



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

JEAN MOISÉS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS DE
BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DO VÍRUS MAYARO (MAYV) BASEADAS
NA COMPETIÇÃO ENTRE O AZUL DE METILENO E OLIGONUCLEOTÍDEOS**

Recife
2020

JEAN MOISÉS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS DE
BIOSENSORES PARA DETECÇÃO DO VÍRUS MAYARO (MAYV) BASEADAS
NA COMPETIÇÃO ENTRE O AZUL DE METILENO E OLIGONUCLEOTÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Dr. José Luiz de Lima-Filho

Coorientadora: Danielly Santos Campos-Ferreira

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Ferreira, Jean Moisés

Desenvolvimento de plataformas eletroquímicas de biossensores para detecção do vírus Mayaro (MAYV) baseadas na competição entre o azul de metileno e oligonucleotídeos / Jean Moisés Ferreira - 2020.

90 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima-Filho

Coorientadora: Danielly Santos Campos-Ferreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Genossensor 2. Eletrodos modificados 3. Arboviroses
I. Lima-Filho, José Luiz de (Orientador) II. Campos-Ferreira, Danielly Santos (Coorientadora) III. Título

616.91852 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-162

JEAN MOISÉS FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS DE
BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DO VÍRUS MAYARO (MAYV) BASEADAS
NA COMPETIÇÃO ENTRE O AZUL DE METILENO E OLIGONUCLEOTÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de imunopatologia Keizo Asami – LIKA, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Analisada/Aprovada em:06/05/2020

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. José Luiz de Lima-Filho (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco - *Campus* Recife (UFPE)

Profª Drª. Danielly Bruneska Gondim Martin (Membro interno)

Universidade Federal de Pernambuco - *Campus* Recife (UFPE)

Profª Drª. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo (Membro externo)

Universidade Federal de Alagoas - *Campus* Arapiraca (UFAL)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a minha família, amo tanto, tanto, tanto vocês.

A todos as pessoas mais que especiais que tive a honra de conhecer, conviver e amar.

Ao professor e orientador José Luiz de Lima Filho, por aceitar orientar um desconhecido, como também pela paciência e compreensão.

À Danielly Santos Campos Ferreira, por toda coorientação e ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório Biotecnologia no LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco, que tanto me ajudaram, num esforço sem medidas e me apoiaram ao longo da confecção deste trabalho. Meu sincero e profundo obrigado.

Aos meus colegas do Laboratório Biologia Molecular e Expressão Gênica, da Universidade Federal de Alagoas, que possibilitaram que eu encontrasse o caminho da ciência e desse meus primeiros passos.

Aos meus colegas cientistas do Laboratório de Toxicologia Vegetal e Genética, da Universidade Federal do Espírito Santo, que abrangeram minha visão e meu conhecimento.

Aos professores do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da Universidade Federal de Pernambuco, que contribuíram para a minha formação como pós-graduado.

Á todos os servidores, pois seus diversificados trabalhos, do mais simples ao mais complexo, possibilitaram esse estudo.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

“... Um trabalho científico não deve ser avaliado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele precisa ser feito por si só, pela beleza da ciência.”

Marie Curie (1867–1934)

