes e à diferentes vetores e hospedeiros (GUBLER, 2001; KUNO e CHANG, 2005; FIGUEIREDO, 2007; COFFEY et al., 2013).

Vale destacar que a falha no controle vetorial efetivo e a deterioração da infraestrutura de saúde pública são fatores adicionais que contribuíram

significativamente para a emergência e reemergência das arbovirose em diferentes países das Américas (VASCONCELOS, 2001; GUBLER, 2002; PFEFFER e DOBLER, 2010; WEAVER, 2013; LOPES et al., 2014; LIMA-CÂMARA, 2016).

O Brasil é um país de clima tropical com grande número de florestas e outros ecossistemas naturais que em conjunto criam condições ideais para a reprodução de vetores responsáveis pela disseminação arboviral (VASCONCELOS et al., 2001; FIGUEIREDO, 2007). Atualmente, diferentes arbovírus que causam doenças em humanos, principalmente aqueles pertencentes às famílias *Flaviviridae* (*Dengue virus* – DENV, *Zika virus* – ZIKV e *West Nile virus* - WNV), *Togaviridae* (*Chikungunya virus* – CHIKV e *Mayaro virus* - MAYV) e *Bunyaviridae* (*Oropouche vírus* - OROV) estão em circulação em todo o país (CASSEB et al., 2013; FIGUEIREDO, 2015; MOTA et al., 2016; DONALÍSIO et al., 2017).

DENV é o arbovírus mais estudado no mundo (STANAWAY et al., 2016), e no Brasil tem sido o responsável por causar grandes surtos e epidemias desde a década de 80 (OSANAI et al., 1983; FARES et al., 2015). O vírus apresenta quatro sorotipos distintos (DENV1 a 4), que estão amplamente distribuídos em quase todos os estados brasileiros (FARES et al., 2015). Os altos índices de morbidade e mortalidade resultantes da Dengue correlacionam-se com diversos fatores, em especial com o estado de imunidade do hospedeiro no momento da infecção e com o amplo espectro de sintomas clínicos manifestados pelos pacientes, que podem variar de uma síndrome febril aguda até formas graves, com presença ou não de sinais hemorrágicos e manifestações neurológicas (GUZMAN et al., 2016).

Embora a distribuição geográfica de arbovírus ocorra de forma bastante diversificada, a região Nordeste tem sido alvo da introdução e consequente co-circulação de diferentes arbovírus. Diante disto, vale destacar que o ZIKV e o CHIKV foram introduzidos no Brasil no ano de 2014, disseminando-se rapidamente por várias regiões (GAUTRET e SIMON, 2016). Os primeiros casos de infecção por ZIKV ocorreram no estado da Bahia, e, posteriormente, relatos clínicos de microcefalia em recém-nascidos foram associados à infecção prévia de mães por este vírus (ZANLUCA et al., 2015; CALVET et al., 2016). Em seguida, foram descritos episódios de infecção por CHIKV, um *Alphavirus* conhecido por causar intensa e duradoura artralgia nos pacientes acometidos (FARIA et al., 2016). Ainda no ano de 2014, o estado do Piauí notificou o primeiro caso humano de doença

neuroinvasiva causada por *West Nile virus* (WNV) que até então, só havia sido identificado em aves e equinos (VIEIRA et al., 2015).

MAYV e OROV são endêmicos na região amazônica e tem sido os principais responsáveis por causar surtos esporádicos de doença febril aguda em diversas regiões brasileiras (CASSEB et al., 2013; LOPES et al., 2014). MAYV é bem distribuído nas Américas, e no Brasil apresenta-se endêmico principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste. Embora seu principal vetor seja o *Haemagogus janthinomys*, exibe grande potencial de urbanização, pois também pode ser transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (LONG et al., 2011). Por outro lado, OROV ficou conhecido pelas grandes epidemias ocorridas em países da América do Sul e Central (TESH et al., 1994; NUNES et al., 2005). No Brasil, exibe elevada taxa de incidência principalmente na região Norte, local em que o principal vetor (*Culicoides Paranaensis*) se apresenta endêmico (VASCONCELOS et al., 2009). Além dos sintomas inespecíficos (febre, cefaleia, mialgia e fotofobia) pode causar esporadicamente meningite asséptica de curso benigno (BASTOS et al., 2012)

Adicionalmente, outros arbovírus que estão associados a pequenos surtos e que apresentam grande potencial de expansão no território brasileiro incluem o *Yellow Fever virus* (YFV) e o *Encefalite de Saint Louis virus* (SLEV). O primeiro é causador de febre hemorrágica grave, e no Brasil ocasionou grandes epidemias que foram combatidas após ampla cobertura vacinal (BENCHIMOL, 1994; MONATH, 2008). Entretanto, no final do ano de 2016, reemergiu no estado de Minas Gerais após longo período de quiescência, ocasionando várias mortes (DYER, 2017; ORTIZ-MARTÍNEZ et al., 2017; MIR et al., 2017). O SLEV é conhecido por causar encefalite em equinos, pequenos mamíferos e aves e até o momento, casos isolados foram detectados em humanos, embora alguns estudos tenham mostrado evidências sorológicas de sua circulação em várias regiões brasileiras (MONDINI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2009).

O ciclo de transmissão dos arbovírus pode ocorrer de forma enzoótica (entre animais silvestres e vetores artrópodes) ou epizoótica (entre vetores, humanos e animais domésticos, que servem como amplificadores de transmissão) (**Figura 1**) (WEAVER e BARRET, 2004; COFFEY et al., 2014; CONWAY et al., 2014). A manutenção do ciclo entre vetores e seres humanos aconteceu como consequência da adaptação vetorial ao meio urbano, sendo este ciclo o responsável por causar

grandes surtos e epidemias (WEAVER e BARRET, 2004; CLETON et al., 2012). De modo geral, o ciclo se inicia quando um vetor artrópode se alimenta de um hospedeiro vertebrado em estado virêmico. Durante o período de incubação, o vírus se multiplica no inseto até atingir as glândulas salivares, onde será excretado durante o repasto sanguíneo, infectando assim um novo hospedeiro susceptível (KUNO e CHANG, 2005; CONWAY et al., 2014; LIANG et al., 2015).

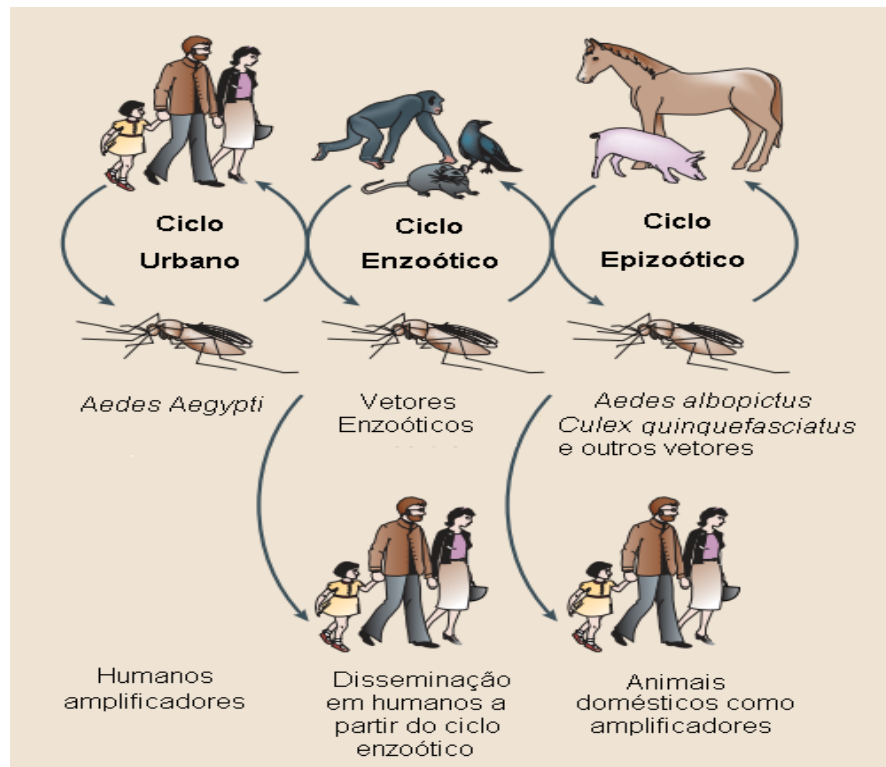


Figura 1. Representação dos ciclos de transmissão dos arbovírus (Fonte: WEAVER e BARRET, 2004 - Adaptado).

As infecções arbovídicas podem ocorrer de forma assintomática, tornando-se um problema durante as doações de órgãos ou tecidos (PETERSEN et al., 2010). No entanto a grande maioria dos casos apresenta manifestações clínicas com características inespecíficas, muitas vezes semelhante a uma síndrome gripal. Os sintomas mais comuns são febre, cefaleia, mal, estar, náuseas, vômitos, mialgias, dentre outros, tornando difícil sua identificação imediata e diferenciação de outras patologias (MOHAN et al., 2010; RAJAPAKSE et al., 2010). Em alguns casos podem acometer o sistema nervoso (causando encefalite e outras manifestações neurológicas com graves sequelas) ou causar febre hemorrágica, podendo levar o indivíduo a óbito (GUBLER, 2001; RUST, 2012).

Até o momento, não existe nenhum medicamento antiviral específico para o tratamento de pacientes infectados. Os cuidados como repouso, hidratação intensa, uso de analgésicos e antipiréticos (para redução da febre e das dores) são apenas paliativos para o alívio dos sintomas (RUST, 2015). A prevenção geralmente é realizada através do controle dos vetores em áreas urbanas, uso de repelentes, implementação de campanhas de educação em áreas endêmicas e vacinação (quando disponível) (WEAVER, 2013; LIANG et al., 2015). Outra estratégia importante consiste na constante capacitação de profissionais para a correta identificação e diferenciação das manifestações ocasionadas por arboviroses de outras doenças comuns (WEAVER, 2014).

2.2 *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* compreende os gêneros *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Flavivirus*, sendo este último o único transmitido por arbovírus (MURPHY, 1995; ZHANG et al., 2003). O gênero *Flavivirus* é um dos mais estudados, pois engloba mais de 70 espécies virais que estão amplamente distribuídas em todo o mundo, principalmente em países de clima tropical e subtropical (HUANG et al., 2013). Grande parte dos vírus deste gênero apresentam importância médica, pois são capazes de causar doenças em animais e seres humanos (BLITVICH et al., 2015). Os principais representantes deste gênero associados ao acometimento humano incluem o *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Encefalite de Saint Louis virus* (SLEV) e o *West Nile virus* (WNV) (GOULD e SOLOMON, 2008; DAEP et al., 2014).

Os *Flavivirus* são vírus pequenos e esféricos, que medem aproximadamente 40-60 nm de diâmetro (CHAMBERS et al., 1990; FERREIRA et al., 2010). Estruturalmente, os vírions apresentam o genoma inserido em um capsídeo proteico de simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico recoberto por proteínas de membrana e de envelope (CHAMBERS et al., 1990; WEAVER et al., 2012).

O genoma é constituído por uma fita simples de RNA senso positivo, com aproximadamente 11 Kilobases (kb) de comprimento (PRESTI et al., 2014). Apresenta apenas uma fase de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), flanqueada por duas regiões não traduzidas (*untranslated region* – UTR) presentes na extremidade 5' e 3', respectivamente (LINDENBACH e RICE, 2003). A ORF codifica uma única poliproteína precursora, que sofre sucessivas clivagens por

proteases virais e do hospedeiro, resultando em proteínas estruturais e não estruturais (**Figura 2**) (PIERSON e DIAMOND, 2012; BECK et al., 2013).

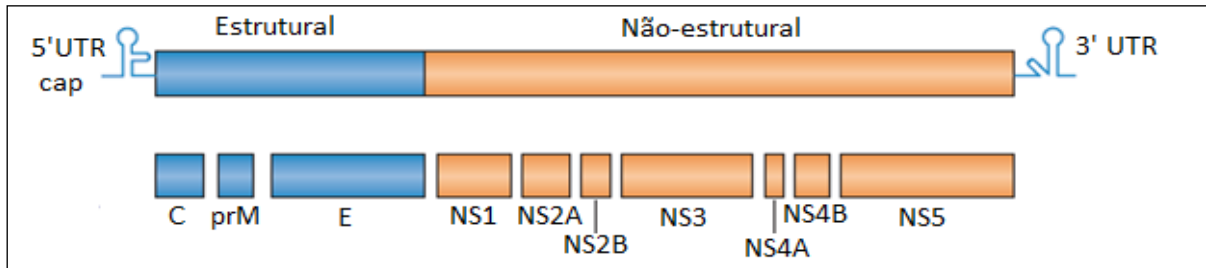


Figura 2. Organização do genoma do *Flavivirus* e suas proteínas Estruturais e Não Estruturais resultantes (Fonte: BECK et al., 2013 - Adaptado).

As proteínas estruturais são denominadas Capsídeo (C), Precursora de Membrana ou de Membrana (prM/M) e Envelope (E), e estão envolvidas nos processos de fusão, maturação, montagem e brotamento viral (MUKHOPADHYAY et al., 2005; HEINZ e STIASNY, 2012). Já as proteínas não estruturais (NS) são denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, estando envolvidas principalmente na regulação da replicação, virulência e patogenicidade (**Figura 2**) (PIERSON e DIAMON, 2012). As principais funções destas proteínas estão descritas resumidamente na **Tabela 1**.

Tabela 1. Principais funções das proteínas Estruturais e Não-Estruturais do genoma dos *Flavivirus*.

Proteína	Funções
C	Envolvida no transporte da proteína prM ao retículo endoplasmático para ser glicosilada (PIERSON e DIAMON, 2012).
prM/M	Funciona como uma chaperona e impede a reorganização e autofusão prematura de proteínas E durante a maturação dos vírions (KUHN et al., 2002; ZHANG et al., 2003).
E	Responsável pela ligação do vírus ao receptor celular, fusão com a membrana e montagem dos vírions (CHAMBERS et al., 1990). Além disto, atua como um antígeno, pois interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro estimulando a produção de anticorpos neutralizantes (PIERSON e DIAMON, 2012). No entanto, possui a mais alta taxa de mutação entre os <i>Flavivirus</i> (LAI et al., 2008).
NS1	Pode estar presente na superfície celular (modulando vias de ativação do complemento) interagindo com proteínas do hospedeiro produzindo forte imunogenicidade (AVIRUTNAN et al, 2010; SCHLESINGER et al, 1987; SCATURRO et al., 2015). Participa de processos envolvidos na replicação viral (LAI et al., 2008; PIERSON e DIAMON, 2012).
NS2A e NS2B	NS2A está relacionada ao processamento da NS1 e NS2B está envolvida na ativação da função serina protease da NS3 (LINDENBACH et al., 2007)
NS3	Envolvida na replicação e clivagem pós-traducional da poliproteína. A porção N-terminal apresenta atividade de serina protease na clivagem da poliproteína,

	enquanto a porção C-terminal possui atividade de nucleotídeo trifosfatase (NTPase), RNA trifosfatase (RTPase) e de helicase (CHAMBERS <i>et al.</i> , 1990;)
<i>NS4A e NS4B</i>	Estão associadas aos complexos de replicação, funcionando como co-fatores (LINDENBACH <i>et al.</i> , 2007).
<i>NS5</i>	Possui atividade de metiltransferase e RNA polimerase RNA dependente (RpRd), necessária para iniciar a replicação (EGLOFF <i>et al.</i> , 2003; LINDENBACH e RICE, 2003). É a maior e mais conservada entre os <i>Flavivirus</i> (BOLLATI <i>et al.</i> , 2010; LUO, 2015).

2.2.1 *Dengue virus*

A Dengue é uma doença global, de caráter emergente, cujo agente etiológico é denominado *Dengue virus*. Este vírus apresenta quatro sorotipos distintos (DENV1-4) que são transmitidos por mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes* (em especial o *Aedes aegypti*) (GUBLER, 1998). A ampla distribuição do vetor favoreceu a disseminação e co-circulação destes sorotipos em uma mesma área geográfica, tendo como consequência o aumento da frequência de surtos e epidemias em regiões não endêmicas bem como o surgimento de formas graves da doença, tornando esta enfermidade um problema de saúde pública mundial (KYLE e HARRIS, 2008; MESSINA *et al.*, 2014).

2.2.1.1 Diversidade Genética

Conforme comentado anteriormente, DENV apresenta quatro sorotipos que estão antigenicamente relacionados (compartilham epítomos antigênicos que apresentam uma similaridade de 60-75% em nível de aminoácido), porém, geneticamente distintos (TWIDDY *et al.*, 2003; GUZMAN & HARRIS, 2015). Cada sorotipo é subdividido em genótipos (que variam cerca de 3% ao nível de aminoácidos e 6% ao nível de nucleotídeos) e linhagens (RICO-HESSE, 2003; WEAVER e VASILAKIS, 2009).

Os genótipos são estudados com base em regiões dos genes que codificam as proteínas M, E, NS1 e as linhagens são identificadas de acordo com a localização geográfica em que estes virus foram inicialmente isoladas (WEAVER e VASILAKIS, 2009). Atualmente são conhecidos cinco genótipos para o DENV-1 (RICO-HESSE, 1990), seis genótipos para o DENV-2 (LEWIS *et al.*, 1993; AÑEZ *et al.*, 2011), cinco para DENV-3 (LANCIOTTI *et al.*, 1994; GUZMAN & KOURI, 2002; FARES *et al.*, 2015) e quatro genótipos para o DENV-4 (CHUNGUE, *et al.* 1995; LANCIOTTI, *et al.* 1997; RICO-HESSE, 2003).

Alguns estudos têm demonstrado a associação de determinados genótipos com a gravidade das manifestações clínicas (VAUNGHN et al., 2000; KYLE e HARRIS, 2008; WEAVER e VASILAKIS, 2009). O genótipo Asiático do DENV-2 é o mais associado ao risco no desenvolvimento de manifestações hemorrágicas (RICO-HESSE et al., 1997; LEITMEYER et al., 1999; GUZMAN et al., 2002; BALMASEDA et al., 2006). Entretanto, os genótipos III de DENV-3 e o I do DENV-4 também tem sido relatados como virulentos, pois também estão relacionados à casos de Dengue Hemorrágica (NISALAK et al., 2003; PATIL et al., 2012). Um estudo realizado em animais infectados com DENV-3 mostrou que o genótipo I apresentou maior capacidade em causar doença neuroinvasiva quando comparado com o genótipo III, que evoluiu de forma assintomática (FERREIRA et al., 2010).

2.2.1.2 Epidemiologia

Nos últimos 70 anos, este arbovírus tem emergido gradativamente em quase todos os continentes, tornando-se endêmico em mais de 100 países do Sudeste Asiático, África, Pacífico Ocidental, Oriente Médio, Europa e Américas (WHO, 2009; DEEP et al., 2014; GUZMAN e HARRIS, 2015). Dados da literatura mostram que aproximadamente 390 milhões de infecções ocorram anualmente em todo o mundo, sendo que a maioria dos casos são assintomáticos (BHATT et al., 2013). Estes números podem ser ainda maiores, pois estima-se que sua incidência tenha aumentado 30 vezes nas últimas décadas (BHATT et al., 2013). Aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas residem em regiões endêmicas e estão susceptíveis a adquirir esta doença em diferentes momentos da vida, pois a infecção por um sorotipo não confere imunidade aos demais sorotipos (GUBLER, 2002; MESSINA et al., 2014; GUZMAN e HARRIS, 2015).

Nas Américas, DENV reemergiu na década de 70, após a descontinuação de um programa de controle vetorial implantado em 1947, que conseguiu combater o mosquito *Aedes aegypti* por 33 anos (DICK et al., 2012). Grande parte das epidemias ocorreram em regiões do Caribe e da América Latina, que tornaram-se endêmicas devido à co-circulação dos quatro sorotipos e do vetor (DICK et al., 2012; MARTIN et al., 2010; CAFERATTA et al., 2013).

No Brasil, esta doença só foi cientificamente registrada no ano de 1981 quando uma grande epidemia ocorreu em Boa Vista, estado de Roraima, ocasião em que também foi verificada a presença dos sorotipos DENV-1 e DENV-4

(OSANAI, 1983). Subsequentemente entre os anos de 1990 e 2000, os sorotipos DENV-2 e DENV-3 foram, respectivamente, identificados no Rio de Janeiro, e de 2010 à 2016 vários surtos e epidemias ocorreram devido a circulação simultânea dos quatro sorotipos em diferentes regiões do país (FIGUEIREDO, 2003; NOGUEIRA et al., 2007; CÂMARA et al., 2007; FARES et al., 2015; ROMANO et al., 2010; GARCÊS, 2016).