RESUMO

O Mayaro vírus (MAYV) é um arbovírus *Alphavirus*, família *Togaviridae*, capaz de infectar humanos, causando a Febre do Mayaro. Não há registro de mortes pela infecção do MAYV, contudo, durante a fase crônica da infecção pode-se observar artralgia e artrite persistentes, que debilitam e diminuem qualidade de vida dos pacientes. Como observado em outras infecções arbovirais, o MAYV pode alcançar significativa parcela da população e desencadear surtos que afetem variadas regiões do mundo. Frente a isso, faz-se necessário o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para detecção do MAYV que sejam de fácil manuseio, baixo custo e apresentem resultados rápidos. Desta forma, o presente trabalho objetivou a construção de plataformas biossensoras baseadas em genossensores eletroquímicos capazes de detectar o Mayaro vírus. Utilizando-se ferramentas de bioinformática, uma sequência específica do MAYV foi selecionada e usada para sintetizar duas sondas específicas, uma com esqueleto de fosfato (PO₄-ssDNA) e outra com modificação NH₂ na terminação 3' (NH₂-ssDNA – sonda aminada); e para verificar a capacidade de interação da sonda com seu alvo, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose. O design experimental consistiu na construção de seis plataformas biossensoras em eletrodos *Screen Printed*. Os eletrodos foram modificados usando as técnicas de deposição de monocamadas e voltametria cíclica, onde, por eletropolimerização, foram formados polímeros dos aminoácidos cisteína (PolyCys) e ácido glutâmico (PolyGlutAc), e por eletrodeposição foram formadas nanopartículas de prata (AgNP). A imobilização das sondas foi efetuada por adsorção física, *Layer-by-Layer*, e as mensurações foram conduzidas por meio de voltametria de pulso diferencial. De acordo com a análise da eletroforese, ambas sondas mostraram capacidade de anelamento com o alvo. As eletrossínteses foram realizadas com sucesso, contudo, os sistemas com AgNPs não diferiram dos que não as tinham. Os maiores picos foram observados após as imobilizações das sondas. Os sistemas 4 (monocamada de cisteína + sonda aminada) e 6 (poliácido glutâmico + sonda aminada) mostraram os mais altos picos de corrente. O sistema 6 apresentou melhores resultados em comparação aos outros sistemas, permitindo diferenciar todos os passos da construção da plataforma eletroquímica, sendo, portanto, mais promissor para construção de biossensores portáteis e sensíveis ao Mayaro vírus.

Palavras-chave: Genossensor. Eletrodos modificados. Arbovirose. Diagnóstico.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is an *Alphavirus* able of infecting humans, developing a disease called Mayaro Fever, with an acute phase marked by general symptoms and hemorrhages, and a chronic phase with debilitating arthralgia and arthritis, which affect the quality of life of patients. The quantitative number of disease cases is unknown and researches suggest *Aedes* mosquitoes as possible transmitters of MAYV, allowing the start of outbreaks. In this scenario, the diagnoses used are essential to understand the current status of this disease, as well as assist in possible future disease outbreaks. Current diagnoses can show cross-reactivity, high cost use and long preparation time, making its use on a large scale unfeasible. In contrast, alternative diagnoses based on biotechnology, such as electrochemical genosensor, are tools able of detecting analytes such as viral DNAs or RNAs. To develop these devices, several changes can help immobilize DNA probes, essential to detect the analyte. The objective of this work was the production of biosensory platforms that can be used in electrochemical genosensors able of detecting the Mayaro virus. A specific sequence was chosen using bioinformatics tools, two probe forms were produced: with and without NH₂ termination. The experimental design of six platforms was conducted using Screen Printed carbon electrodes and Ag/AgCl (WE, CE and RE, respectively). The electrodes were modified using monolayer deposition and electric voltammetric techniques, where, by electropolymerization were formed cysteine (PolyCys) and glutamic acid (PolyGlutAc) amino acid polymers, and silver nanoparticle (AgNP) by electrodeposition. The probes were immobilized by physical adsorption and *Layer-by-Layer*. Measurements were performed using differential pulse voltammetry. The probe showed specificity by electrophoresis. Electrosynthesis was performed successfully; however, systems with AgNPs did not differ from those that did not have Ag nanoparticles. The greatest peaks were observed after immobilization of the probes. Systems 4 (cysteine monolayer+amino probe) and 6 (polyglutamic acid+amino probe) showed the highest current peaks, and were able to detect the analyte. System 6 showed better results compared to other systems.