Nesse cenário de grandes epidemias, vale destacar que a região Nordeste do país tem sido acometida por esta doença desde a década de 90 (NOGUEIRA et al., 2007). Esta situação ganhou destaque no ano de 1994, quando um surto de Febre Hemorrágica ocorreu no estado do Ceará, ocasião em que foi identificada a co-circulação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (VASCONCELOS et al., 1995; CUNHA et al., 1998).

No Piauí, DENV-2 foi o responsável pela primeira epidemia do Estado, que ocorreu no ano de 1996, na cidade de Teresina (CASTRO et al., 2003). Pouco tempo depois, entre os anos de 2000 e 2001, foi confirmada a presença de DENV-1 e DENV-3, respectivamente neste município (CASTRO et al., 2003; MONTEIRO et al., 2009). Entre os anos de 2011 e 2013, foi identificada a circulação de DENV-4 no estado (SIQUEIRA JR, et al. 2011; SANTOS, 2013). Análises moleculares subsequentes, realizadas durante os anos de 2013 à 2015 refletem uma situação de hiperendemicidade no estado, pois mostraram a co-circulação dos quatro sorotipos a partir de amostras provenientes de vários municípios piauienses (VALE, 2015; GARCÊS, 2016).

2.2.1.3 Ciclos de Transmissão

Os principais vetores do DENV são mosquitos do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, que se adaptou ao meio urbano e a ambientes intradomiciliares (KRAEMER et al., 2015). As fêmeas desta espécie podem transmitir o vírus (via transovariana) para sua prole, o que contribui para a disseminação da doença (KHIN e THAN., 1983; JHOSI et al., 2002; WEAVER e VASILAKIS, 2009). DENV apresenta dois ciclos de transmissão: um silvestre (enzoótico) e outro urbano (epidêmico) (KYLE e HARRIS, 2008; WEAVER e VASILAKIS, 2013). Este último é o mais importante e comum, pois o vírus circula de forma constante entre humanos (hospedeiro amplificador) e o mosquito (DEEP et al., 2014; GUZMAN et al., 2016).

2.2.1.4 Patogênese e Aspectos Clínicos

Durante o repasto sanguíneo do mosquito (fêmea) infectado, o DENV é inoculado na derme e atinge o tecido conjuntivo, infectando as principais células presente neste local (células dendríticas, macrófagos, monócitos e polimorfonucleares) (JOHN et al., 2013). Estas migram para os linfonodos (para apresentar os antígenos do vírus ao sistema imunológico) onde o vírus infecta e se multiplica em novas células, que atingem a circulação sanguínea e se propagam para diferentes tecidos, atingindo os principais órgãos-alvo (fígado, tecidos musculares, articulações e cérebro) (MARTINA et al., 2009; JOHN et al., 2013).

O período de incubação do vírus em humanos geralmente é de 2 a 7 dias e coincide com a fase virêmica, que pode variar de 4 a 5 dias, coincidindo com o período de febre (FIGUEIREDO, 1998; GUZMAN e HARRIS, 2015). Durante este período, ocorre a produção de anticorpos de fase aguda da classe de Imunoglobulinas (Ig) M (geralmente entre o quarto e sétimo dia) (FIGUEIREDO, 1997; PEELING et al., 2010). Entre o 8º e 10º dia de infecção já é possível detectar anticorpos de memória da classe IgG em baixos níveis que se elevam gradualmente, conferindo imunidade ao sorotipo infectante por toda a vida (PEELING et al., 2010; GUZMAN e HARRIS, 2015).

As infecções causadas pelo DENV exibem uma gama de manifestações clínicas com características inespecíficas, podendo apresentar-se de forma assintomática ou sintomática. Os principais sintomas são mostrados na **Figura 3**. É importante destacar que infecções secundárias por outro sorotipo podem ser agravadas em um fenômeno denominado Resposta Exacerbada Dependente de Anticorpo (do inglês, *Antibody Dependent Enhancement* - ADE), na qual anticorpos produzidos na infecção primária podem facilitar a entrada do vírus nas células de defesa, potencializando a viremia e a resposta inflamatória (HALSTEAD, 2007; WHITEHORN e SIMMONS, 2011). Entretanto, outro fenômeno associado a doença severa é referido como “Pecado Antigênico Original”. Segundo esta teoria, células T de memória produzidas durante uma infecção primária são mais eficientemente ativadas que as produzidas em uma infecção secundária pelo DENV. Tais células ativadas teriam baixa afinidade pelo sorotipo da segunda infecção, gerando uma resposta imune alterada e não eficiente, resultando na exacerbação da produção de

citocinas pro-inflamatórias e consequente aumento da permeabilidade vascular (MONGKOLSAPAYA et al., 2003; MARTINA et al., 2009; RIVINO e LIM, 2017).

De acordo com a antiga categorização definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a dengue era classificada em: Febre da Dengue (FD) e Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), sendo que esta última poderia ou não ser acompanhada da Síndrome do Choque de Dengue (FHD/SCD). Entretanto, em 2009, uma nova classificação foi proposta pela OMS, que categorizou as infecções sintomáticas de acordo com os níveis de gravidade em: Dengue Sem Sinais de Alarme (DSSA), Dengue Com Sinais de Alarme (DCSA) - dor abdominal, vômitos, acúmulo de líquidos, sangramento de mucosas, letargia, aumento do hematócrito com plaquetopenia - e Dengue Grave ou Severa (DS), caracterizada por extravasamento plasmático, sangramento grave ou falência de órgãos (WHO, 2009).

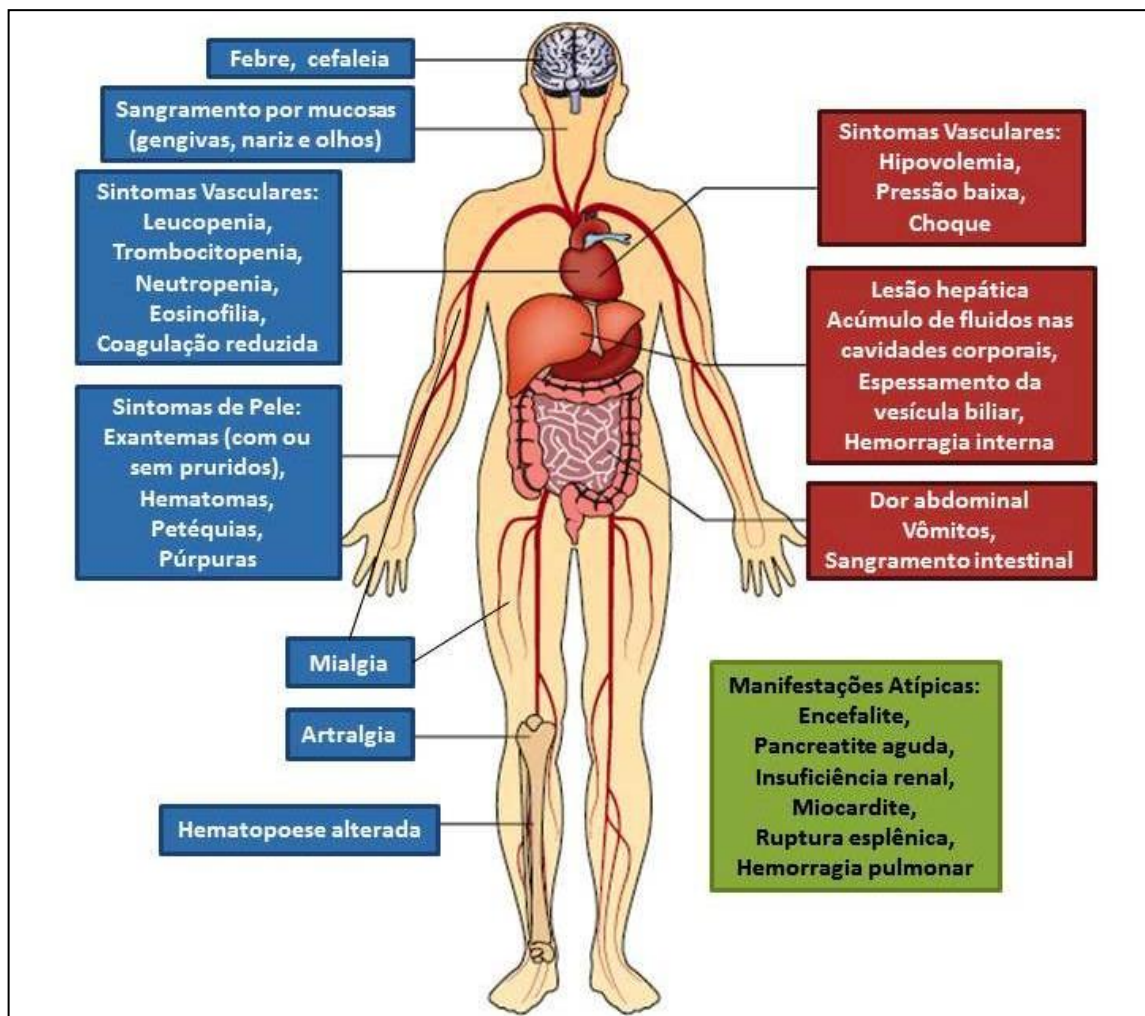


Figura 3. Principais manifestações clínicas da dengue. De acordo com a classificação antiga proposta pela OMS (1997), as caixas azuis representam as manifestações clássicas da FD, as caixas vermelhas representam as manifestações da FHD, e as caixas verdes representam complicações raras. (Fonte: JOHN et al, 2013 – Adaptado).

2.3 *Alfavirus*

O gênero *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae* (STRAUSS e STRAUSS, 1994; CLETON et al., 2012), sendo composto por mais de 30 espécies de vírus agrupadas em 8 complexos baseados nas similaridades genéticas e ou antigênicas (FORRESTER et al., 2012, POWERS et al., 2001, WEAVER et al., 2012, GOULD et al., 2010, ATKINS, 2013). No entanto, também podem ser categorizados em dois grandes grupos de acordo com a distribuição geográfica e sintomatologia clínica apresentada: alfavirose do velho mundo e do novo mundo.

Os alfavirus do velho mundo encontram-se inclusive nos complexos Floresta Barmah, Ndumu, Middelburg, Floresta Semliki (SOLIGNAT et al., 2009), estando associados à sintomas artríticos acompanhados de febre e *rash* cutâneo (GARMASHOVA et al., 2007; JOSE et al., 2009; ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013). O complexo da Floresta de Semliki que inclui os vírus O'nyong-nyong, Ross River, Mayaro e Chikungunya vem se destacando por estar relacionado ao acometimento de grandes epidemias em diferentes regiões do mundo (PARDIGON, 2009). Já os alfavirus do novo mundo compreendem os complexos: Trocara, Encefalite Equina Venezuelana (VEE), Encefalite Equina Ocidental (WEE) e Encefalite Equina Oriental (EEE), e que geralmente causam epidemias em cavalos, mas também podem infectar seres humanos, causando encefalite com graves consequências (POWERS et al., 2001; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; ZACKS e PAESSLER, 2010; NASAR et al., 2012).

Os alfavirus são vírus pequenos e esféricos, que medem aproximadamente 65-70 nm de diâmetro (STRAUSS e STRAUSS., 1994; GAROFF et al., 2004; JOSE et al., 2009). Possuem um envelope lipídico que projeta 80 partículas proteicas, na qual são agrupadas em trímeros compostos por heterodímeros de glicoproteínas E1 e E2, formando uma estrutura quaternária (CHENG et al., 1995). O capsídeo exibe uma simetria icosaédrica, sendo composto por 240 monômeros de proteínas do capsídeo, servindo também como sítio de ancoragem para as proteínas do envelope (STRAUSS e STRAUSS., 1994; WEAVER et al., 2012).

Seu genoma é constituído por uma fita simples de RNA senso positivo, com aproximadamente 12 kb de comprimento. A extremidade 5' está limitada com uma 7-metilguanossina enquanto a extremidade 3' é poliadenilada (STRAUSS e STRAUSS., 1994, PRESTI et al., 2014). Apresenta também uma matriz com duas fases de

leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que codificam poliproteínas não estruturais e estruturais (STRAUSS e STRAUSS., 1994; WEAVER et al., 2012).

Dependendo do vírus, a ORF não estrutural pode codificar uma ou duas poliproteínas precursoras, a *nsP123* e/ou a *nsP1234*, necessárias para formação do complexo de replicação viral (STRAUSS e STRAUSS., 1994, ZHANG et al., 2009, RUPP et al., 2015). Estas poliproteínas são clivadas por proteases virais ou do hospedeiro em quatro proteínas não estruturais denominadas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (**Figura 4**) (KHAN et al., 2002; LEUNG et al., 2011; FIGUEIREDO e FIGUEIREDO, 2014). Estas proteínas desempenham um importante papel na transcrição e replicação do RNA viral e em conjunto formam o complexo de replicação viral (SOLIGNAT et al., 2009). As principais funções conhecidas estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Principais funções das proteínas Não Estruturais e Estruturais do genoma dos *Alfavírus*.

Proteína	Funções
<i>nsP1</i>	Atividade enzimática metiltransferase e guaniltransferase, necessária para o encapsamento do RNA viral (RUPP et al., 2015; KUMAR et al., 2015; DELANG, 2016). Pode associar-se com proteínas de membrana e ancorar complexos de replicação na membrana celular (PERANEN et al., 1995; FROLOVA et al., 2010)
<i>nsP2</i>	Atividade enzimática, exibindo 3 domínios com diferentes funções. O domínio N-terminal possui atividade de RNA helicase, GTPase e ATPase e RNA 5'-trifosfatase (GOMEZ de CEDRON et al., 1999; RIKKONEN, 1994; VASILJEVA et al., 2003). O domínio C-terminal possui atividade protease, atua na clivagem das poliproteínas não estruturais (STRAUSS e STRAUSS., 1994; VASILJEVA et al. 2003; RUSSO et al., 2006). Um terceiro domínio enzimaticamente inativo, possui atividade semelhante à metiltransferase (MTase) (RUSSO et al., 2006).
<i>nsP3</i>	Necessária para a síntese de RNA (RUPP et al., 2015). Possui uma região N-terminal (macrodomínio). O domínio carboxi-terminal pode estar relacionado à virulência dos alfavírus (TUITTILA et al., 2000; SUTHAR et al., 2005).
<i>nsP4</i>	Atividade RNA polimerase dependente de RNA (RUBACH et al., 2009) que auxilia na replicação do RNA genômico e na transcrição do RNAm subgenômico 26S (SAWICKI et al., 1981; STRAUSS e STRAUSS., 1994; TOMAR et al., 2006). Também pode inibir algumas vias antivirais do hospedeiro (RATHORE et al., 2013).
<i>PC</i>	Formação do nucleocapsídeo icosaédrico que envolve o genoma viral (WEISS et al., 1989; STRAUS, 1994; GAROFF et al., 2004, JOSE et al., 2009, LEUNG et al., 2011; RUIZ-GUILLEN et al., 2016).
<i>E3</i>	Necessária para a montagem eficiente das partículas virais (LOBIGS e GAROFF, 1990; JOSÉ et al., 2009). Atua também como uma sequência sinal para a inserção e processamento da poliproteína estrutural no retículo endoplasmático (LOBIGS e GAROFF, 1990).
<i>E2</i>	Liga-se ao receptor da célula hospedeira e sofre endocitose (KUHN, 2007; JOSE et al., 2009). Durante a evolução viral, esta proteína tornou-se a responsável pela diversidade de estirpes virais entre os alfavírus, pois interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro (atuando como um antígeno) estimulando a produção de anticorpos neutralizantes essenciais para indução da resposta imune (BELL et al.,

	1984; KHAN et al., 2014; VOSS et al., 2010). Mutações nesta proteína podem ter efeitos na entrada do vírus na célula do hospedeiro bem como na montagem e maturação das espículas virais (Q. ASHTON ACTON, 2012).
6k	Relacionada à montagem de partículas virais, pois normalmente é incorporada durante o brotamento viral (LUSA et al., 1991; LOEWY et al., 1995; SANZ et al., 2003). Mutações nesta proteína podem reduzir a capacidade de infecção viral (GAEDIGK-NITSCHKO et al., 1990; LILJESTRÖM et al., 1990; SANZ e CARRASCO, 2001; McINERNEY et al., 2004; JOSÉ et al., 2009)
E1	Localiza-se abaixo da proteína E2 (BELL et al., 1984, WEAVER et al., 2012; COFFEY et al., 2013). Promove a fusão entre as membranas de células virais e do hospedeiro (STRAUSS e STRAUSS., 1994). Mutações nesta proteína podem facilitar ou inibir a entrada viral na célula, aumentando a virulência em algumas espécies virais (MUKHOPADHYAY et al., 2006; LIU e KIELIAN, 2009).

A ORF estrutural codifica uma poliproteína precursora (sintetizada a partir de um terço do genoma) que é processada e clivada em cinco proteínas estruturais denominadas: proteína do capsídeo (PC) e proteínas E3, E2, E1 e 6K (GAROFF et al., 1974; STRAUSS e STRAUSS., 1994; CHENG et al., 1995; JOSE et al., 2009, NASAR et al., 2012) (**Figura 4**). Estas proteínas são responsáveis pela montagem de novas partículas virais e infecção de novas células (STRAUSS e STRAUSS, 1994). As principais funções conhecidas estão descritas na **Tabela 2**.

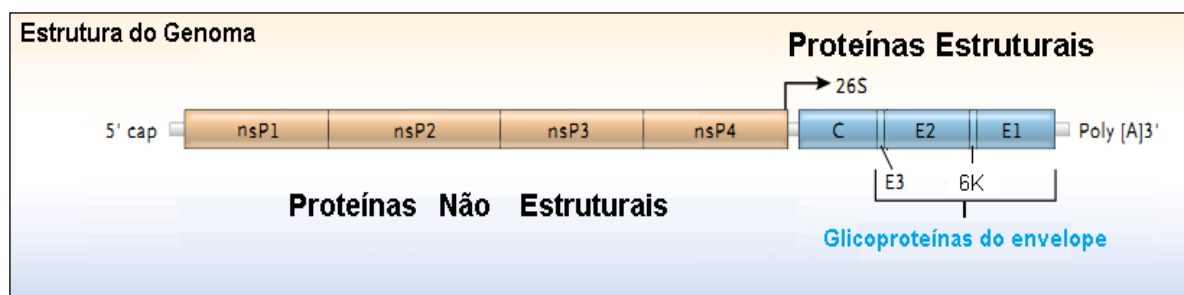


Figura 4. Organização do genoma dos Alfavírus e suas proteínas Não Estruturais e Estruturais resultantes. (Fonte: WEAVER e LECUIT, 2015 - Adaptado).

A replicação do genoma viral na célula hospedeira ocorre através da endocitose mediada pela interação entre receptores. O ambiente endossomal que apresenta pH ácido, desencadeia um rearranjo conformacional das glicoproteínas E1 e E2 que recobrem a superfície do vírion (BRÉHIN et al., 2003, WEAVER et al., 2012). Em seguida, E1 expõe um peptídeo hidrofóbico que se insere na membrana endossomal, estimulando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (GAROFF et al., 2004; KIELIAN et al., 2010, LI et al., 2010). Após esta etapa, o nucleocapsídeo

se desintegra liberando o genoma, que se ligará aos ribossomos como RNAm, dando início ao processo de tradução de proteínas (JOSE et al., 2009; LEUNG et al., 2011). Estas, por sua vez, formarão uma fita de RNA senso negativo que servirá como molde para posterior transcrição do RNA senso positivo, sendo este processo finalizado com a montagem de novas partículas virais (GAROFF et al., 2004; JOSE et al., 2009; RUPP et al., 2015).

2.3.1 *Chikungunya virus*

O CHIKV é um arbovírus zoonótico, com ampla distribuição mundial e que tem causado grande preocupação, principalmente pelas debilitantes e duradouras manifestações clínicas que deixam os pacientes impossibilitados de executarem suas atividades diárias e pelos altos custos com tratamento (KAM et al., 2009; CHIA et al., 2010; MOHAN et al., 2010; THIMBERVILLE et al., 2013; DONALÍSIO e FREITAS, 2015; KRUTIKOV e MANSON, 2016). Na língua Makonde, o nome Chikungunya significa “aquele que se curva ou se inclina”, em decorrência da postura adquirida por pacientes que relatavam artralguas intensas quando infectados pelo vírus (ROBINSON, 1955; PETTERSEN, 2015). Tem sido o responsável por causar grandes surtos e epidemias, principalmente em países de clima tropical e subdesenvolvidos, ocasionando sérios impactos econômicos devido à redução da produtividade, representando assim um problema emergente dentro do cenário de saúde pública atual (HONÓRIO et al., 2015).

2.3.1.1 Diversidade Genética

CHIKV apresenta um único sorotipo que confere imunidade protetora ao longo da vida dos indivíduos recuperados (SAHADEO et al., 2015). Estudos de análise filogenética baseados nas características geográficas, genótípicas e antigênicas mostram que atualmente existem 3 genótipos e 1 linhagem conhecida, que foram denominados de acordo com o primeiro local de isolamento: genótipo Ocidental ou do Oeste Africano (WAf), genótipo Oriental ou do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), genótipo Asiático e a Linhagem do Oceano Índico (IOL) (ARANKALLE et al., 2007; POWERS e LOGUE, 2007; TSETSARKIN et al., 2007; SUDEEP e PARASHAR, 2008; CHOMPOOSRI et al., 2016).

Os genótipos WAf e ECSA tiveram origem na África, evoluíram de um mesmo ancestral selvagem e divergiram há aproximadamente 350 anos atrás,

sendo esta última a mais prevalente em diversas regiões da Europa, África, Oceano Índico e Sul da Ásia (BURT et al., 2012; COFFEY et al., 2013). A disseminação do genótipo ECSA foi mantida na África como consequência da manutenção de um ciclo de transmissão enzoótico entre primatas não humanos e mosquitos selvagens do gênero *Aedes*. Análises filogenéticas mais recentes mostraram que o genótipo Asiático evoluiu a partir da Linhagem Africana Oriental entre os anos de 1920 e 1950, encontrando-se amplamente distribuída em quase todos os continentes (POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010; TSETSARKIN e WEAVER, 2011).

A linhagem do Oceano Índico (IOL) é derivada da ECSA (PAROLA et al., 2006; POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010), e foi primeiramente relatada entre os anos de 2005-2006, quando causou epidemias nas ilhas do Oceano Índico na Índia (SCHUFFENECKER et al., 2006). Em seguida, esta linhagem se espalhou para diversas regiões do Hemisfério Oriental, causando surtos em mais de 60 países (REZZA et al., 2007; KUMAR et al., 2008, PULMANAUSAHAKUL et al., 2011). A **Figura 5** ilustra a disseminação das linhagens virais de CHIKV entre os continentes.

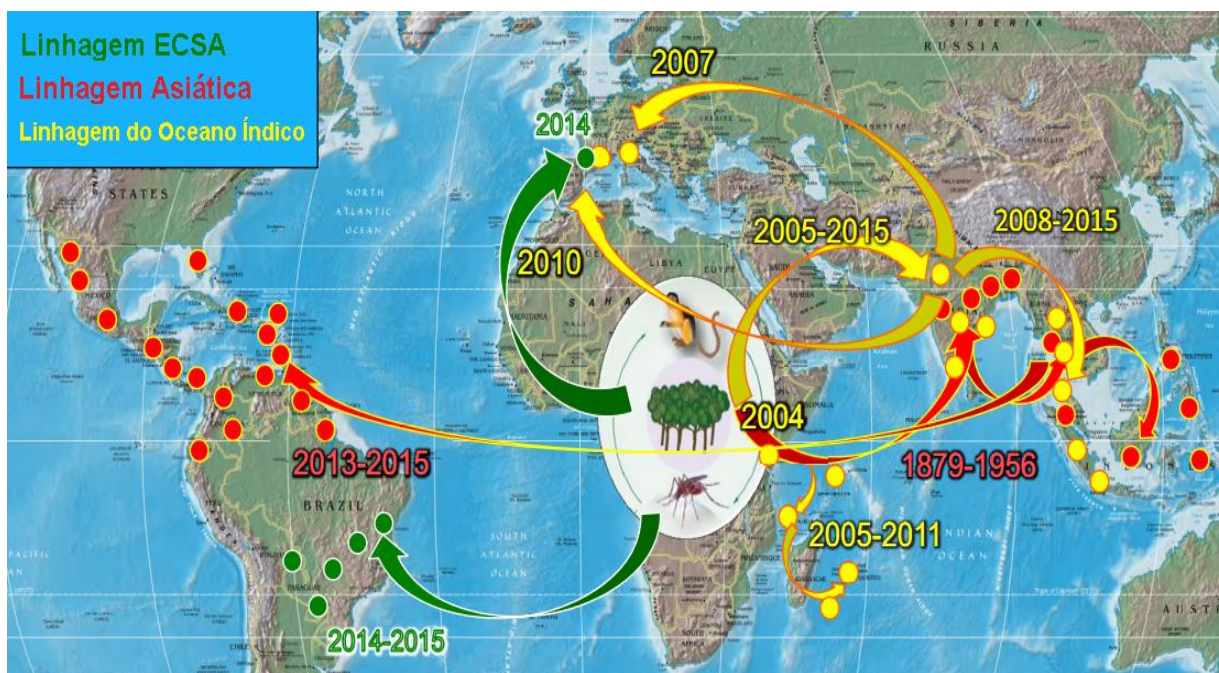


Figura 5. Mapa mostrando a propagação histórica do CHIKV para a Ásia, Europa e Américas a partir do ciclo enzoótico na África (TSETSARKIN et al., 2016 - Adaptado).

A intensa disseminação ocorreu em virtude de uma mutação pontual na posição 226 do gene que codifica a glicoproteína E1, onde houve a substituição do aminoácido alanina por uma valina (E1-A226V) (TSETSARKIN et al., 2007; LO PRESTI et al., 2016) que favoreceu a infectividade, capacidade de transmissão e

disseminação do vírus por mosquitos *A. albopictus* (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN e WEAVER, 2011; COFFEY et al., 2013; THIBERVILLE et al., 2013). Estudos apontam que esta linhagem pode ser mais virulenta, uma vez que foram observadas manifestações clínicas atípicas tais como envolvimento neurológico, doença em neonatos e óbitos durante uma epidemia nas Ilhas da Reunião, localizada no Oceano Índico (BORGHERINI et al., 2007; LEMANT et al., 2008; ECONOMOPOULOU et al., 2009).

2.3.1.2 Epidemiologia

Os primeiros surtos urbanos da Febre do Chikungunya foram reportados na Ásia (em Bangkok, na Tailândia), no ano de 1960 (NIMMANNITYA, 1969; STAPLES et al., 2009) e na Índia (nas cidades de Calcutá e Vellore) entre 1963 e 1973 (SHAH et al., 1964; CAREY et al., 1969; HALSTEAD, 2015). Posteriormente, pequenos surtos ocorreram periodicamente nos 30 anos seguintes até 2004, quando uma grande epidemia começou na costa do Quênia (SERGON et al., 2008). Desde então, o CHIKV se dispersou por numerosas ilhas do Oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático (NJENGA, 2008; SERGON et al., 2007; RAVI, 2006; PULMANAUSAHAKUL et al., 2011) e mais recentemente na Europa e nas Américas (REZZA, 2007; QUEYRIAUX, 2008a; CAUCHEMEZ et al., 2014; NASCI, 2014; HALSTEAD, 2015; AMRAOUI e FAILLOUX, 2016).

Estima-se que até o ano de 2015, aproximadamente 94 países tenham sido acometidos por esta doença (NSOEISIE, 2016), com milhões de casos registrados em todo o mundo (JOHANSSON, 2015). Este número pode ser ainda maior em virtude da grande quantidade de indivíduos assintomáticos e pela grande subnotificação de casos, tendendo a aumentar principalmente em países endêmicos e subdesenvolvidos (STAPLES et al., 2009). Outro fator importante é que a ampla distribuição de mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, na maioria dos países endêmicos, tem facilitado a dispersão desta doença (CHARREL et al., 2007; COFFEY et al., 2014).

A introdução do genótipo asiático de CHIKV (LANCIOTTI e VALADERE, 2014) no continente americano foi relatada no final ano de 2013, quando ocorreu um surto na Ilha de Saint Martin, no Caribe (NOËL e RIZZO, 2013; GAY et al., 2016). No ano seguinte, várias ilhas e territórios vizinhos relataram surtos que se iniciaram a partir de casos autóctones (LEPARK-GOFFART et al., 2014; JOHANSSON, 2015).

Desde então, sua disseminação pelas Américas tornou-se inevitável (NASCI, 2014). Acredita-se que o grande fluxo de viajantes entre países endêmicos e não endêmicos associada à ampla distribuição de mosquitos vetores nestas regiões tenha facilitado a dispersão deste vírus (CAUCHEMEZ et al., 2014; NASCI, 2014; TSETSARKIN et al., 2016).

Ainda no ano de 2014, este vírus foi introduzido no Brasil, embora casos importados de viajantes provenientes da Indonésia e Índia já fossem relatados desde 2010 (ALBUQUERQUE et al., 2012; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2014). O primeiro caso autóctone foi relatado em setembro de 2014, na região Norte, no município de Oiapoque, estado do Amapá. Esta região foi alvo de um grande surto, ocasião em que foi verificada a presença do genótipo asiático (NUNES et al., 2015). No mesmo período, ocorreu um surto na região Nordeste, em Feira de Santana, na Bahia, quando foi identificado o genótipo do Leste-Centro-Sul Africano que ainda não havia sido detectado nas Américas (PARREIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2015; FARIA et al., 2016). Desde então, CHIKV vem causando grandes surtos em diferentes estados, sendo o Brasil considerado um dos países da América do Sul com a mais alta taxa de morbidade e letalidade (COLUCCI, 2016).

2.3.1.3 Ciclos de Transmissão

O CHIKV é transmitido vetorialmente (de forma enzoótica ou epizoótica), principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, que estão amplamente distribuídos em diversas partes do mundo (JULIANO e LOUNIBOS, 2005; CHARREL et al., 2007; HIGGS e VANLANDINGHAM, 2015). O *A. aegypti* é um mosquito presente em áreas urbanas, sendo considerado o principal vetor na transmissão viral em muitos países. No entanto, o mosquito *A. albopictus* que está normalmente presente em ambientes peri-urbanos, tem sido implicado como o vetor competente na transmissão desta doença (REITER, 2006; PRESTI et al., 2014; HIGGS e VANLANDINGHAM, 2015).

2.3.1.4 Patogênese e Aspectos Clínicos

Durante o repasto sanguíneo do mosquito infectado, o CHIKV é inoculado na derme e atinge o tecido conjuntivo, infectando as principais células presente neste local - células dendríticas, macrófagos, monócitos e polimorfonucleares (**Figura 6**) (FIGUEIREDO e FIGUEIREDO, 2014). Estas migram para os linfonodos (para

apresentar os antígenos do vírus ao sistema imunológico) onde o vírus infecta e se multiplica em novas células (RYMAN e KLIMSTRA, 2008). Neste momento, diversas citocinas são produzidas, em especial o Interferon (IFN), visando limitar a propagação do vírus (TENG et al., 2011; LUM e NG, 2015). Uma vez infectadas, estas células atingem a circulação sanguínea e se propagam para diferentes tecidos, atingindo os principais órgãos-alvo - fígado, tecidos musculares, articulações e cérebro (KAM et al., 2009; SCHWARTS e ALBERT; 2010). É relatado que o vírus possui tropismo por fibroblastos da pele, o que pode facilitar a infecção de novos mosquitos durante o repasto sanguíneo (SOURISSEAU et al., 2007).

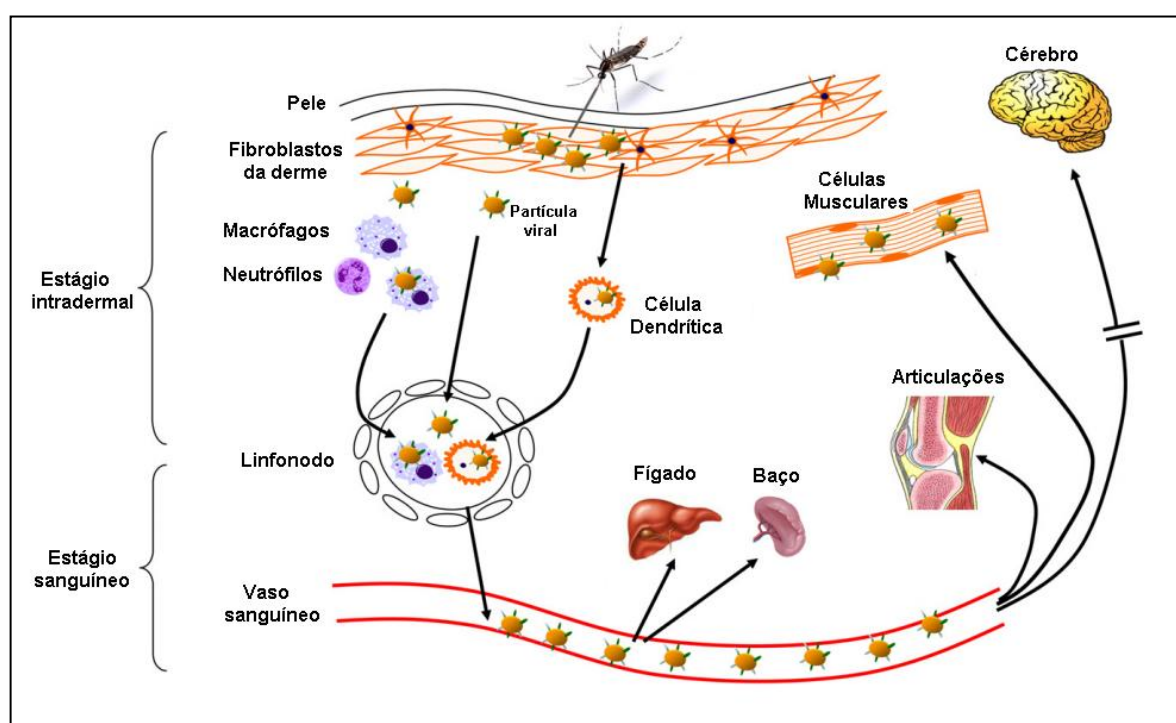


Figura 6. Representação esquemática da disseminação do CHIKV após a picada do mosquito (KAM et al., 2009 - Adaptado).

O período de incubação do vírus geralmente é de 3 a 7 dias, podendo variar de 3 a 12 dias (POWERS e LOGUE, 2007; SUDEEP e PARASHAR, 2008; MOHAN et al., 2010). Durante a fase virêmica, que pode perdurar até 10 dias após a infecção inicial, ocorre a produção de anticorpos de fase aguda da classe IgM (entre o terceiro e quinto dia), ocasião esta que coincide com o início dos sintomas (SCHWARTS e ALBERT, 2010; WEAVER e LECUIT, 2015). A partir do 8º dia de infecção já é possível detectar anticorpos de memória da classe IgG, desenvolvendo assim proteção contra reinfecção (KAM et al., 2009; GASQUE et al., 2015).

A evolução clínica desta enfermidade apresenta 3 fases: aguda (primeiras 3 semanas), subaguda (3-12 semanas) e crônica (12 semanas em diante) (RODRÍGUEZ-MORALES e ANAYA, 2016). A sintomatologia relatada na fase aguda pode variar desde uma síndrome febril inespecífica até uma febre alta (>39°C) com ou sem cefaléia, mal-estar, erupções cutâneas, exantema (com ou sem prurido), mialgias, artralgias ou poliartralgias (com ou sem edema), sendo este último o sintoma mais comumente relatado, por ser duradouro (GUBLER, 2001; CARMONA et al., 2008; QUEYRIAUX, 2008b; CLETON et al., 2012; SUHRBIER et al., 2012; ZE-ZE, 2014). Além disso, alguns indivíduos podem apresentar-se assintomáticos, podendo contribuir para infecção de novos mosquitos (BROUARD et al., 2008; NAKKHARA et al., 2008; SISSOKO et al., 2008).

A fase crônica da doença é caracterizada pela presença de artralgia intensa, (acompanhada ou não por inchaço e limitação do movimento), que pode persistir por meses ou anos, variando entre períodos assintomáticos e de recidivas (QUEYRIAUX, 2008b; STAPLES et al., 2009; SCHILTE et al., 2013). Acredita-se que isto ocorra em virtude persistência viral (especialmente nos macrófagos) em articulações atingidas, e pelo grande número de células inflamatórias que migram para o tecido sinovial afetado (HOARAU et al., 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013). Geralmente é mais comum em indivíduos que possuem outras co-morbidades, em imunodeprimidos e em idosos (SUHRBIER et al., 2012).

Em alguns casos, CHIKV pode acometer o SNC manifestando sintomas neurológicos graves tais como meningite, encefalite, mielite, paralisia, ataxia, convulsões, distúrbios comportamentais, dentre outros (ARPINO et al., 2009; CHANDAK et al., 2009; ZACKS e PAESSLER, 2010; RUST, 2012; ZE-ZE, 2014; BALE, 2015). A evolução clínica pode ser benigna ou acompanhada de complicações tardias tais como paralisia flácida (SINGH et al., 2008) e a síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune caracterizada por polineuropatia aguda inflamatória que cursa com progressiva fraqueza muscular, podendo levar o paciente à tetraplegia e ao comprometimento das funções vitais (WIELANEK et al., 2007; LEBRUN et al., 2009; WALLING e DICKSON, 2017). Outras manifestações clínicas atípicas incluem conjuntivite, uveíte, retinite, miocardite, hepatite, nefrite e

pneumonia, petéquias, hemorragia e choque, embora sejam menos relatadas (MOHAN et al., 2010; RAJAPAKSE et al., 2010).

A transmissão vertical em neonatos foi reportada em alguns estudos durante o período perinatal e intraparto, com graves consequências neurológicas (atrasos no desenvolvimento mental, paralisias cerebrais e microcefalia), e em alguns casos, houve evolução para abortos ou óbitos pós-parto (LENGLET et al., 2006; ROBILLARD et al., 2006; GÉRARDIN et al., 2014, BANDEIRA et al., 2016; TORRES et al., 2016). Recentemente, foi relatada a presença de CHIKV no leite materno, sugerindo nova rota de transmissão viral para lactentes (CAMPOS et al., 2017).

2.3.2 *Mayaro virus*

O MAYV é um arbovírus amplamente distribuído no continente americano e tem causado surtos esporádicos e pequenas epidemias de uma doença febril exantemática denominada Febre do Mayaro.

2.3.2.1 Diversidade Genética

Estudos de análise filogenética do MAYV baseados nas características geográficas e genóticas mostram que atualmente existem 3 clados (genótipos) conhecidos: o D (Disperso), o L (Limitado) e o N (Novo) (POWERS et al., 2006; AUGUSTE et al., 2015; MACKAY e ARDEN, 2016). O genótipo D agrupa vários isolados de 1954 a 2003 e inclui países da América do Sul tais como Trinidad, Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Peru e Bolívia. (POWERS et al., 2006; TERZIAN et al., 2015). Já o genótipo L agrupa apenas 6 isolados de 1955-1991, estando estes limitados à região norte do Brasil (POWERS et al., 2006). Em 2010, houve a descrição do terceiro genótipo e, até o momento, este apresenta uma única estirpe isolada a partir de uma região peruana (AUGUSTE et al., 2015).

2.3.2.2 Epidemiologia

O MAYV foi inicialmente isolado a partir do sangue de trabalhadores rurais no ano de 1954 em uma região denominada Mayaro, localizada em Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1957). Desde então, espalhou-se por diversos países da América Central (CALISHER et al., 1974) e do Sul (AITKEN et al., 1960; GROOT et al., 1961; KARBAAT et al., 1964; TALARMIN et al., 1998; TESH et al., 1999; DE THOISY et al., 2003; IZURIETA et al., 2011; LEDNICKY et al., 2014; TERZIAN et al., 2015) (**Figura 7**).



Figura 7. Representação da distribuição de MAYV nas Américas do Sul e Central (Fonte: MOTA et al., 2015 - Adaptado).

No Brasil, a Febre do Mayaro foi descrita inicialmente no estado do Pará em 1955 quando causou um surto em numa comunidade rural próxima ao Rio Guamá (CAUSEY e MAROJA, 1957). Em 1978, causou a primeira epidemia em Belterra, no Pará, ocasião em que o vírus foi isolado de humanos, saguis e do mosquito *Haemagogus janthinomys* que ficou conhecido como o principal vetor (PINHEIRO et al., 1981; HOCH et al., 1981). Desde então, esta doença tornou-se endêmica principalmente na região Amazônica (AZEVEDO et al., 2009; ABAD-FRANCH et al., 2012; HALSEY et al., 2013). Subsequentemente, evidências sorológicas da circulação deste vírus em humanos e animais foram reportadas nas regiões Norte (Amazonas, Pará e Acre) (MOURÃO et al., 2012; TERZIAN et al., 2015) e Centro-Oeste (Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (VASCONCELOS et al., 1998; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015; SERRA et al., 2016), e, em 2007, 3 casos importados foram relatados no Estado de São Paulo (COIMBRA et al., 2007).