Keywords: Genosensor. Electrode modification. Arboviruses. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação dos genes e genoma do MAYV.....	22
Figura 2 – A área formada pelos casos de MAYV em humanos reconhecidos.....	23
Figura 3 – Resumo gráfico do curso de infecção do MAYV.....	26
Figura 4 – Esquema da integração e funcionamento de um biossensor.....	31
Figura 5 – Esquema das fases de uma voltametria cíclica.....	34
Figura 6 – Esquema de uma DPV.....	35
Figura 7 – Representação de um SAM e LbL.....	37
Figura 8 – Teste de hibridização da sonda de MAYV e alvo em eletroforese em gel de agarose.....	46
Figura 9 – Voltamogramas das eletropolimerizações e eletrodeposições.	47
Figura 10 – Análise das modificações dos eletrodos	48
Figura 11 – Caracterização de eletrodos com eletrodeposição de AgNPs e modificações secundárias (AgNP/MonoCys e AgNP/PolyCys).....	49
Figura 12 – Imobilização de sondas de DNA em diferentes sistemas testados	50
Figura 13 – Otimização em eletrodos modificados.....	51
Figure 14 – Comportamento eletroquímico de cada etapa da construção dos Sistemas 4 e 6.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento das plataformas biossensoras desenvolvidas.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae.	- Gênero <i>Aedes</i>
MAYV	- Mayaro Vírus
PCR	- Reação em cadeia da polimerase – do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i> .
DENV	- Vírus da febre da Dengue
ZIKV	- Vírus da febre da Zika
CHIKV	- Vírus da febre da Chikungunya
VEEV	- Vírus da Encefalite equina venezuelana
VEEL	- Vírus da Encefalite equina do Leste
VEEO	- Vírus da Encefalite equina do Oeste
ONNV	- O'nyong-nyong Vírus
SFV	- Semliki Forest Vírus
RRV	- Ross River Vírus
SINV	- Sindbis Vírus
Kb	- kilobases
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática – do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
WE	- <i>Work electrode</i> , ou, eletrodo de trabalho
RE	- <i>Reference electrode</i> , ou, eletrodo de referência
AE	- <i>Auxiliary electrode</i> , ou, eletrodo auxiliar, o mesmo que “CE”

CE	- <i>Counter electrode</i> , ou, contra eletrodo, o mesmo que “AE”
CV	- Voltametria cíclica - do inglês, <i>Cyclic voltammetry</i>
DPV	- Voltametria de pulso diferencial - do inglês, <i>Differential pulse voltammetry</i>
SAM	- Monocamadas auto-montadas - do inglês, <i>self assembled monolayers</i>
LbL	- Deposição camada por camada - do inglês, <i>layer-by-layer</i>
MB	- Azul de metileno – do inglês, Methylene blue
PO ₄ -ssDNA	- Sonda fita única de DNA do Mayaro vírus
NH ₂ -ssDNA	- Sonda fita única de DNA do Mayaro vírus aminada
CssDNA	- Sequência complementar alvo
NCssDNA	- Sequência não-complementar
MonoCys	- Monocamada de cisteína
PolyCys	- Filme de policisteína
PolyGlutAc	- Filme de poliácido glutâmico
AgNP	- Nanopartícula de prata
PVC	- Policloreto de vinila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ARBOVIROSES DE IMPORTÂNCIAS HUMANA E MÉDICA NA AMÉRICA LATINA	17
2.2	<i>ALPHAVIRUSES</i> DO NOVO MUNDO E DO VELHO MUNDO	18
2.3	ARBOVIROSES EMERGENTES E REEMERGENTES NA AMÉRICA LATINA	20
2.4	MAYARO VÍRUS (MAYV)	21
2.5	ÁREA DE DISSEMINAÇÃO DO MAYV, FEBRE DO MAYARO, SINTOMATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	22
2.6	TRANSMISSÃO, AGENTES TRANSMISSORES DO MAYV E RESERVATÓRIOS	26
2.7	DIAGNÓSTICOS	27
2.8	BIOSSENSORES	29
2.9	BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	31
2.10	ELETRODOS SCREEN PRINTING	32
2.11	MÉTODOS E TÉCNICAS ELETROQUÍMICOS	33
2.12	MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS TRANSDUTORES	36
2.12.1	Monocamadas	36
2.12.2	Filmes poliméricos	37
2.12.3	Partículas metálicas	37
2.13	DETECÇÃO DIRETA E INDIRETA EM BIOSSENSORES ELECTROQUÍMICOS GENOSENSORES	38
3	METODOLOGIA	40
3.2	BIOINFORMÁTICA	40
3.2	MATERIAIS E REAGENTES	41
3.3	EQUIPAMENTOS	41