Assim como outros arbovirus, MAYV tem emergido em diversas regiões brasileiras causando surtos esporádicos. Isto pode ser visualizado através de dados divulgados pelo Ministério da Saúde que registrou, entre os anos 2014 a 2016, cerca

de 343 casos suspeitos de infecção por este vírus nas regiões Norte e Centro-Oeste e aproximadamente 50% destes ocorreram no estado de Goiás (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No mesmo período, um caso suspeito de infecção foi notificado na região Nordeste, no estado da Bahia, indicando que a circulação deste vírus possa ocorrer em outras regiões do país. No cenário atual de co-circulação de diferentes arbovírus em vários estados, MAYV vem preocupando as autoridades de saúde pública, pois muitos profissionais da saúde não estão familiarizados com a doença ocasionada e cada vez mais, casos estão sendo relatados em áreas não endêmicas (ESPOSITO e FONSECA, 2017).

2.3.2.3 Ciclos de Transmissão

Naturalmente, o MAYV mantém sua circulação constante em ciclos enzoóticos e epizoóticos, cujos principais hospedeiros são animais silvestres (primatas não humanos, pequenos mamíferos, aves e répteis) (CALISHER et al., 1974; HOCH et al., 1981; PAUVOLID-CORREA et al., 2015). Normalmente a transmissão ocorre de forma vetorial, por mosquitos do gênero *Haemagogus*, em especial *Haemagogus janthinomys*, um mosquito silvestre encontrado em áreas rurais e que no Brasil, tem sido implicado como principal vetor. Entretanto, outras espécies de mosquitos que possuem hábitos urbanos tais como *Culex sp.*, *Sabethes sp.* e *Mansonia sp.* podem funcionar como vetores secundários (HOCH et al., 1981; SERRA, et al., 2016). Além disso, estudos laboratoriais demonstraram que o vírus pode ser transmitido de forma eficaz por mosquitos antropofílicos do gênero *Aedes*, sobretudo pelo *Aedes aegypti*, que possui distribuição mundial (LONG et al., 2011).

2.3.2.4 Patogênese e Aspectos Clínicos

Este vírus faz parte dos alfavírus do velho mundo (artritogênicos) e pouco ainda foi explorado sobre a patogênese. Esta enfermidade apresenta manifestações clínicas semelhantes àquelas relatadas por pacientes acometidos por CHIKV, o que dificulta seu reconhecimento imediato e notificação. Clinicamente, tem sido classificada como doença febril exantemática que cursa com artralgia intensa (principalmente em pequenas articulações dos membros superiores e inferiores) e edema articular (PINHEIRO et al., 1981; SLEGERS et al., 2014). Estes sintomas podem ou não estar acompanhados de cefaleia, mialgia, dor retro-orbital, calafrios, vômito e diarreia (PINHEIRO et al., 1981; TESH et al., 1999).

O período de incubação viral varia de 7 a 12 dias e os sintomas geralmente perduram por até 7 dias (PINHEIRO e LeDUC, 1998; MOTA et al., 2015), podendo evoluir para cura ou progredir para uma fase crônica, sendo esta demarcada por intensa artralgia que pode persistir por meses ou anos (PINHEIRO e LeDUC, 1998; TESH et al., 1999; HASSING et al., 2010; THEILACKER et al., 2013). Tal fato limita os indivíduos acometidos de executarem atividades cotidianas e eleva anualmente os índices de morbidade (apesar de não haver relatos de casos fatais associados a esta doença), tornando-se assim um grave problema de saúde pública.

2.4 Diagnóstico Clínico e Laboratorial das Arboviroses

A circulação de diferentes arbovírus em uma mesma área geográfica pode causar surtos e epidemias, resultando em uma maior incidência de casos e consequente aumento da procura por serviços de saúde. Logo, é de suma importância que seja realizado um diagnóstico clínico-laboratorial correto e confiável a fim de auxiliar no monitoramento preciso destes patógenos. Neste contexto, vale destacar que o diagnóstico clínico das arboviroses apresenta dificuldades, pois estas exibem uma gama de manifestações clínicas com características inespecíficas passíveis de serem confundidas com outras doenças (BRONZONI et al., 2005; MORELI e COSTA, 2013). Contudo, o diagnóstico laboratorial apresenta extrema relevância na correta identificação da infecção, pois além de monitorar a evolução clínica, permite estabelecer um manejo adequado do paciente (CHARREL, 2016).

A identificação laboratorial do agente infeccioso baseia-se na utilização de métodos diretos ou indiretos, e varia de acordo com o período das manifestações clínicas apresentadas pelo paciente (**Figura 8**). Os métodos diretos visam detectar o genoma viral ou seus componentes na amostra, sendo úteis na fase aguda (período de viremia). Já os métodos indiretos buscam por componentes produzidos pelo indivíduo infectado, tais como os anticorpos, sendo úteis após o período de viremia, na fase sub aguda e crônica da doença (PEELING et al., 2010).

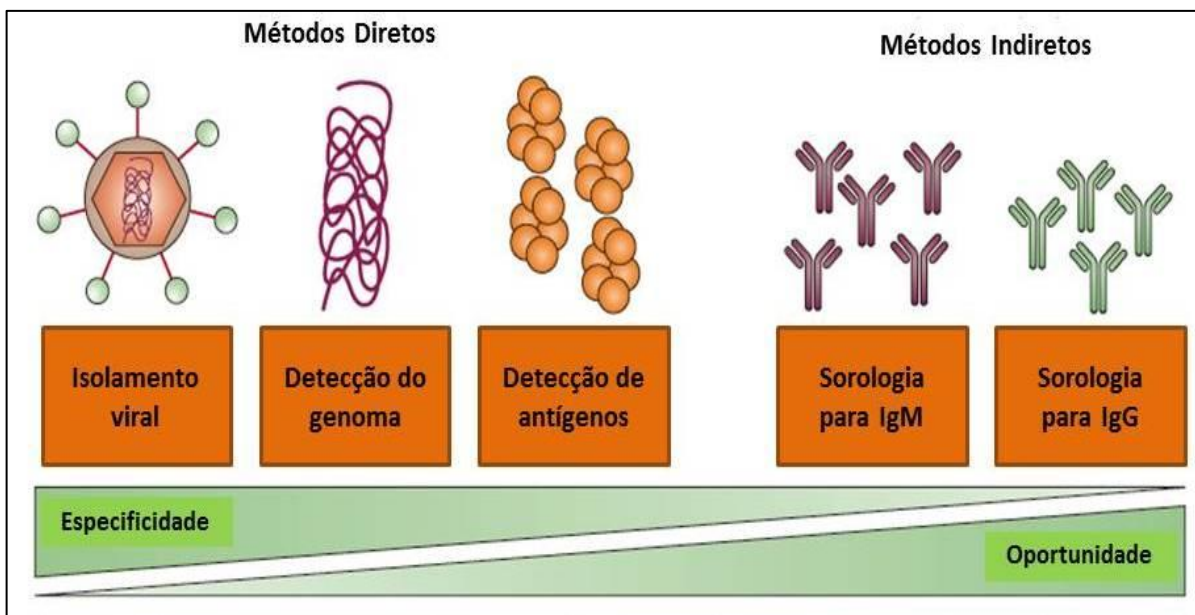


Figura 8 – Métodos de identificação laboratorial utilizados no diagnóstico de infecção por arbovírus (Fonte: PEELING et al., 2010 – Adaptado).

Atualmente, várias técnicas têm sido utilizadas na investigação de arbovírus, dos quais destacam-se os imunoenaios e as técnicas moleculares (MORELI e COSTA, 2013). Os imunoenaios são bastante utilizados na rotina laboratorial, pois apresentam baixo custo, facilidade de execução e manuseio. Dentre as diferentes técnicas, destacam-se o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e os testes rápidos imunocromatográficos, que permitem detectar e diferenciar os anticorpos de fase aguda da classe de imunoglobulinas M (IgM) e de fase crônica da classe imunoglobulinas G (IgG) (MARTIN et al., 2000; BURT et al., 2012; PRAT et al., 2014). Entretanto, estas técnicas possuem limitações, das quais destacam-se a possibilidade de: 1. reatividade cruzada entre vírus do mesmo gênero; 2. ocorrência de resultados falso-negativos (nos primeiros dias de infecção) (CASSEB et al., 2013; MORELI e COSTA, 2013).

No contexto de surtos e epidemias, os testes moleculares permitem identificar o real agente etiológico causador da doença, evitando condutas errôneas e inadequadas durante o manejo do paciente (FURUYA-KANAMORY et al., 2016; CABRAL-CASTRO et al., 2016). Tal situação facilita a realização de estudos clínicos, possibilitando conhecer manifestações atípicas em casos de mono ou co-infecções (TARAPHDAR et al., 2012). Epidemiologicamente, estes testes permitem monitorar a dinâmica da circulação de diferentes arbovírus em uma mesma área,

avaliar o real impacto na incidência e investigar novos arbovírus que possam estar circulando de forma silenciosa (SAM et al., 2015).

Uma das técnicas moleculares mais utilizadas para investigação de arbovírus é a Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR) que pode ser realizada da maneira convencional (qualitativa) ou em tempo real (quantitativa) (KUNO, 1998; ELNIFRO et al., 2000; BRONZONI et al., 2005; JOHNSON et al., 2012; FAYE et al., 2013; MORELI e COSTA, 2013). A RT-PCR destaca-se como importante ferramenta diagnóstica diferencial, capaz de detectar o genoma viral nos primeiros dias de infecção (PEELING et al., 2010; BURT et al., 2012). Porém, também apresenta algumas desvantagens como o alto custo dos reagentes e a possibilidade de contaminações.

Considerando as informações apresentadas, observa-se que, até o momento, não existe um método de diagnóstico ideal para investigação de arbovírus. A melhor conduta é aliar diferentes métodos (de acordo com o período das manifestações clínicas) com exames laboratoriais e de imagem a fim de aumentar a confiabilidade e rapidez do diagnóstico, contribuindo para elucidação de hipóteses diagnósticas e manejo adequado do paciente (MARDEKIAN e ROBERTS, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar, através de métodos moleculares, a dinâmica de circulação dos arbovirus *Dengue virus*, *Chikungunya virus* e *Mayaro virus* durante os anos de 2016 e 2017 no Estado do Piauí.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de DENV e CHIKV em amostras de soro de pacientes com sintomatologia clássica de arboviroses, por RT-PCR;
- Sequenciar amostras positivas e analisar a diversidade genética do CHIKV através de inferências filogenéticas;
- Avaliar a prevalência e cronicidade das manifestações clínicas em pacientes positivos para CHIKV;
- Padronizar reações e testar amostras para detecção de MAYV;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos e Legais

A pesquisa foi executada mediante aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, com parecer de nº1197662 (CAAE: 46111615.0.0000.5214), respeitando também a Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde), que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos.

4.2 Coleta de Amostras e Obtenção de Dados Clínico-Laboratoriais dos Pacientes

Foram coletadas amostras de soro de pacientes com sintomatologia clássica para arboviroses, atendidos no Laboratório do Pronto Socorro Municipal (PSM) de Parnaíba, Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) e Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI), por um período de 19 meses (Abril de 2016 a Novembro de 2017). Após coletada, estas amostras foram armazenadas em freezer -70°C no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microorganismos e Plantas (BIOMIC), localizado na Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, para posterior análise. Também foram utilizadas amostras obtidas do LACEN-PI.

As informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes atendidos em Parnaíba foram obtidas por meio de aplicação de questionário semi-estruturado diretamente com o paciente (Apêndice II), após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I). A confirmação diagnóstica inicial foi realizada através de testes sorológicos (teste rápidos imunocromatográficos e/ou ELISA) feitos pelo LACEN-PI para detecção de anticorpos anti-DENV e anti-CHIKV. Os resultados foram obtidos por meio de consulta ao sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial – GAL.

4.3 Diagnóstico Molecular

4.3.1 Extração de RNA Viral e Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA viral foi extraído a partir das amostras de soro utilizando o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* de acordo com as instruções do fabricante. Estas amostras foram selecionadas considerando as manifestações clínicas e duração dos sintomas (até 5

dias após início das manifestações clínicas). Após esta etapa foi realizada a reação de Transcrição Reversa (RT), onde o RNA viral foi convertido em DNA complementar (cDNA) através da ação de uma enzima denominada transcriptase reversa (**Figura 9**). O protocolo selecionado utilizou os *Random Hexamers*, que correspondem a oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias, que se ligam a qualquer região do RNA e permitem a síntese de cDNA.

Este protocolo foi realizado em duas etapas: na primeira etapa, 10 µl de RNA molde e 5 µl de *Random Hexamers* (50 µM) foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* a 25°C por 10 min e 70°C por 5 min. Após serem retiradas do termociclador, as amostras foram armazenadas no gelo por 2 minutos para evitar a formação de dímeros. Na segunda etapa foram adicionados 5 µl de Tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl), obtendo-se um volume final de 26 µl, onde estes foram novamente incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase promove a amplificação dos fragmentos de interesse por ação da enzima Taq DNA polimerase. Foram utilizados protocolos para amplificação da região do gene que codifica a glicoproteína *NS5* (comum a todos os flavivirus), além da execução de testes para tipagem de DENV. Para detecção de CHIKV foram empregados dois protocolos para amplificação de regiões dos genes que codificam as glicoproteínas *E1* e *E2*. Adicionalmente, para investigação de MAYV foram padronizados três protocolos para análise de regiões dos genes que codificam as glicoproteínas *nsP1*, *E1* e *E2/E3*. As metodologias utilizadas estão descritas resumidamente na **Figura 9** e serão apresentadas a seguir.

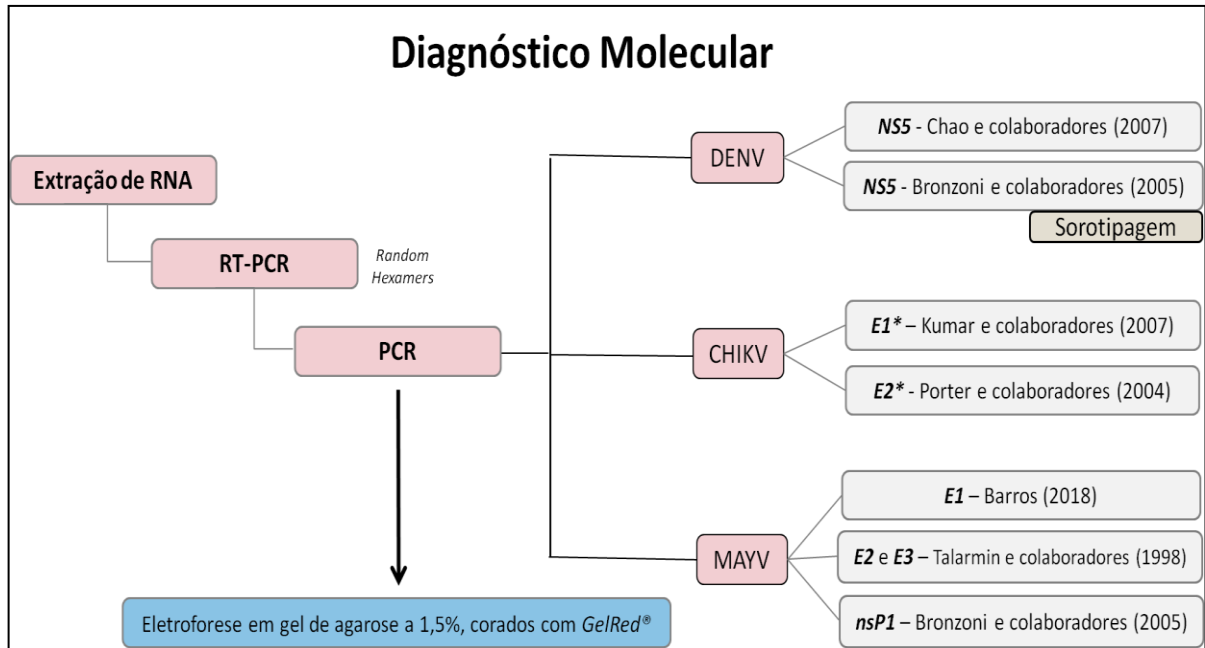


Figura 9. Esquema representativo da metodologia utilizada para detecção molecular do DENV, CHIKV e MAYV. *Região dos genes que foram sequenciados.

4.3.2.1 PCR para amplificação do gene *NS5* dos *Flavivirus*

Para amplificação da região do gene que codifica a glicoproteína *NS5*, foram utilizados os iniciadores desenvolvidos por Chao e colaboradores (2007), resultando em um produto de 270 pares de base (pb) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Sequência de iniciadores descritos por Chao e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene *NS5* com os respectivos tamanhos dos produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>NS5</i>	MFU1	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	270 pb
	CFD2	GTGTCCCAGCCGCGGTGTCATCAGC	

Para um volume final de 25 μ l são adicionados: 2,5 μ l de tampão (10x), 2 μ l de $MgCl_2$ (50mM), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 0,3 μ l de mFU1 (10pM/ μ l), 0,3 μ l de CFD2 (10pm/ μ l), 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l), 2,5 μ l de cDNA para cada amostra e 16,7 μ l de H_2O estéril. Logo depois, as reações foram submetidas a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto), seguidos ao final a 72°C por 10 min.

4.3.2.2 PCR para amplificação do gene *NS5* dos *Flavivirus* seguida por Multiplex Nested-PCR para sorotipagem de DENV

Para realização deste protocolo, foram utilizados os iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), sendo realizado em duas etapas. Na primeira, foram utilizados os iniciadores FG1 e FG2, que amplificam uma região do gene que codifica glicoproteína *NS5* gerando um produto final de 958 pb. Já na segunda etapa, utilizou-se os iniciadores FG1, nDEN-1, nDEN-2, nDEN-3 e nDEN-4, resultando em produtos de diferentes tamanhos. Os iniciadores estão descritos na tabela a seguir (**Tabela 4**).

Tabela 4. Sequência de iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005) para amplificação da região de interesse no gene *NS5* com os respectivos tamanhos dos produtos.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>NS5</i>	FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958 pb
	FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	
	nDEN-1	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472 pb
	nDEN-2	GAACCAGTTTGTTTDRTTTCATAGCTGCC	316 pb
	nDEN-3	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	659 pb
	nDEN-4	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 pb

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – FG1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – FG2 (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 53°C por 45 seg; 72°C por 1 min.) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. Foram utilizados 2,5ul do produto da primeira etapa em uma segunda reação com os iniciadores FG1, nDEN-1, nDEN-2, nDEN-3 e nDEN-4, utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

4.3.2.3 PCR para amplificação do gene *E1* de CHIKV

Para detecção de CHIKV foram utilizados os iniciadores CHIKV-F e CHIKV-R descritos por Kumar e colaboradores (2007). Estes, anelam em regiões específicas do gene que codifica a glicoproteína estrutural de envelope *E1*, resultando em um produto de 330 pb (**Tabela 5**).

Tabela 5. Sequência de iniciadores descritos por Kumar e colaboradores (2007) para amplificação da região de interesse no gene *E1* com sua localização e tamanhos do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E1</i>	DVRChk-F	ACCGGCGTCTACCCATTCATGT	330 pb
	DVRChk-R	GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5 µl de tampão (10x), 1,2 µl de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de dNTPs (10mM), 0,2 µl de *Primer forward* – DVRChk-F (10 pmol/ µL), 0,2 µl de *Primer reverse* – DVRChk-R (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17,25µl de H₂O estéril e 3 µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 58°C por 30 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 30 min.

4.3.2.4 PCR para amplificação do gene *E2* de CHIKV

Para detecção da região do gene que codifica a glicoproteína *E2*, foi realizada uma *nested* PCR utilizando os iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004). Na primeira etapa foram utilizados os iniciadores JM1 e JM2, que geram um produto final de 240 pb. Na segunda etapa foram utilizados os iniciadores JM3 e JM4, resultando em um produto final de 200 pb (**Tabela 6**).

Tabela 6. Sequência de iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004) para amplificação da região de interesse no gene *E2* com sua localização e tamanhos do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E2</i>	JM1-F	GCAGACGCAGAGAGGGCCAG	240 pb
	JM2-R	CGTGCTGCAAGGTAGTTCTC	
	JM3-F	GCTATTTGTAAGAAC GTCAG	200 pb
	JM4-R	TACCGTGCTGCGGTCGGGAA	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – JM1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – JM2 (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17,5µl de H₂O estéril e 2,5µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 55°C por 30 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. Serão utilizados 2,5ul do produto da primeira etapa em uma segunda reação com os primers JM3 e JM4, utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

4.3.2.5 PCR para amplificação do gene *nsP1* dos *Alphavirus* seguida por Multiplex Nested-PCR para detecção de MAYV

Para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *nsP1* dos *Alphavirus*, foram utilizados os iniciadores descritos por Bronzoni e colaboradores (2005), sendo realizado em duas etapas. Na primeira, foram utilizados os iniciadores M2W e cM3W, que amplificam uma região do gene que codifica glicoproteína *nsP1*, gerando um produto final de 434 pb. Já na segunda etapa, foram utilizados os iniciadores cM3W e nMAY, resultando em um produto de 270pb (**Tabela 7**).

Tabela 7. Sequência de iniciadores descritos por Bronzoni (2005) para amplificação da região de interesse no gene *Nsp1* com sua localização e tamanhos do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>nsP1</i>	M2W	YAGAGCDTTTTTCGCAYSTRGCHW	240 pb
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	
	nMAY	GGAAGTTGGCCAAGGC	270 pb

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – M2W (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – cM3W (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min. à 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 53°C por 45 seg; 72°C por 1 min.) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. Foram utilizados 2,5ul do produto

da primeira etapa em uma segunda reação com os iniciadores cM3W e nMAY, utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

4.3.2.6 PCR para amplificação do gene *E1* de MAYV

Para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *E1* de MAYV, foram desenhados iniciadores específicos, baseando-se em sequências de genoma completo disponíveis no banco de dados GenBank (BARROS, 2018). Os iniciadores foram denominados Maynu-F e Maynu-R e amplificam um produto de 579 pb (**Tabela 8**). As condições de padronização utilizadas estão descritas a seguir.

Tabela 8. Sequência de iniciadores desenhados por BARROS, 2018 para amplificação da região de interesse no gene *E1* com sua localização e tamanhos do produto.

GENE	INICIADOR	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E1</i>	MaynuF	ATGTGGGGAGGTGCATACTG	579 pb
	MaynuR	CATCGAAACGGGTATGTTGC	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – MaynuF (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – MaynuR (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 56°C por 45 seg; 72°C por 1 min.) e de uma extensão final a 72°C por 10 min.

4.3.2.7 PCR para amplificação dos genes *E2/E3* de MAYV

Para amplificação dos genes que codificam as glicoproteínas *E2/E3* de MAYV, foram utilizados os iniciadores MayF1 e MayB2 descritos por Talarmin e colaboradores (2007), resultando em um produto de 462 pb (**Tabela 9**).

Tabela 9. Sequência de iniciadores desenhados por Talarmin e colaboradores (1998) para amplificação da região de interesse no gene *E2/E3*, com sua localização e tamanhos do produto.

GENE	INICIADOR	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E2 e E3</i>	MayF1	CTTCCCATGTTTTCCAACCGAG	462pb
	MayB2	GCCAGGATAAAGTGTCCCATTGTG	

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de *Primer forward* – MayF1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de *Primer reverse* – MayB2 (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes foram incubados no termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* e submetidos às etapas de: desnaturação inicial por 3 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 56°C por 45 seg; 72°C por 1 min.) e de uma extensão final a 72°C por 10 min.

4.3.3 Visualização dos Produtos Amplificados

Os produtos da PCR e um marcador de tamanho molecular (“*Ladder*” – 100pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com *GelRed®*. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal preenchida com tampão TBE 1x (tris + ácido bórico + EDTA), em corrente de 120 V por período de 40 min. Em seguida os fragmentos amplificados serão visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no transluminador *L-PIX (Loccus Biotecnologia)* para posterior análise visual.

4.4 Sequenciamento dos genes *E1* e *E2* de CHIKV e Análise das Sequências

O sequenciamento de CHIKV foi realizado pelos colaboradores do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A execução desta etapa foi feita através do método dideoxi descrito por Sanger e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit “ABI Prism R Big Dye M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as especificações de reação e leitura do fabricante. Nas reações de sequenciamento foram utilizados aproximadamente 11 ng do DNA de cada amplicon purificado, acrescidos dos respectivos iniciadores específicos senso e antissenso (0,5µM). Cada amplicon foi sequenciado em ambas as direções (*forward* e *reverse*).

A montagem e visualização das sequências finais foi feita através da análise dos cromatogramas obtidos por meio do programa *SeqTrace* (STUCKY, 2012). As sequências consenso (*E1* e *E2*) deste estudo foram alinhadas com outras sequências disponíveis no banco de dados Genbank, utilizando a ferramenta

CLUSTAL W, implementada no programa MEGA 7 (TAMURA et al, 2013). Em seguida, os fragmentos *E1* e *E2* foram concatenados por meio do programa *Geneious* versão R9.

4.4.1 Análise Filogenética

Árvores filogenéticas foram construídas pelo método de máxima verossimilhança, baseado no modelo Tamura Nei (TAMURA e Nei, 1993), usando o programa MEGA 7 e 1000 replicatas de *bootstrap* (KUMAR et al., 2016). Para construção das árvores, foram obtidas do GenBank sequências nucleotídicas de genoma completo representativas dos genótipos WAf, ECSA, Asiático. Estas sequências foram organizadas de acordo com local, número de acesso e ano de isolamento.

Inferências bayesianas também foram realizadas utilizando o programa *BEAST* 1.8.4 e *BEAUTi* v.1.8.2. (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007) com os métodos de Monte Carlo via Cadeias de Markov, baseado no modelo de substituição de nucleotídeos HKY, com distribuição gama (quatro categorias), sob o relógio molecular e o modelo demográfico Bayesiano. Sessenta milhões de correntes foram executadas e as incertezas foram abordadas como os intervalos de credibilidade Bayesianos de 95% (BCI). As árvores foram amostradas em cada 10.000 etapas e, em seguida, resumidas em uma árvore de máxima credibilidade de clado usando o *TreeAnnotator* v.1.8.2 (RAMBAUT e DRUMMOND, 2015). A árvore final foi visualizada em *FigTree* v.1.4.3 (RAMBAUT, 2014).

4.5 Acompanhamento clínico dos pacientes positivos para CHIKV

Para acompanhar pacientes que evoluíram para um quadro clínico de cronificação da infecção por CHIKV, 12 meses e 6 meses após início dos sintomas (para amostras coletadas em 2016 e 2017, respectivamente), foram realizadas ligações telefônicas para os pacientes positivos nos testes moleculares. Em seguida, foi aplicado um questionário semi-estruturado (Apêndice III), elaborado com base em estudos que avaliaram a evolução clínica de pacientes acometidos por CHIKV (JAVELLE et al., 2015; SCHILTE et al., 2013; GÉRARDIN et al., 2011). A finalidade deste questionário foi obter informações relacionadas ao curso clínico e manifestações características pós-infecção pelo CHIKV, relacionadas a fase crônica da doença.

De um modo geral, os principais critérios utilizados para avaliar a persistência de algias articulares (sintoma mais proeminente durante as infecções) foram: 1. persistência de oligo ou poliartralgia; 2. principais membros acometidos (dedos, mãos, punhos, joelhos, tornozelos pés e dedos dos pés); 3. presença ou ausência de edema/inchaço articular; 4. duração da artralgia por um período maior que 3 meses após o início dos sintomas.

5. RESULTADOS

No período compreendido entre Abril de 2016 à Novembro de 2017 foram coletadas 578 amostras de soro de pacientes com sintomatologia clássica de infecção por arboviroses (sendo 231 em 2016 e 347 em 2017). Considerando o grande número de pacientes sintomáticos, vale destacar que as principais manifestações clínicas relatadas foram: febre 490 (84,7%), artralgia 476 (82,3%), cefaleia 443 (76,6%), mialgia 413 (71,4%), exantema 367 (63,5%), dor retroorbitária 283 (48,9%) e 10 manifestações hemorrágicas (1,7%). Estas informações estão descritas na **Figura 10**.

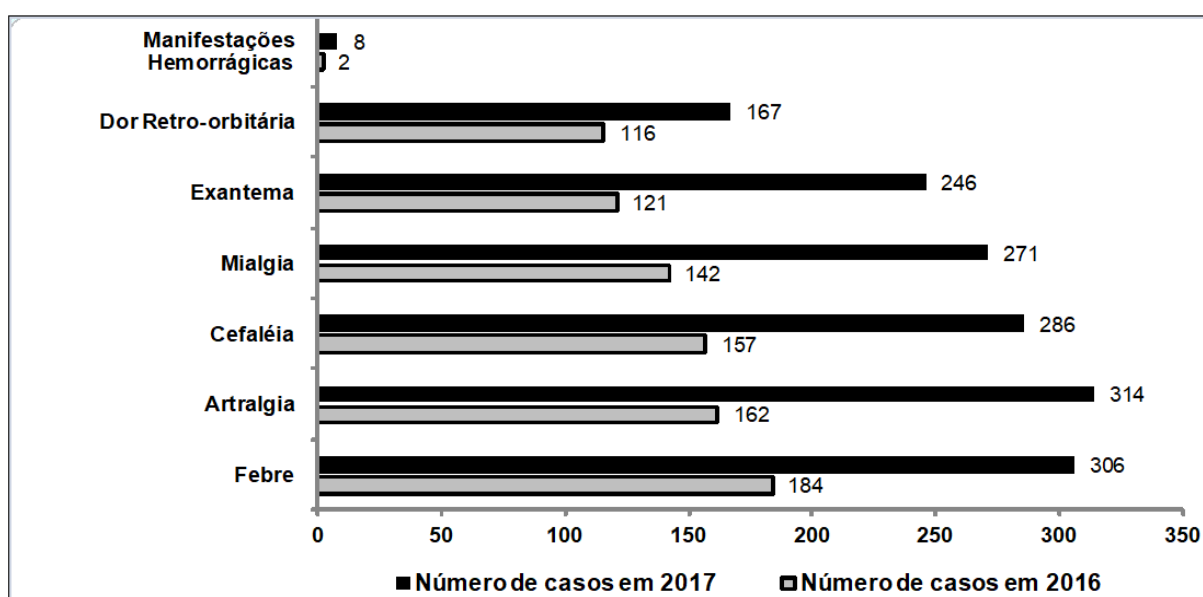


Figura 10. Representação gráfica das principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes nos anos de 2016 e 2017.

Do total de amostras coletadas, 442 (sendo 198 em 2016 e 244 em 2017) foram submetidas à sorologia para detecção de anticorpos anti-DENV e 347 (sendo 116 em 2016 e 230 em 2017) para detecção de anticorpos anti-CHIKV (**Figura 11**). Os resultados dos testes sorológicos mostraram que no ano de 2017 houve redução do número de casos de DENV (6,6%) e aumento dos casos de CHIKV (25,9%), quando comparado ao ano de 2016.

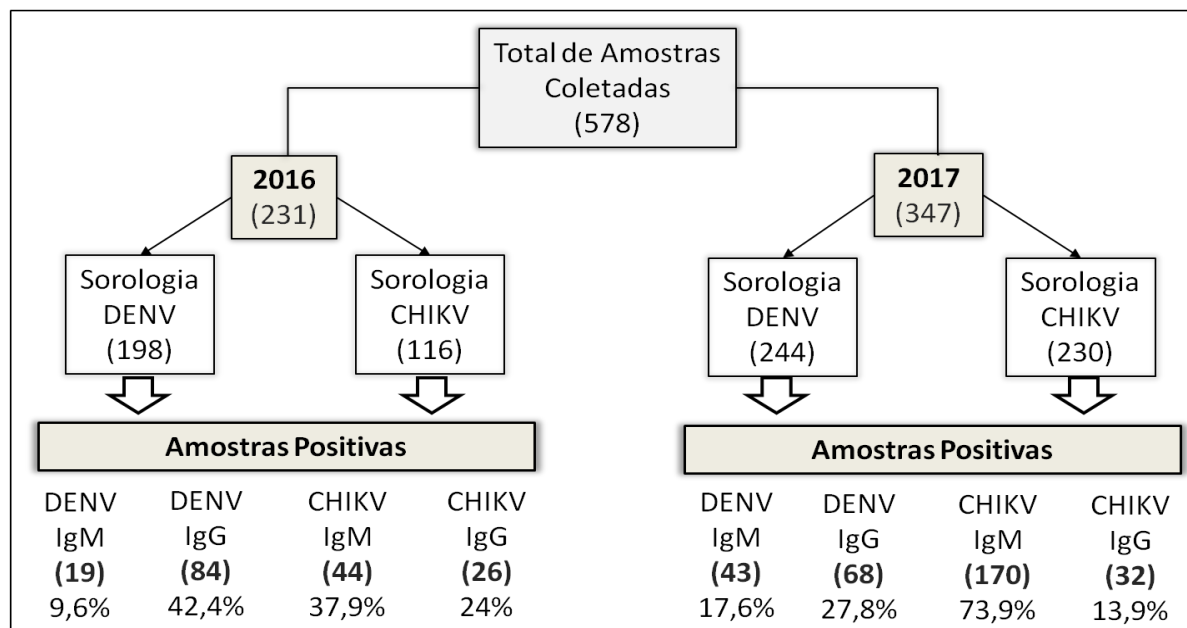


Figura 11. Esquema representativo de amostras submetidas à sorologia para detecção de anticorpos anti-DENV e anti-CHIKV e valores absolutos e relativos de amostras positivas nos anos de 2016 e 2017.

Para realização dos testes moleculares, foram extraídas e testadas por RT-PCR 115 amostras, sendo 63 em 2016 e 52 em 2017. Do total de amostras testadas, 3 (2,6%) positivaram para DENV nos testes descritos por Bronzoni e colaboradores (2005). No ano de 2016, foi identificado o sorotipo DENV-1 (amostra 30-16). Já em 2017, foram identificados os sorotipos DENV-2 (amostra 190-17) e DENV-4 (amostra 256-17). Adicionalmente, 32 amostras (27,8%) positivaram para CHIKV nos testes moleculares descritos por Kumar e colaboradores (2007) e Porter e colaboradores (2004). O paciente 30-16 apresentou co-infecção por DENV-1 e CHIKV. Não houve detecção de MAYV, a partir dos diferentes iniciadores descritos, nas amostras investigadas nos anos de 2016 e 2017. Para investigação deste arbovírus, algumas amostras com sintomatologia sugestiva, coletadas em 2015, foram testadas para MAYV utilizando os iniciadores descritos por Barros (2018) e Talarmin (1998). A análise resultou na amplificação da amostra 25-15 na reação descrita por Talarmin. Os resultados estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Descrição de amostras positivas, nos anos de 2016 e 2017, por testes moleculares quanto ao sexo, idade, dias de sintomas e realização de testes sorológicos. Não Realizado (NR); positivo (+); negativo (-).

Amostra	Sexo	Idade	Dia de Sintomas	DENV IgM	DENV IgG	DENV PCR	CHKV IgM	CHKV IgG	CHKV PCR	PCR MAYV
25-15	F	27	5	+	+	DENV2	NR	NR	-	+
11-16	M	19	2	-	-	-	-	-	+	-
21-16	M	42	3	-	+	-	-	NR	+	-
29-16	M	37	3	-	-	-	-	NR	+	-
30-16	F	15	5	-	-	DENV1	NR	NR	+	-
31-16	M	6	2	-	-	-	-	NR	+	-
52-16	M	36	4	-	+	-	-	NR	+	-
56-16*	F	52	2	-	+	-	-	NR	+	-
78-16*	M	14	2	-	-	-	NR	NR	+	-
81-16*	M	73	2	-	+	-	-	NR	+	-
91-16	F	26	3	-	-	-	-	NR	+	-
92-16*	F	38	2	-	+	-	-	NR	+	-
118-16*	M	11	5	-	-	-	+	+	+	-
145-16	F	20	2	-	-	-	NR	NR	+	-
165-16	M	50	4	-	-	-	NR	NR	+	-
166-16*	M	50	5	-	+	-	NR	NR	+	-
184-16	F	31	2	+	+	-	+	+	+	-
229-16	F	32	1	-	-	-	NR	NR	+	-
230-16	M	19	2	-	-	-	NR	NR	+	-
121-17*	F	34	2	-	+	-	NR	NR	+	-
180-17	M	34	2	-	NR	-	NR	NR	+	-
188-17*	F	37	3	-	+	-	NR	NR	+	-
190-17	M	12	2	-	-	DENV2	NR	NR	-	-
193-17	F	40	5	-	NR	-	-	NR	+	-
217-17	F	66	4	-	-	-	+	NR	+	-
218-17*	F	35	3	-	+	-	NR	NR	+	-
239-17*	F	36	3	+	NR	-	NR	-	+	-
244-17*	F	68	5	+	NR	-	+	-	+	-
254-17	F	66	5	-	NR	-	-	NR	+	-
256-17	M	19	5	-	+	DENV4	+	NR	-	-
281-17*	M	7	5	-	NR	-	+	NR	+	-
294-17*	F	12	5	-	-	-	-	+	+	-
312-17	F	85	5	-	+	-	+	NR	+	-
332-17	M	13	4	-	-	-	-	NR	+	-
334-17	F	45	4	-	-	-	-	NR	+	-

* Amostras submetidas ao sequenciamento de CHIKV

Grande parte das amostras que foram positivas para CHIKV coincidiram com o período de viremia descrito na literatura, cinco dias após o início dos sintomas. Entretanto, muitos pacientes apresentaram manifestações clínicas características de fase aguda por um período maior que cinco dias. Diante disso, foram feitas RT-PCR, utilizando o protocolo descrito por Kumar e colaboradores (2007), com intuito de verificar a persistência de CHIKV na circulação por um período maior que 6 dias. Foram selecionadas amostras de pacientes que apresentavam as seguintes informações: 1. sorologia positiva anti-CHIKV IgM e IgG; 2. presença de manifestações clínicas associadas à artralgia intensa comumente relatada por pacientes infectados. No entanto, não foi detectado o vírus nas amostras testadas.

Das 32 amostras positivas para CHIKV, treze foram selecionadas com base nas características clínicas e enviadas para realização do sequenciamento parcial dos genes que codificam as glicoproteínas *E1* e *E2*. As sequências deste estudo foram comparadas com outras sequências disponíveis no banco de dados *Nucleotide BLAST* e apresentaram 100% de homologia com os isolados brasileiros da Bahia (KU940225.1), Pernambuco (KX228391), Alagoas (KY704936), Sergipe (KY055011), Paraíba (KY704955) e Rio de Janeiro (KY124329.1).

Duas árvores filogenéticas fo construídas com o objetivo de inferir sobre como agrupava-se o genótipo das amostras sequenciadas do Piauí com os genótipos circulantes em diferentes regiões geográficas. A análise filogenética revelou que os vírus amplificados neste estudo pertenciam ao genótipo ECSA (**Figura 12**). Inferências bayesianas deram mais suporte a este achado, pois mostraram que, os vírus isolados no Piauí compartilham um ancestral comum, que foi inserido no Brasil pelo estado da Bahia no ano de 2014 (Intervalo de Confiança Bayesiano de 95% entre os anos de 2013 e 2015), sugerindo que a circulação do genótipo ECSA já ocorria antes da primeira detecção no estado do Piauí, em 2016 (**Figura 13**).

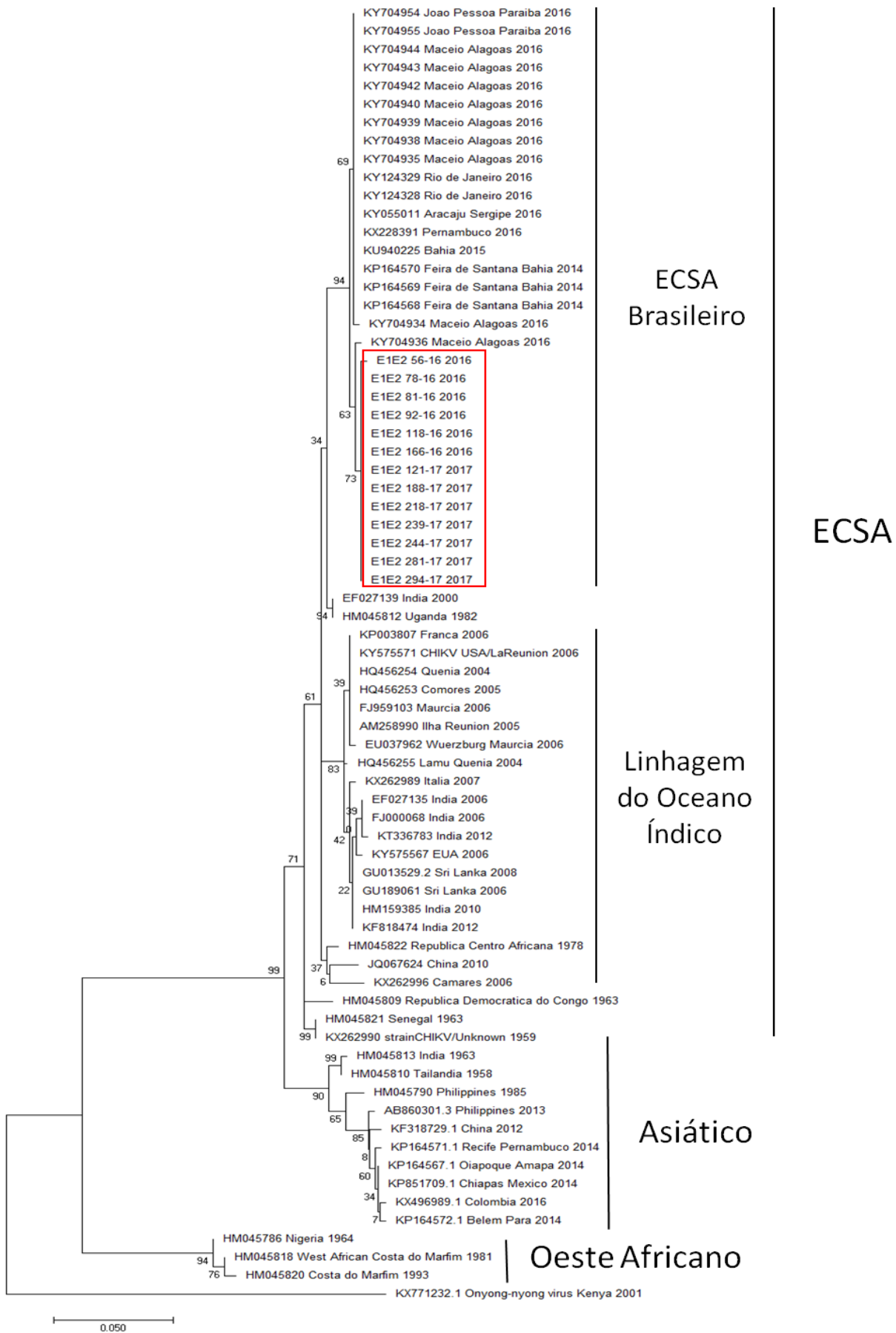


Figura 12. Árvore filogenética com treze seqüências parciais (434 pb) dos genes *E1* e *E2* de CHIKV isolados no Piauí, Brasil. A árvore foi construída utilizando o programa Mega v.7.0, com um *bootstrap* de 1.000 replicatas. A história evolutiva foi inferida utilizando o método de *Maximum Likelihood* baseado no modelo Tamura Nei. Os isolados deste estudo estão marcados em vermelho.