3.4	PREPARAÇÃO DAS SONDAS, ALVO E OUTRAS SOLUÇÕES	42
3.5	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	42
3.6	PRODUÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS	42
3.7	MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS	43
3.7.1	Adição de monocamadas de L-cisteína.....	43
3.7.2	Eletropolimerizações e eletrodeposições	43
3.7.3	Imobilização das sondas de DNA	44
3.7.4	Hibridização de sonda-alvo	44
3.8	MENSURAÇÕES ELETROQUÍMICAS	44
3.9	DESIGN DOS EXPERIMENTOS	45
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4	RESULTADOS	46
4.1	ANÁLISE DA SONDA DE DNA	46
4.2	ELETRODOS MODIFICADOS	46
4.3	IMOBILIZAÇÃO DAS SONDAS E OTIMIZAÇÃO.....	49
4.4	REPRESENTAÇÃO FINAL DO SISTEMA DE DETECÇÃO DO MAYV	51
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A: ARTIGO PUBLICADO	85
	APÊNDICE B: ARTIGO EM COLABORAÇÃO 1	87
	APÊNDICE C: ARTIGO EM COLABORAÇÃO 2	89

1 INTRODUÇÃO

O Mayaro vírus (MAYV), é um arbovírus *Alphavirus* (pertencente à família *Togaviridae*) presente nas Américas, que pode infectar humanos, causando uma infecção sintomática denominada Febre do Mayaro, induzindo sintomas como febre, artrite, rash, mialgia, artralgia, dor retro orbital e por vezes hemorragias. Embora não hajam registros de mortes causadas pela doença, a mesma pode ser marcada por uma fase de recuperação com persistentes artralgia e artrite com duração indeterminada. Esse período tem sido caracterizado como uma fase crônica da doença, afetando a qualidade de vida dos pacientes (HALSEY et al., 2013; ZUCHI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015; ESPOSITO; FONSECA, 2017).

As infecções arbovirais nas Américas têm historicamente grande impacto nas populações urbanas, como as Febres da Dengue, da Zika e da Chikungunya. Nos centros urbanos, o principal vetor desses agentes etiológicos é o *Aedes* (*Ae.*) *aegypti* (ZARA et al., 2016; SUWANMANEE et al., 2018; COELHO; CODEÇO, 2019). Surtos das Febres da Dengue, da Zika e da Chikungunya colocaram em evidência a problemática de vírus transmitidos por vetores capazes de alcançar uma significativa parte dessas populações. Este cenário pode ser agravado por emergências virais, como a potencialmente causada pelo MAYV, uma vez que esse vírus seja transmitido por mosquitos do gênero *Ae.*, pode iniciar surtos em áreas urbanas, afetando não somente as Américas, como também as regiões dos trópicos, semelhante aos surtos das febres acima citadas (CANALI et al., 2017; MAVIAN et al., 2017; YEUNG et al., 2017; SMITH, 2018).

Estudos em mosquitos do gênero *Aedes* indicam a possibilidade desses artrópodes como eficientes transmissores do MAYV. Neste cenário, onde um possível surto de Febre do Mayaro é possível, o diagnóstico através dos sintomas é inviável, uma vez que são generalistas. Testes sorológicos têm mostrado uma reatividade cruzada com outros vírus, podendo induzir a um diagnóstico errôneo e conduzir a um tratamento inadequado do paciente. O padrão ouro para o diagnóstico da Febre do Mayaro é baseado em técnicas de PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction* (TAYLOR; PATEL; HEROLD, 2005; LIANG; GAO; GOULD, 2015; DENTE et al., 2018; WAGGONER et al., 2018). Entretanto, essas técnicas exigem uma mão de obra especializada, reagentes de elevado valor e tempo de preparação de amostras, o que gera um encarecimento do diagnóstico e um representativo tempo de resposta.