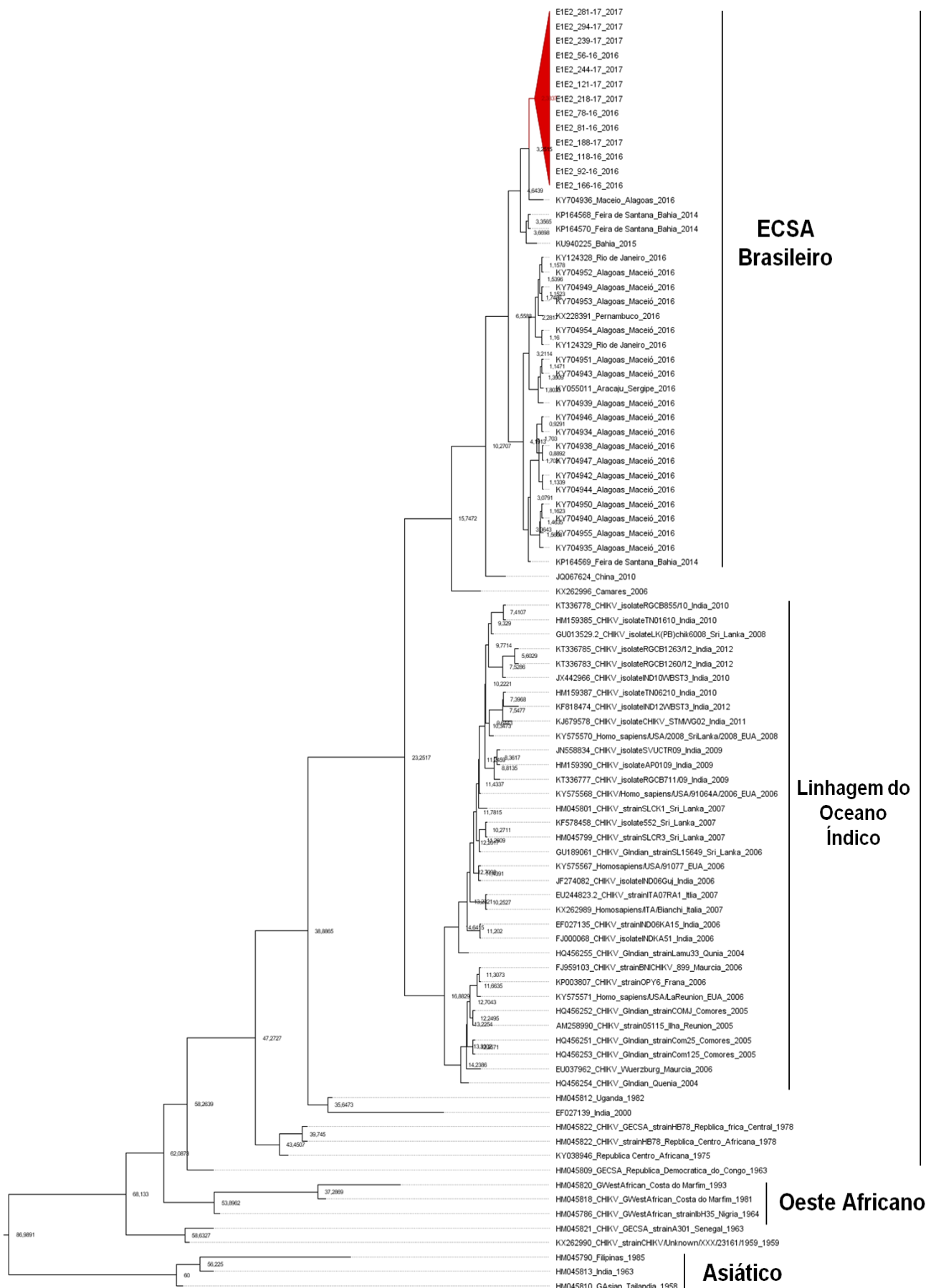


Figura 13. Árvore de máxima credibilidade de clado com treze seqüências parciais (434 pb) dos genes *E1* e *E2* de CHIKV isolados no Piauí, Brasil. Os isolados deste estudo estão marcados em vermelho. A árvore foi reconstruída usando o modelo de substituição de nucleotídeos HKY com distribuição gama (quatro categorias), sob o relógio molecular e o método Bayesiano.

Dos 32 pacientes positivos nos testes moleculares, apenas 23 atenderam às ligações telefônicas e responderam aos questionamentos relacionados à evolução clínica da infecção por CHIKV. Cerca de 17,3% dos pacientes (amostras 31-16, 78-16, 218-17 e 281-17) evoluíram para inexistência de sinais e sintomas relacionados às manifestações desta arbovirose. Destes, três (78-16, 218-17 e 281-17) tiveram suas amostras sequenciadas. Um percentual de 21,7% dos pacientes (amostras 145-16, 165-16, 180-17, 239-17 e 294-17) evoluíram para a fase subaguda, pois relataram a persistência de artralgia por um período de aproximadamente 3 meses após o início dos sintomas. Destes, dois pacientes (239-17 e 294-17) tiveram suas amostras sequenciadas. Verificamos também que 60,9% dos pacientes contactados (amostras 30-16 - co-infecção -, 52-16, 56-16, 81-16, 91-16, 166-16, 184-16, 121-17, 188-17, 217-17, 244-17, 312-17, 332-17 e 334-17) evoluíram para a fase crônica, pois relataram a permanência de artralgias por um período maior que 3 meses. Deste total, seis (56-16, 81-16, 166-16, 121-17, 188-17 e 244-17) tiveram suas amostras sequenciadas. Estes dados estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Descrição de amostras positivas para CHIKV (pacientes contactados) de acordo com a idade, duração dos sintomas e principais manifestações clínicas de fase aguda e crônica.

Amostra	Idade	Dias de Sintomas	Manifestações Clínicas (Fase Aguda)	Tempo de persistência dos Sintomas	Manifestações Clínicas (Fase Crônica)
30-16	15	5	Febre, cefaleia, artralgia, dor retro-orbitária, prostração e exantema	~ 7 meses	Dores nos dedos das mãos, joelhos e tornozelos
31-16	6	2	Febre, artralgia, mialgia, vômitos e exantema	~ 2 semanas	Sem sinais e sintomas
52-16*	36	4	Febre, cefaleia, artralgia, dor retro-orbitária, mialgia, prostração, exantema e dor abdominal	~ 12 meses	Dores nas mãos e pés
56-16*	52	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, dor abdominal e edema articular.	~ 7 meses	Dores nas mãos e punhos
78-16*	14	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, prostração, vômitos, dor abdominal e fotofobia	~ 1 semana	Sem sinais e sintomas
81-16*	73	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia e prostração	~ 12 meses	Dores nos dedos das mãos, mãos e joelhos
91-16	26	3	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas, dor retro-orbitária, fotofobia, diarreia, exantema, dor abdominal, edema articular	~ 11 meses	Dores nos dedos das mãos, mãos, tornozelos e pés (com edema)
145-16	20	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, prostração e exantema	~ 3 meses	Dores nas mãos, punhos, joelhos e tornozelos

165-16	50	4	Febre, cefaleia, artralgia, dor retro-orbitária, prostração e edema articular	~ 2 meses	Dores nos tornozelos e pés
166-16*	50	5	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retroorbitária, prostração, exantema, edema articular	~ 12 meses	Dores nas mãos e pés
184-16	32	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, edema articular	~ 12 meses	Dores nas mãos, tornozelos e pés
121-17*	36	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, exantema, edema articular	~ 4 meses	Dores nos punhos e joelhos
180-17	34	2	Febre, cefaleia, artralgia, náuseas, mialgia, dor nas costas	~ 2 meses	Dores nas mãos e joelhos
188-17*	43	3	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, edema articular, exantema.	~ 4 meses	Dores nos dedos das mãos, punhos, joelhos, tornozelos (com edema) e pés
217-17	66	4	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, exantema, diarreia, náuseas, dor abdominal, edema articular, dor nas costas	~ 6 meses	Dores nas mãos, punhos, joelhos, tornozelos e pés
218-17*	35	3	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, náuseas prostração, edema articular	~ 1 semana	Sem sinais e sintomas
239-17*	36	3	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia exantema, dor nas costas	~ 1 mês	Dores nos dedos das mãos, punhos, cotovelos, joelhos e tornozelos
244-17*	68	5	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, dor nas costas, exantema, náuseas	~ 6 meses	Dores nos dedos das mãos, punhos, joelhos e tornozelos
281-17*	7	5	Febre, artralgia, mialgia, dor retroorbitaria, náuseas, vômitos, dor nas costas	~ 15 dias	Sem sinais e sintomas
294-17*	12	5	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas, dor nas costas	~ 2 meses	Dores nos punhos, joelhos e tornozelos.
312-17	13	5	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, náuseas	~ 5 meses	Dores nas mãos, punhos, cotovelos, ombros, joelhos e tornozelos
332-17	85	4	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, náuseas, vômitos, prostração, exantema	~ 4 meses	Dores nas mãos, punhos, ombros, joelhos, tornozelos e pés
334-17	46	4	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária, exantema, náuseas, vômito	~ 5 meses	Dores nos joelhos, tornozelos, pés e dedos dos pés

* Amostras Sequenciadas

Foram obtidos dados clinico-laboratoriais da paciente 217-17 (66 anos), sem histórico de comorbidades anteriores à infecção por CHIKV. Após infecção, a mesma apresentou artralgia intensa de forma simétrica e recidivante nas mãos, punhos, ombros, tornozelos e pés que perduraram por aproximadamente 6 meses. O acometimento de tais membros foi comprovado através dos resultados de exames de eletroneuromiografia e ultrassonografia, que demonstraram a presença de polineuropatia periférica, sinovite e tenossinovite. Exames laboratoriais subsequentes foram realizados e incluíram proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação, coagulograma, prova do laço e hemograma. Todos apresentaram valores normais, com exceção do último exame, que evidenciou leve trombocitopenia e linfopenia.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos que o ano de 2017 apresentou maior número de pacientes sintomáticos quando comparado ao ano de 2016, sendo a artralgia o segundo sintoma recorrente e o mais relatado por pacientes acometidos por CHIKV. Entretanto, a presença de algumas manifestações hemorrágicas pode estar relacionada à possíveis infecções por DENV. Logo, a avaliação do quadro clínico de pacientes suspeitos de infecção por arbovírus é de extrema relevância, pois manifestações clínicas graves ou atípicas devem ser conhecidas para que seja traçada uma conduta clínica e epidemiológica adequada (MARQUES et al., 2017). A debilidade ocasionada pelos sintomas clínicos gera aumento da procura por atendimento nos serviços de saúde e consequente elevação dos índices de morbidade, o que reflete em impacto econômico para o estado, seja pelos altos custos relacionados à assistência e tratamento dos pacientes, seja pela perda de produtividade laboral.

A maioria dos serviços de saúde utiliza os testes sorológicos como método de escolha para confirmação de casos suspeitos de infecção por arbovírus (CHARREL, 2016; SAM et al., 2015). Do ponto de vista biológico, estes testes são considerados qualitativos, pois permitem estimar se houve o contato entre o vírus e o organismo do paciente (MARDEKIAN e ROBERTS, 2015). Epidemiologicamente, a sorologia permite estimar a incidência e prevalência de casos em uma região, gerando informações que podem auxiliar a vigilância epidemiológica a monitorar a circulação arboviral e avaliar a extensão de determinado surto (SAM et al., 2015). Neste estudo, foi possível avaliar a incidência e prevalência de dois arbovírus, DENV e CHIKV, que contribuíram para aumento dos índices de morbidade no estado. Nossos resultados são semelhantes aos dados do boletim epidemiológico de arboviroses nº 50, da Secretaria Estadual de Saúde do Piauí que evidenciou, no ano de 2017, a redução dos casos de DENV e aumento dos casos de CHIKV quando comparado ao ano de 2016 (PIAUI, 2017).

Apesar da relevância clinico-epidemiológica, os testes sorológicos possuem limitações que podem dificultar o correto monitoramento de surtos ou epidemias em determinada região. Dentre as principais limitações, destacam-se: 1. A baixa sensibilidade para detecção de anticorpos IgM em amostras de pacientes que estão na fase aguda (período de viremia) gerando um resultado falso negativo que pode

contribuir para a subnotificação de casos (KASHYAP et al., 2010); 2. Especificidade limitada devido às possíveis reações cruzadas com anticorpos de infecções anteriores ou devido a imunizações, gerando um resultado falso positivo para a identificação do arbovírus pesquisado (CHARREL, 2016; WILDER-SMITH, 2016); 3. Não avaliação dos genótipos circulantes e suas possíveis alterações relacionadas à gravidade de doenças.

Por detecção molecular, foi possível observar a circulação de CHIKV e do sorotipo DENV-1 no estado do Piauí durante o ano de 2016. A partir dos dados obtidos das dissertações no nosso laboratório, sabe-se que nesta região ocorre a co-circulação dos sorotipos do DENV (SANTOS, 2013; VALE, 2015; GARCÊS, 2016). Entretanto, a maioria dos pacientes desta investigação foram positivos para CHIKV. Este aumento da incidência pode ser atribuído à falta de imunidade populacional, pois este vírus emergiu no Brasil em 2014, acometendo indivíduos susceptíveis (FIGUEIREDO e FIGUEIREDO, 2014; TEIXEIRA et al., 2015; PETERSEN E POWERS, 2016; DA COSTA et al, 2017). Além disso, ambas as arboviroses compartilham o mesmo vetor, o que favoreceu a rápida expansão de CHIKV por diversas localidades, especialmente na região Nordeste (COSTA et al, 2017). É importante ressaltar que grande parte dos pacientes positivos nos testes moleculares estava no período de viremia e foram negativos para detecção de anticorpos anti-CHIKV IgM, o que comprova a limitação dos testes sorológicos diante de surtos e epidemias, contribuindo para a subnotificação de casos.

O sorotipo DENV-1 identificado em 2016, foi detectado em um paciente que estava infectado por CHIKV. Isto pode ter sido facilitado pela presença do vetor *Aedes aegypti*, que possui habilidade e competência para transmitir dois ou mais vírus em uma mesma região (RUCKERT et al., 2017). Um estudo recente mostrou que a infecção mista por CHIKV e DENV facilitou a replicação viral no vetor, o que pode alterar a infecciosidade ou a patogenicidade de ambos os vírus (LE COUPANEC et al., 2017). Casos de co-infecções são comuns em áreas endêmicas e tornam-se um fator preocupante devido ao possível agravamento das manifestações clínicas (CHAHAR et al., 2009; FURUYA-KANAMORI et al., 2016; MUKHERJEE et al., 2017). Neste estudo, o paciente co-infectado (30-16) evoluiu clinicamente para a fase crônica, apresentando algias nos dedos das mãos, joelhos e tornozelos que perduraram por aproximadamente sete meses.

No ano de 2017, foi possível observar a circulação dos sorotipos DENV-2 e DENV-4 bem como do CHIKV e, até o momento, não foi identificado nenhum caso de co-infecção. Dos 16 pacientes positivos nos testes moleculares, dois foram positivos para DENV (amostras 190-17 e 256-17) e 14 apresentaram-se infectados por CHIKV. Estes dados associados com o grande número de pacientes positivos nos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-CHIKV IgM (n=170), indicam a disseminação crescente deste arbovírus no estado.

A implementação das reações para o MAYV, a partir dos diferentes iniciadores selecionados (TALARMIN et al., 1998; BRONZONI et al., 2005) e construídos (BARROS, 2018), resultou na amplificação da amostra 25-15, sendo essa uma possível evidência do primeiro relato da circulação deste arbovírus no estado do Piauí. Entretanto, é necessário sequenciar esta amostra para constatar tal informação. Ao analisar as informações clínicas da paciente, foi verificado que além dos sintomas clássicos de infecção por arbovírus - febre, cefaleia, artralgia, mialgia, dor-retroorbital e exantema - esta apresentou manifestações neurológicas que incluíram paralisia dos membros superiores e inferiores. Os resultados dos testes moleculares realizados por Garcês (2016) revelaram que amostra 25-15 positivou, em 2015, para DENV-2 por RT-PCR descrita por Lanciotti e colaboradores (1992), o que configura um caso de co-infecção, sendo esta uma provável justificativa para o agravamento das manifestações clínicas.

O resultado obtido é relevante para a epidemiologia, pois pouco se conhece a respeito da circulação do MAYV na região Nordeste. Vale destacar que a possível circulação deste vírus pode ser subnotificada tanto pela indisponibilidade de testes específicos para sua detecção como pelos sintomas, que são semelhantes aos ocasionados pelo CHIKV e de outros arbovírus causadores de doença febril exantemática, como o DENV e ZIKV (NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014). Embora a descrição acima seja de um caso isolado que necessita de confirmação, é importante para que as autoridades de saúde pública mantenham uma vigilância epidemiológica que permita identificar as diferentes arboviroses de forma precoce. As ações de vigilância em saúde devem ser intensificadas, pois este vírus apresenta potencial epidêmico devido a possibilidade da sua transmissão ocorrer através de mosquitos do gênero *Aedes* (LONG et al., 2011).

A classificação epidemiológica e genética dos genótipos circulantes em determinada região torna-se essencial para monitorar a dinâmica de circulação e evolução adaptativa de determinada linhagem viral (FARIA et al. 2016). No presente estudo, foi possível verificar, através do sequenciamento parcial dos genes *E1* e *E2* de CHIKV, a circulação do genótipo ECSA no estado do Piauí entre os anos de 2016 e 2017. A análise filogenética mostrou que os vírus isolados no Piauí, apesar de estarem em outro ramo, se agruparam com outros isolados brasileiros da região Nordeste, apresentando uma relação de proximidade e ancestralidade com os isolados de Alagoas (2016) e da Bahia (2014), respectivamente. Nossos achados estão de acordo com dados da literatura que apontam que o genótipo ECSA foi identificado pela primeira vez no Brasil em 2014, no estado da Bahia, e desde então disseminou-se por vários estados da região Nordeste (Alagoas, Paraíba e Sergipe) e Sudeste (Rio de Janeiro), sendo isolado a partir de humanos infectados (TEIXEIRA et al., 2015; NUNES et al., 2015; DA COSTA et al., 2017; CUNHA et al., 2017).

Estudos de epidemiologia molecular são fundamentais para identificar possíveis variações virais que podem estar ligadas ao desenvolvimento de formas graves e fatais em algumas infecções (CARDONA-OSPINA et al., 2015). Sabe-se que a IOL, identificada pela primeira vez entre os anos de 2005-2006 nas ilhas do Oceano Índico, evoluiu a partir do genótipo ECSA e isto ocorreu devido a uma mutação na glicoproteína E1, que facilitou a infectividade e transmissão viral de CHIKV por *Aedes albopictus* (TSERSARKIN et al., 2007). Alguns estudos sugerem que esta linhagem apresenta maior grau de virulência, pois várias manifestações atípicas foram relatadas durante surtos nas Ilhas Reunião (ECONOMOPOULOU et al., 2007, LEMANT et al., 2008; BORGHERINI et al., 2007; JOSSERAN et al., 2006). Nossos dados de caracterização molecular de CHIKV no estado do Piauí mostraram que este genótipo não continha esta mutação.

Grande parte dos pacientes acometidos por CHIKV apresentam manifestações clínicas debilitantes que podem evoluir para a cronicidade, sendo a artralgia considerada o sintoma mais proeminente (HOARAU et al., 2010; KRUTIKOV e MANSON, 2016). A persistência das algias articulares por longos períodos acarreta em ônus social e econômico, pois afeta a qualidade de vida dos pacientes acometidos e compromete a produtividade laboral (SOUMAHORO et al., 2009).. Neste estudo, foi possível observar que, do total de pacientes contatados

(n=23), 60% (n=14), evoluíram para um quadro de artralgia crônica. Resultados semelhantes foram encontrados por Schilte e colaboradores (2013), que relatou em seu estudo que aproximadamente 60% dos pacientes acometidos por CHIKV apresentaram artralgia com evolução crônica.

Vários fatores de risco estão associados à persistência de artralgia por um período prolongado. Dentre eles, destacam-se: 1. idade maior que 40 anos (DUPUIS-MAGUIRAGA); 2. maior intensidade das dores durante a fase aguda (KRUTIKOV e MANSON, 2016). 3. presença de outras comorbidades (THIMBERVILLE et al., 2013). No presente estudo, a média de idade dos pacientes que desenvolveram artralgia crônica foi de 41 anos. Entretanto, sabe-se que a maioria dos pacientes idosos (com idade acima de 60 anos) mostram-se susceptíveis a desenvolver algias por períodos prolongados. Neste estudo, o paciente 81-16 (73 anos) apresentou dores articulares que perduraram por aproximadamente 12 meses. A evolução crônica de CHIKV em pacientes com idade avançada pode ser justificada pela baixa imunidade ou pela presença de outras comorbidades (como hipertensão, diabetes e doenças reumáticas) que são comuns nesta faixa etária (ECONOMOPOULOU et al., 2009; THIMBERVILLE et al., 2013; MARQUES et al., 2017).

Contudo, após confirmação da infecção, torna-se necessário realizar o acompanhamento da evolução clínica da doença, utilizando diferentes métodos de diagnóstico a fim de auxiliar no manejo e tratamento adequado do paciente bem como conhecer possíveis complicações ao longo do tempo. Em nosso estudo, resultados do hemograma da paciente 217-17 (66 anos), realizados na fase aguda evidenciaram leve trombocitopenia e linfopenia. Embora inespecíficas, estas alterações podem apresentar valor prognóstico diferencial indicativo de infecção viral, pois já foram relatadas em alguns estudos da literatura em indivíduos infectados por CHIKV (BORGHERINI et al., 2007; STAIKOWSKY et al., 2009; WIN et al., 2010).

Ademais, nas fases sub-aguda e crônica da doença, a realização de exames complementares - sobretudo a eletroneuromiografia e ultrassonografia das articulações - são extremamente relevantes, pois ambos apresentam valor diagnóstico que pode evidenciar desordens inflamatórias reumáticas decorrentes da infecção por CHIKV (JAVELLE et al., 2015). No presente estudo, os resultados dos

referidos exames de imagem da paciente 217-17 permitiram identificar o comprometimento musculoesquelético, sendo identificada a presença de polineuropatia periférica, sinovite e tenossinovite principalmente nas mãos, punhos, ombros e tornozelos. As duas últimas alterações também foram observadas nos estudos realizados por Mogami e colaboradores (2017; 2018), em análise ultrassonográfica das mãos, punhos e tornozelos de vários pacientes infectados por CHIKV, demonstrando a importância da realização destes exames no conhecimento dos danos e demais alterações articulares decorrentes da infecção por este vírus.

Apesar da algia articular ser mais severa em idosos e pacientes com outras co-morbidades, jovens e adultos tem sido uma população bastante afetada. No presente estudo, a idade dos pacientes 30-16, 52-16, 78-16, 91-16, 145-16, 184-16, 121-17, 188-17, 312-17 e 334-17 variou de 13 à 52 anos e todos apresentaram artralgia, que persistiu por um período maior que 3 meses (intervalo de 3 à 12 meses). Vale destacar que o paciente 30-16, que estava co-infectado por DENV e CHIKV, era uma paciente, 15 anos, que relatou a persistência de algias nas mãos e pernas por aproximadamente sete meses. Acredita-se que, em casos de co-infecção, haja aumento dos níveis de viremia, o que pode favorecer a gravidade da doença, como ocorre nas infecções por DENV ou facilitar a evolução clínica para uma fase de cronificação (VAUGHN et al., 2000; DHANOA et al., 2016).

Ao contrário do que ocorre em adultos, a artralgia crônica não é comum em crianças (GÉRARDIN et al., 2016). Os sintomas clínicos decorrentes da infecção por CHIKV em pacientes pediátricos geralmente perduram por aproximadamente uma ou duas semanas (RITZ et al., 2015). Em nosso estudo, os pacientes 31-16, 78-16 e 281-17 eram crianças, cuja idade variou de 6 a 13 anos e que tiveram evolução benigna, apresentando sintomas que perduraram por aproximadamente 15 dias. Acredita-se que isso possa estar associado a uma forte resposta imune inata que apresenta um papel protetor nestes indivíduos (SIMARMATA et al., 2016).

Em suma, a análise de informações clínicas e epidemiológicas juntamente com os resultados de testes sorológicos e moleculares possibilitou conhecer a morbidade ocasionada pela circulação de DENV e CHIKV no estado do Piauí. A análise filogenética de CHIKV permitiu identificar o genótipo ECSA no Piauí, que também foi detectado em outros estados da região Nordeste. A investigação do MAYV por métodos moleculares deve ser colocada em prática, já que os testes

sorológicos para pesquisa deste vírus não estão disponíveis nos serviços de saúde e muitos casos podem estar sendo diagnosticados erroneamente ou subnotificados devido similaridade das manifestações clínicas ocasionadas pelo CHIKV. Estes dados demonstram a importância da manutenção de um sistema de vigilância epidemiológica ativo, que permita investigar e monitorar de forma eficaz a entrada e circulação de arbovírus no território piauiense.

7. CONCLUSÃO

- Este estudo permitiu detectar, por técnicas moleculares, a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 bem como do CHIKV durante os anos de 2016 e 2017 no estado do Piauí.
- Um caso de co-infecção por DENV1 e CHIKV foi detectado. Este fato merece especial atenção, já que infecções simultâneas por diferentes arbovírus podem resultar em sobreposição de sintomas e conseqüente agravamento das manifestações clínicas, dificultando o diagnóstico diferencial e manejo adequado do paciente diante de surtos ou epidemias.
- A caracterização molecular de CHIKV contribuiu para identificar, pela primeira vez, a circulação do vírus e respectivo genótipo ECSA no estado do Piauí. Este resultado informa sobre a dinâmica da circulação deste arbovírus no território piauiense, reforçando a necessidade do monitoramento constante deste e de outros genótipos – com maior grau de virulência - que podem vir a circular.
- A análise filogenética possibilitou inferir que a circulação de CHIKV poderia estar ocorrendo no estado antes de sua primeira detecção, no ano de 2016, sugerindo que muitos casos podem ter sido diagnosticados incorretamente ou subnotificados devido à similaridade das manifestações clínicas com outras arboviroses – como Dengue e Zika – atualmente circulantes na região Nordeste. Este dado está em consonância com a atual situação de surtos ocorridos nos estados da Bahia (2014), Alagoas (2016), Paraíba (2016) e Pernambuco (2016), refletindo seu padrão de disseminação pela região Nordeste.
- As primeiras reações implementadas para investigar a circulação do MAYV resultaram na amplificação de uma amostra por este arbovírus, sugerindo a circulação no estado do Piauí. Este achado fornece informações que podem auxiliar a vigilância epidemiológica na correta investigação e monitoramento para o MAYV e outros arbovírus que podem circular silenciosamente no território piauiense.

- O acompanhamento da evolução clínica dos pacientes contactados, positivos nos testes moleculares para CHIKV, mostrou que aproximadamente 60% destes evoluíram para a fase crônica da doença e apresentaram algias articulares cuja duração variou de 4 a 12 meses. Informações clínico-laboratoriais de um paciente sem histórico de comorbidades evidenciaram um quadro característico de infecção por CHIKV, que evoluiu com artralgia debilitante, acompanhada por complicação de sinais sintomas.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro virus infection in Amazônia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.10, p. e1846, 2012.
- AITKEN, T. H. G. et al. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. **Science**, v.131, n. 3405, p. 986-986, 1960.
- ALBUQUERQUE, I. G. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.
- AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A. B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **Current Opinion in Virology**. v. 21, p. 146-150, 2016.
- ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **American Journal Tropical Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1012-1016, 1957.
- AÑEZ, G. et al. Circulation of different lineages of Dengue Virus Type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27459, 2011.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967-1976, 2007.
- ARPINO, C.; CURATOLO, P.; REZZA, G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 3, p. 121-129, 2009.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.
- ATKINS, G. J. The Pathogenesis of Alphaviruses. **ISRN Virology**, v. 2013, p. 1-22, 2012.
- AUGUSTE, Albert J. et al. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742, 2015
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793-806, 2010.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830, 2009.

BALE, J. F. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. **Pediatric Neurology**, v. 53, p. 3-12, 2015.

BALMASEDA, A. et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of Dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 449–56, 2006.

BANDEIRA, A. C. et al. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. **IDCases**, v. 5, p. 57-59, 2016.

BASTOS, M. S. et al. Short Report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n.4, p. 732-735, 2012.

BECK, C. et al. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 6050-6083, 2013.

BELL, J. R. et al. An evolutionary tree relating eight alphaviruses, based on amino-terminal sequences of their glycoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 15, p. 4702-4706, 1984.

BENCHIMOL, J. L. História da Febre Amarela no Brasil. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v.1, n.1, p.121-124, 1994.

BHATT, S.; et al. The Global Distribution and Burden of Dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.

BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927–1959, 2015.

BOLLATTI, M et al., Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 125-148, 2009.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401-1407, 2007.

BRÉHIN, A. C. et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 185-195, 2008.

BRONZONI, R. V. M. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BROUARD, C. et al. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. **Transfusion**, v. 48, n. 7, p. 1333-1341, 2008.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108–111, 2016.

CAFFERATA, M. L.; et al. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. **Value In Health Regional Issues**, v. 2, n. 3, p. 347-356, 2013.

CALISHER, C. H. et al. Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243-248, 1974.

CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A., and Brazil. In: **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**. Instituto Evandro Chagas, p. 32-41, 1998.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.

CÂMARA, F. P.; et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196, 2007.

CAMPOS, G. S. et al., 2017. First detection of Chikungunya virus in breast milk. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 2017.

CARDONA-OSPINA, J. A. Mortality and fatality due to Chikungunya virus infection in Colombia et al. **Journal of Clinical Virology**, v. 70, p. 14-15, 2015.

CAREY, D. E. et al. The 1964 Chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 4, p. 434-445, 1969.

CARMONA, R. J.; SHAIKH, S.; KHALIDI, N. A. Chikungunya Viral Polyarthrititis. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. 935-936, 2008.

CASSEB, A. R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CASTRO, J. A. F.; et al. Dengue Viruses Activity in Piauí, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1021-1023, 2003.

CAUCHEMEZ, S. et al., Local and regional spread of Chikungunya fever in the Americas . **Euro Surveillance**., v. 19, n. 28, p. 20854, 2015.

CAUSEY, A. R.; MAROJA, O.M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guamá in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 10, p. 17-23, 1957.

CHAHAR, Harendra S. et al. Co-infections with Chikungunya virus and Dengue virus in Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1077, 2009.

CHAMBERS, T. J.; et al. Flavivirus Genome Organization, Expression, And Replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177, 2009.

CHAO, D. Y. et al. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.2, p. 584-589, 2007.

CHARREL, R. N. Diagnosis of arboviral infections - A quagmire of cross reactions and complexities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, p. 11-12, 2016.

CHARREL, R. N. et al. Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 8, p. 769, 2007.

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

CHIA, P.Y.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Chikungunya fever: a review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 597-606, 2010.

CHOMPOOSRI, J. et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2016.

CHUNGUE, E. et al. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1877-84, 1995.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

COFFEY, L. L. et al. Chikungunya virus–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014.

COIMBRA, T. L. M. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221-224, 2007.

COLLUCCI, C. Brazilian health authorities on alert after rise in deaths from chikungunya. **BMJ**, v. 355, p. i6360, 2016.

CONWAY, M. J. et al. Role of the vector in arbovirus transmission. **Virology**, v. 1, p. 71-88, 2014.

COSTA, A. C. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 23, n. 10, p. 1472-1474, 2017.

CUNHA, M. S. et al. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1737, 2017.

CUNHA, R. V. et al. Retrospective study on Dengue in Fortaleza, state of Ceará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 2, p. 155–159, 1998.

DA COSTA, A. C. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n.10, p. 1742-1744, 2017.

DAEP, C. A. et al. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on Dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. **Journal of Neurovirology**, v. 20, n. 6, p. 539–560, 2014.

DE THOISY B. eta al. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Disease**. v. 9, p. 1326-1329, 2003.

DELANG, Leen et al. The viral capping enzyme nsP1: a novel target for the inhibition of Chikungunya virus infection. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31819, 2016.

DHANOVA, A. et al. Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters. Dhanoa et al. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 406, p. 1-14, 2016.

DICK, O. B. et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

DONALÍSIO, M. R. et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 1-6, 2017.

DONALÍSIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

DRUMMOND, A. J; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, n1, p. 214, 2007.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.

DYER, O. Yellow fever stalks Brazil in Zika's wake. **British Medical Journal**, v. 356, p. j707, 2017.

ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v.137, p. 534–41, 2009.

EGLOFF M. P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2757-2768.

ELNIFRO, E. M. et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017.

FARES, R. C. G.; et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2015.

FARIA, N. R. et al. Epidemiology of Chikungunya virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLOS Currents Outbreaks**, v. 1, p. 2016.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 311, p. 1-8, 2013.

FERREIRA, G. F. et al., Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 546-554, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 233–234, 2015.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

FORRESTER, N. L. et al. Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2729–2738, 2012.

FROLOVA, E. L. et al. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11679-11695, 2010.

FURUYA-KANAMORI, L. et al. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 84, p. 1-11, 2016.

GAEDIGK-NITSCHKO, K. et al. Site-directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 282-291, 1990.

GARCÊS, T. C. C. C. **Caracterização molecular de Dengue vírus circulantes e investigação de Flavivirus emergentes no Estado do Piauí**. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

GARMASHOVA, N. et al. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2472-2484, 2007.

GAROFF, H.; SIMONS, K.; RENKONEN, O. Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus. **Virology**, v. 61, n. 2, p. 493-504, 1974.

GAROFF, H.; SJÖBERG, M.; CHENG, R. H. Budding of alphaviruses. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 103-116, 2004.

GASQUE, P. et al. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. **Vector borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 241–9, 2015.

GAUTRET, P.; SIMON, F. Dengue, chikungunya and Zika and mass gatherings: What happened in Brazil, 2014. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v. 14, n. 1, p. 7-8, 2016.

GAY, N. et al. Seroprevalence of Asian Lineage Chikungunya Virus Infection on Saint Martin Island, 7 Months After the 2013 Emergence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 393-396, 2016.

GÉRARDIN, P. et al. Chikungunya Fever During Pregnancy and in Children: An Overview on Clinical and Research Perspectives. In: **Current Topics in Chikungunya**, InTech, cap. 2, 2016.

GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child Chikungunya virus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 7, p. e2996, 2014.

GÉRARDIN, P. et al. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 5, 2011.

GOMEZ DE CEDRÓN, M. et al. RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. **FEBS Letters**, v. 448, n. 1, p. 19-22, 1999.

GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111-124, 2010.

GOULD, E.A; SALOMON, T. Patogenic Flaviviruses. **Lancet**, v. 371, p. 500-09, 2008.

GROOTH, V. H. Virus isolations from forest mosquitos in San Vicente de Chucuri, Colombia. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**.v. 10, p. 397-402. 1961.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2001.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUZMAN, M. G. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 223–227, 2002.

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue infection. **Nature Reviews – Disease Primers**, v. 2, n. 16055, p. 1-25, 2016.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, 2015.

GUZMAN, M.; KOURI, G. Dengue: um update. **The Lancet**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HALSEY, E.S. et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerging Infectious Disease**, v. 19, n. 18, p. 39-42, 2013.

HALSTEAD, S. B. Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n, 4, p. 557-561, 2015.

HALSTEAD, S. B.. Dengue. **Lancet**, v.370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HASSING R. et al. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **Journal of Infection**; v. 61, n. 34, p. 3-5, 2010.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, 2012.

HIGGS, S; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HOARAU, J. J. et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.

HOCH, A. L. et al. An outbreak of *Mayaro virus* disease in Belterra, Brazil. Entomological and ecological studies. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 30, n. 3, p. 689-698, 1981.

HOLLIDGE, B. S.; GONZÁLEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 428-442, 2010.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

HUANG, Y. J. S. et al. Flavivirus-mosquito interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.

IZURIETA, R. O. et al. Hunting in the rainforest and *Mayaro virus* infection: An emerging alphavirus in Ecuador. **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 3, p. 317-23, 2011.

JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003603, 2015.

JOHANSSON, M. A. Chikungunya on the move. **Trends in parasitology**, v. 31, n. 2, p. 43-45, 2015.

JOHN, A. L. S. et al. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 420-426, 2013.

JOHNSON, N. et al. Rapid Molecular Detection Methods for Arboviruses of Livestock of Importance to Northern Europe - **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol. 2012, p. 1-18, 2012.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009.

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion island. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006.

JULIANO, S. A.; LOUNIBOS, L. F. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. **Ecology Letters**, v. 8, n. 5, p. 558-574, 2005.

KAM, Y. W. et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1186–1196, 2009.

KARBAAT, J.; Jonkers, A.H.; Spence, L. Arbovirus infections in Dutch military personnel stationed in Surinam: a preliminary study. **Tropical and Geographical Medicine**. v. 16 p. 370-376, 1964.

KASHYAP, R. S. et al. Diagnosis of Chikungunya Fever in an Indian Population by an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Protocol Based on an Antigen Detection Assay: a Prospective Cohort Study. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n. 2, p. 291–297, 2010.

KHAN, M. et al. Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 7, p. 1169-1175, 2014.

KHIN, M. M, THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**.32, n. 3, p. 590–4, 1983.

KIELIAN, M.; CHANEL-VOS, C.; LIAO, M. Alphavirus entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 2, n. 4, p. 796-825, 2010.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*, **Elife**, v. 4, p. e08347, 2015.

KRUTIKOV, M., MANSON, J. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 7, n. 4, p. e0033, 2016.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, p. 717-725, 2002.

KUHN, R. J. Togaviridae: The Viruses and Their Replication, p 1001– 1022. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed), **Fields Virology**, 5th ed., 2007.

KUMAR C. V. M. N, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus from Andhra Pradesh, India and phylogenetic relationship with Central African isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v.126, p. 534-40, 2007.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 Chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1945-1948, 2008.

KUMAR, S. et al. Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of Chikungunya virus: potential use in basic research. **Archives of Virology**, v. 160, n. 11, p. 2749-2761, 2015.

KUMAR et al. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-41, 1998.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of Dengue. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.

LAI, C. Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of Dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6631-6643, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of Dengue-3 viruses. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 1, p. 65-75, 1994.

LANCIOTTI, R. S. Molecular evolution and phylogeny of Dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2279-2284, 1997.

LANCIOTTI, R. S.; et. al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R. S.; VALADERE, A. M. Transcontinental Movement of Asian Genotype Chikungunya Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n. 8, p. 1400-1401, 2014.

LE COUPANEC, A. et al. Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. e1708, 2017.

LEBRUN, G. et al. Guillain-Barré syndrome after chikungunya infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495-497, 2009.

LEDNICKY, J. et al. *Mayaro Virus* in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 10, n. 4, 2016.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006, **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536-2541, 2008.

LENGLET, Y. et al. Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the

Reunion Island outbreak. **Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 35, n. 6, p. 578-583, 2006.

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

LEUNG, J. Y. S.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in Virology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

LEWIS, J. A. et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 216-224, 1993.

LI, L. et al. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 705-708, 2010.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.

LILJESTRÖM, P. et al. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. **Journal of Virology**, v. 65, n. 8, p. 4107-4113, 1991.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 1-7, 2016.

LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae: the viruses and their replication. In KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, Philadelphia, 5th Edition, p. 1101– 1152, 2007.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Molecular Biology of Flavivirus. In: Chambers T.J. & Monath T.P. **Advances in Virus Research: The Flavivirus:structure, replication and evolution**. California, Academic Press. v. 59, p. 23-61, 2003.

LIU, C. Y.; KIELIAN, M. E1 mutants identify a critical region in the trimer interface of the Semliki forest virus fusion protein. **Journal of Virology**, v. 83, n. 21, p. 11298– 11306, 2009.

LOBIGS, M.; Z., H. X.; GAROFF, H. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. **Journal of Virology**, v. 64, n. 9, p. 4346-4355, 1990.

LOEWY, A. et al. The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. **Journal of Virology**, v. 69, n. 1, p. 469-475, 1995.

LONG, K. C., et al. Experimental transmission of *Mayaro virus* by *Aedes aegypti*. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 750-757, 2011.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of Chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, n. June, p. 165–174, 2015.

LUO, D. et al. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, n. 118, p. 148-158, 2015.

LUSA, S.; GAROFF, H.; LIUESTRÖM, P. Fate of the 6K membrane protein of Semliki Forest virus during virus assembly. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 843-846, 1991.

MACKAY, I. M. E.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, v. 18, n. 1, p. 724-734, 2016.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 1-8, 2015.

MARQUES, C. D. L. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1– Diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, S2, p. 421-437, 2017.

MARTIN, D. A. et al. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1823-1826, 2000.

MARTÍN, J. L. S. et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 128–135, 2010.

MARTINA, B. E. E. et al. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

McINERNEY, G. M. et al. Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity. **Virology**, v. 325, n. 2, p. 200-206, 2004.

MESSINA, J. P.; et al. Global spread of Dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Molecular Typing of Dengue Virus Type 2 in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.1, p.17-21, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletins sobre Chikungunya, 2001-2014. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica Mayaro** (2017). Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em 21/02/2018

MIR, D. et al. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7385, 2017.

MOGAMI, R. et al. Ultrasound of ankles in the diagnosis of complications of chikungunya fever. **Radiologia Brasileira**. v. 50, n. 2, p. 71-75, 2017.

MOGAMI, R. et al. Ultrasonography of Hands and Wrists in the Diagnosis of Complications of Chikungunya Fever, **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 37, n. 2, p. 511-520, 2018.

MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 54, 2010.

MONATH, T. P. O desafio da Febre Amarela. In: **Quadros CA. Vacinas**. São Paulo, editora Roca, p. 67-76, 2008.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13,n. 1, p.176-178, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 921, 2003.

MONTEIRO, E. S. C.; et al. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí – Brasil, 2002 a 2006. **Epidemiologia em Serviços de Saúde**, v. 18, n. 4, p. 365-374, 2009.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

MOTA, M. T. O. et al. Complete genome sequence of Mayaro virus imported from the Amazon basin to São Paulo state, Brazil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. e01341-15, 2015.

MOTA, M. T. O. et al. Mosquito-transmitted viruses the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 171, p. 1-13, 2016.

MOURÃO, M.P.G. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

MUKHERJEE, S. et al. Evidence of dengue and Chikungunya virus co-infection and circulation of multiple Dengue serotypes in a recent Indian outbreak. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, p. 1-7, 2017.

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

MUKHOPADHYAY, S. et al. A Structural Perspective Of The Flavivirus Life Cycle. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MURPHY, F. A. et al. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of vírus**. New York: Ed. Spring-Verlag, 1995, p. 415–421.

MURPHY, F.A. Emerging Zoonosis. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 4, p.429-435, 1998.

NAKKHARA, P. et al. Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 12, p. 789-796, 2013.

NAPOLEÃO-PEGO, P. et al. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, p. 00018, 2014.

NASAR, F. et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 36, p. 14622-14627, 2012.

NASCI, R. S. Movement of Chikungunya virus into the Western hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394–1395, 2014.

NIMMANNITYA, S. et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-64. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 6, Pt. 1, p. 954-71, 1969.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific Dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NJENGA, M. K. et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2754-2760, 2008.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, n. 5, p. 358–63, 2007.

NSOESIE, E. O. et al. Global distribution and environmental suitability for Chikungunya virus, 1952 to 2015. **Euro surveillance**, v. 21, n. 20, p.1-22, 2016.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.

NUNES, M. R. T. et al. Molecular Epidemiology of Group C Viruses (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) Isolated in the Americas, **Journal of Virology**, v. 79, n. 16, p. 10561-10570, 2005.

OHAINLE, M.; et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 114, p. 114-128, 2011.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Yeimer; PATIÑO-BARBOSA, Andrés Mauricio; RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. **F1000 Research**, v. 6, P. 398, 2017.

OSANAI, C. H. et al. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.25, n.1, p. 53-4, 1983.

PARDIGON, N. The biology of Chikungunya: a brief review of what we still do not know. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 2, p. 127-132, 2009.

PAROLA, P. et al. Novel Chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.

PARREIRA, R. et al. Dengue virus serotype 4 and Chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 10, p. 20730, 2013.

PATIL, J. A. et al. Influence of evolutionary events on the Indian subcontinent on the phylogeography of Dengue type 3 and 4 viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1759-1769, 2012.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p.125-133, 2015.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 30-37, 2010.

PERÄNEN, J. et al. The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. **Virology**, v. 208, n. 2, p. 610-620, 1995.

PETERSEN, L. R.; BUSCH, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 4, p. 495-503, 2010.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology [version 1; referees: 2 approved], **F1000 Faculty Reviews**, v. 82, p. 1-8, 2016.

PFEFFER, M.; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 35, 2010.

PIAUI, Secretaria do Estado da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2016. Boletim Epidemiológico, v. 50, p. 1-5, 2017.

PIERSON, T.C; DIAMOND, M.S. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion Virology**, v. 2, n. 2, p. 168-175, 2012.

PINHEIRO, F.P. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674-681, 1981.

PINHEIRO, F. L.; LEDUC, J. W. Mayaro virus disease T.P. Editora Monath, The arboviruses: epidemiology and ecology, **Boca Raton**, v.3, p. 137-150, 1998.

PORTER, K. R. et al. A serological study of Chikungunya Virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 35, n. 2, p. 408-415, 2004.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118-10131, 2001.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

POWERS, et al. Genetic relationships among Mayaro and Una Viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461-469, 2006.

PRAT, C. M. et al. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for Chikungunya virus. **Emerging Infectious Disease**, v. 20, n. 12, p. 2129-32, 2014.

PRESTI, A. L. et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925-932, 2014.

PRESTI, A. L. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 270-278, 2016.

PULMANAUSAHAKUL, R. et al. Chikungunya in Southeast Asia: understanding the emergence and finding solutions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. e671-e676, 2011.

Q. ASHTON ACTON **Alphavirus - Advances in Research and Treatment**, 2012 ed., ScholarlyBrief, 2012, 59p.

QUEYRIAUX, B. et al. Chikungunya in Europe. **The Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 723-724, 2008a.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of Chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2-3, 2008b.

RAJAPAKSE, S.; R, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of Chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89-96, 2010.

RAMBAUT, A; DRUMMOND, A. J. TreeAnnotator [Internet]. 2015. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk>

RAMBAUT, A. FigTree [Internet]. 2014. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

RATHORE, A. P. S.; NG, M. L.; VASUDEVAN, S. G. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2 α phosphorylation. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

RAVI, V. Re-emergence of Chikungunya virus in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 83-84, 2006.

REITER, P. et al.. Aedes albopictus as an epidemic vector of Chikungunya virus: another emerging problem?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 463-464, 2006.

REZZA, G. et al. Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of Dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Américas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244-251, 1997.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of Dengue virus. **Advances in Virus Research**, v. 59, n. 1, p. 315-341, 2003.

RIKKONEN, M. et al. ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. **Journal of Virology**, v.68, n.9, p. 5804-5810, 1994.

RITZ, M et al. Chikungunya in Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 34, n. 7, p. 789-791, 2015.

RIVINO, L; LIM, M. Q. CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. **Immunology**, v. 150, n.2, p. 146-154, 2017.

ROBILLARD, P. Y. et al. Vertical maternal fetal transmission of the Chikungunya virus. Ten cases among 84 pregnant women. **Presse Medicale**, v. 35, n. 5, p. 785-788, 2006.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

RODRIGUES, S. G. et al. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated

prevalence of antibodies in horses. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.1, n.1, p. 81–86, 2009.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; ANAYA, J. Impact of emerging arthritogenic arboviruses in Colombia and Latin America. **Revista Colombiana de Reumatología**, v. 23, n. 3, p. 145-147, 2016.

ROMANO, C. M. et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PLOS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11811, 2010.

RUBACH, Jon K. et al. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 201-208, 2009.

RUCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 8, p. 15412, 2017.

RUIZ-GUILLEN, M. et al. Capsid-deficient alphaviruses generate propagative infectious microvesicles at the plasma membrane. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-20, 2016.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483-2500, 2015.

RUSSO, A. T.; WHITE, M. A.; WATOWICH, S. J. The crystal structure of the Venezuelan equine encephalitis alphavirus nsP2 protease. **Structure**, v. 14, n. 9, p. 1449-1458, 2006.

RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p. 130–151, 2012.

RYMAN, K. D.; KLIMSTRA, W. B. Host responses to alphavirus infection. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 27–45, 2008.

SAM, I. C. et al. Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. **Vector Borne Zoonotic Disease**. v.15, n. 4, p. 223-30, 2015.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue virus no Piauí: busca de sorotipos circulantes**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

SANZ, M. A. et al. Interfacial Domains in Sindbis Virus 6K Protein Detection and Functional Characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 2051-2057, 2003.

SANZ, M. A.; CARRASCO, L. S. Virus Variant with a Deletion in the 6K Gene Shows Defects in Glycoprotein Processing and Trafficking: Lack of Complementation by a Wild-Type 6K Gene intrans. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7778-7784, 2001.

SARDI, S. I. et al. Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348-2353, 2016.

SAWICKI, D. L. et al. Specific Sindbis virus-coded function for minus-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, v. 39, n. 2, p. 348-358, 1981.

SCATURRO, P. et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLOS Pathogens**, v.11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.

SCHLESINGER, J. J. et al. Protection of mice against Dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **The Journal of General Virology**, v. 68, n. 3, p. 853-857, 1987.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of Chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333-337, 2008.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1189-1193, 2007.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and Dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

SHAH, K. V.; GIBBS JR. C. J.; BANERJEE, G. Virological Investigation of the Epidemic of Haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of Three Strains of Chikungunya Virus. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 52, p. 676-683, 1964.

SIMARMATA, D. et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. **Scientific Reports – Nature**, v. 6, p. e26097, 2016.

- SINGH, S. S. et al. Four cases of acute flaccid paralysis associated with Chikungunya virus infection. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 09, p. 1277-1280, 2008.
- SIQUEIRA JR, J. B. et al. Dengue no Brasil: tendências e mudança na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. **Ministério da Saúde**, 2011.
- SISSOKO, D. et al. Seroprevalence and risk factors of Chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. **PloS One**, v. 3, n. 8, p. e3066, 2008.
- SLEGGERS, C.A, Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: is there a risk for attendants to the 2014 FIFA world cup? **Journal of Clinical Virology**. v. 60, n. 3, p. 317-319, 2014.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-197, 2009.
- SOUMAHORO, M. K. et al. 2009 - Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. **PLOS ONE**, v. 4, n 11, p. e7800, 2009.
- SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. e89, 2007.
- SOUZA, T. et al. First Report of the East-Central South African genotype of Chikungunya virus in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Currents Outbreaks**, v. 9, ed. 1, 2017.
- STAIKOWSKY, F. et al. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005–2006 outbreak. **PloS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7603, 2009.
- STANAWAY, J. D. et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 712-716, 2016.
- STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.
- STUCKY, B. J. Seqtrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 23, n. 3, p. 90–93, 2012.
- SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D. Chikungunya: an overview. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 443-449, 2008.

- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic Alphaviruses an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.
- SUTHAR, M. S. et al. Identification of adult mouse neurovirulence determinants of the Sindbis virus strain AR86. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 4219-4228, 2005.
- TALARMIN, A. et al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification and seroprevalence. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 59, p. 452-456, 1998.
- TAMURA, K; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.
- TARAPHDAR, D. et al. Short Report: A Comparative Study of Clinical Features between Monotypic and Dual Infection Cases with Chikungunya Virus and Dengue Virus in West Bengal, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 720–723, 2012.
- TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South african genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 906-8, 2015.
- TENG, T. S. et al. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. **Future Virology**, v. 6, n. 8, p. 975-984, 2011.
- TERZIAN, A. C. et al. Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 92, p. 401-404. 2015.
- TESH, R. B. et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 67-73, 1999.
- TESH, R. B. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 740, p.129–137, 1994.
- THEILACKER, C. et al. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates, **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 369, 2013.
- THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.
- TOMAR, S. et al. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. **Journal of virology**, v. 80, n. 20, p. 9962-9969, 2006.

TORRES, J. R. et al. Congenital and perinatal complications of Chikungunya fever: a Latin American experience. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 85-88, 2016.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, 2007.

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and Chikungunya virus emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 16, p. 143-150, 2016.

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002412, 2011.

TUITTILA, M. T. et al. Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 74, n. 10, p. 4579-4589, 2000.

TWIDDY, S. et al. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 122-129, 2003.

VALE, V. S. **Análise Molecular e Considerações Filogenéticas sobre o Dengue vírus**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VASCONCELOS, H. B. et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, 2009.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. A large epidemic of Dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 3, p.253-255, 1995.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. & TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém, Instituto Evandro Chagas, p. 72-99, 1998.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saude Pública**, v. 17 (suplemento), n. 1, p. 155-164, 2001.

VASILJEVA, L. et al. Regulation of the sequential processing of Semliki Forest virus replicase polyprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41636-41645, 2003.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2–9, 2000.

VIEIRA, M. A. C. S. et al. Case Report: West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Reported in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 5, p. 377-379, 2015.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497-6504, 2010.

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.

WALLING, A. D.; DICKSON, G. Guillain-Barré syndrome. **American Family Physician**, v. 87, n. 3, p. 191-197, 2013.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.

WEAVER, S. C. et al. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Research**, v. 94, n. 3, p. 242-257, 2012.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789-801, 2004.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, 2015.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of Dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.

WEISS, B. et al. Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. **Journal of Virology**, v. 63, n. 12, p. 5310-5318, 1989.

WIN, M. K. et al. Chikungunya fever in Singapore: acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, n. 2, p. 111-114, 2010.

WHITEHORN, J; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of Dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-7228, 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization, 2009. 160 p.

WIELANEK, A. C. et al. Guillain-Barré syndrome complicating a Chikungunya virus infection. **Neurology**, v. 69, n. 22, p. 2105-2107, 2007.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 101 - 106, 2017.

ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic Alphaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 281-286, 2010.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZÉ-ZÉ, L. VIROSES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS. In: **Doenças Associadas a Artrópodes Vetores e Roedores**, Lisboa, 2014, cap. II, p. 45-51.

ZHANG, D. et al. Molecular cloning, overproduction, purification and biochemical characterization of the p39 nsp2 protease domains encoded by three alphaviruses. **Protein Expression and Purification**, v. 64, n. 1, p. 89-97, 2009.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–2613, 2003.

APÊNDICE I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira e Prof. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, nº 2819, Bairro Reis Velloso, CEP 64204-035, Parnaíba, Piauí, Brasil. Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99920-3470 / (86) 99401-3035

ESCLARECIMENTOS:

Prezado colaborador(a), você está sendo convidado(a) a participar como **VOLUNTÁRIO** desta pesquisa, que irá contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado do Piauí, bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído na pesquisa se apresentar sintomatologia sugestiva de dengue/outras arboviroses, e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena quantidade de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue, mas os técnicos disponíveis para o procedimento são bem treinados e credenciados, além de utilizarem todo o material devidamente estéril que forneça segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecido pelo pesquisador.

Os resultados desta pesquisa serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí, e quais condições relacionadas ao hospedeiro diante da Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade da infecção. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e sua decisão não acarretará em qualquer prejuízo na continuidade do seu atendimento e tratamento no serviço de saúde. Se concordar em participar do estudo, suas informações pessoais (nome, endereço, telefone, dentre outras) serão mantidas em sigilo absoluto. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe da pesquisa e os representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações pessoais.

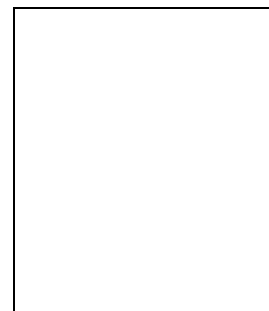
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, portador(a) da cédula de identidade/CPF de número _____, abaixo assinado, declaro que concordo em participar da pesquisa/estudo “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”, como **VOLUNTÁRIO**. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa. Eu discuti com o Dr. Gustavo Portela Ferreira / Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira ou qualquer um dos demais membros da equipe de pesquisadores sobre minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os

propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, e as garantias de sigilo e de esclarecimentos. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Concordo VOLUNTARIAMENTE em participar da pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento / tratamento neste serviço de saúde.

E por estar de acordo, assino o presente termo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .



Assinatura do sujeito participante ou responsável legal

Impressão Digital

.....
Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

.....
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .

Gustavo Portela Ferreira

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com;
Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI – *Campus* Ministro Reis Velloso
Endereço: Avenida São Sebastião, 2819 – Bloco 16 – Sala 05 – Bairro Reis Velloso
CEP: 64202-020 – Parnaíba-PI, Fone: (86) 3323-5251
E-mail: cep.ufpi.cmr@gmail.com

APÊNDICE II

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

PACIENTE/AMOSTRA Nº _____ Nº CARTÃO DO SUS: _____

AMOSTRAS COLETADAS: _____

DATA DO ATENDIMENTO: _____ LOCAL DE ATENDIMENTO: _____

NOME: _____ TEL: _____

SEXO: Masculino Feminino DATA DE NASCIMENTO: _____

NOME DA MÃE: _____

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____ BAIRRO: _____ CEP: _____

MUNICÍPIO: _____ UF: _____

Adulto Criança (até 12 anos) Idoso (acima de 60 anos) Gestante: 1º T 2º T 3º T

Início dos sintomas: _____ dias. Febre: há _____ dias.

SINAIS E SINTOMAS PRESENTES:

- Cefaleia Artralgia Náuseas Dor retroorbitaria Mialgia Icterícia
 Prostração Diarreia Vômitos Exantema: com prurido sem prurido
 Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses.
 Dor abdominal Choro persistente/irritabilidade
 Outros: _____

COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES:

- Hipertensão Arterial Doença Hematológica _____
 Diabetes Mellitus Doença Cardiovascular _____
 DPOC Doença Autoimune Insuficiência Renal Doença ácido-péptica Hepatopatia
 Anemia Falciforme
 Outras: _____
 Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

AValiação QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE:

- Comprometimento respiratório Hemorragia grave com ou sem sinais de choque
Hemorragia presente Não Sim. Qual (is)?
 Conjuntival Epistaxe Gengivorragia Petéquias Equimose
 Metrorragia Hematúria Hematêmese Melena Hemoptoicos

SINAIS DE CHOQUE:

- Pulso rápido e fino Extremidades frias Pele pálida e úmida Enchimento capilar lento (> 2 seg.)
 Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg) Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)
 Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave
 Outros: _____

APÊNDICE III

QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CRÔNICAS

Nome: _____

Idade: _____ Profissão: _____

Data da coleta: _____

Primeiro contato: _____ Segundo Contato(Atual): _____

Criança () Jovem () Adulto () Idoso () Gestante () _____ Puerpério ()

SINTOMAS E DADOS CLÍNICOS DE FASE CRÔNICA

1. Tempo de duração dos sintomas (semanas ou meses): _____

2. Rigidez matinal (>30 min): sim () não ()

3. Sintomas de fase crônica: _____

4. Principais membros/sítios anatômicos/articulações acometido(a)s:

Dedos das mãos () Mãos () Punhos () Cotovelos () Ombros ()

Quadril () Joelhos () Tornozelos () Pés () Dedos dos pés ()

Dores na coluna () -----> cervical () Torácica () Lombar ()

4.1 - Outras membros/articulações acometidos _____

5. Intensidade da artralgia: Fraca () Moderada () Forte ()

6. Padrão de acometimento articular: simétrico () assimétrico ()

7. Presença de edema/inchaço nos membros ou articulações: não () sim ()

Quais membros _____

7.1 - Edema com vermelhidão: sim () não ()

7.2 - Edema com calor sobre a articulação: sim () não ()

8. Dormência nos membros: sim () não ()

9. Queixas: Permanente () Recidivante ()

Outros sintomas Clínicos: mialgia () manifestações cutâneas/ coceira/ vermelhidão () falta de concentração () depressão () _____

10. Limitação dos movimentos articulares ao realizar atividades cotidianas: sim () não ()

11. Uso de medicamentos para combater as dores ocasionadas por CHIKV: sim () não ()

-Quais _____