O desenvolvimento de testes alternativos ou adjuvantes baseados em biotecnologias tem emergido desde o último século. Esses métodos mantêm a sensibilidade e a especificidade, mas também são de fácil desenvolvimento e manuseio, sem a necessidade de preparação de amostras ou mão de obra especializada, com resultados rápidos, propiciando diagnósticos de qualidade e bom desempenho. Dentre os métodos desenvolvidos estão os biossensores, cujos bioreceptores reconhecem com eficiência o alvo e a transdução fornece um sinal capaz de ser detectado de acordo com o tipo de biossensor construído. Os genossensores, baseados na imobilização de uma fita simples de DNA, são biossensores capazes de detectar um analito (como um RNA ou DNA viral) a partir do evento de hibridização, promovendo a formação de uma dupla fita de DNA (BETTAZZI et al., 2017; MALHOTRA et al., 2017; PALCHETTI; BETTAZZI; BAUSSANT, 2018; ENSAFI, 2019a).

Os biossensores baseados em métodos de detecção em células eletroquímicas apresentam eficiente reprodução e fácil manuseio. Modificações na superfície de eletrodos de genossensores são comumente feitas, usando diversos materiais no intuito de melhorar a recepção de uma corrente elétrica e ao mesmo tempo oferecer estabilidade ao receptor biológico. Essas modificações dos transdutores de genossensores podem ser efetuadas por métodos eletroquímicos em passos rápidos (BETTAZZI et al., 2017; MALHOTRA et al., 2017; PALCHETTI; BETTAZZI; BAUSSANT, 2018; ENSAFI, 2019a).

Assim, esses dispositivos capazes de realizar testes eletroquímicos podem ser usados na elaboração e desenvolvimento de diagnósticos (BETTAZZI et al., 2017; MALHOTRA et al., 2017; PANJAN; VIRTANEN; SESAY, 2017). Neste trabalho, plataformas biossensoras desenvolvidas em eletrodos do tipo *screen printed* foram comparadas, para selecionar aquelas capazes de detectar eficazmente o Mayaro vírus através de métodos eletroquímicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Testar plataformas de biossensores eletroquímicos para detecção rápida do vírus Mayaro (MAYV) por técnicas moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar uma região gênica de consenso para o vírus Mayaro através de ferramentas de bioinformática;
- Construir protótipos testes a partir da utilização de material condutor que permitam a construção de sistemas portáteis e sensíveis ao Mayaro vírus;
- Testar sistemas de imobilização da sonda DNA (bioreceptor) na superfície do eletrodo de trabalho;
- Realizar testes de hibridização entre as sondas e DNA alvo;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARBOVIROSES DE IMPORTÂNCIAS HUMANA E MÉDICA NA AMÉRICA LATINA

Arboviroses, por definição, consistem em infecções cujos agentes etiológicos são transmitidos pelo contato com artrópodes. Essas infecções levam a enfermidades que têm sido por várias décadas uma preocupação convergente em todos os continentes (WHO, 1966; LIANG; GAO; GOULD, 2015). No presente, grandes problemas públicos de saúde são gerados pelas infecções de vírus, que além de causarem surtos, produzem uma grande despesa cujos custos ainda não são totalmente conhecidos. Essas infecções virais também são responsáveis pela perda de produtividade de trabalhadores em regiões tropicais e subtropicais, comprometendo principalmente os países em desenvolvimento, diminuindo assim a qualidade de vida dessas populações (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017; MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017).

Algumas das doenças arbovirais causadas por vírus foram popularizadas na última década, decorrente de surtos globais e epidemias de agentes etiológicos previamente restritos em regiões endêmicas. Ainda neste cenário, outras infecções tidas como erradicadas reapareceram e outras se perpetuam historicamente fora de controle (BOGOCH et al., 2016; FAUCI; MORENS, 2016; PAULES; FAUCI, 2017; STEWART-IBARRA et al., 2018). As principais famílias vírus capazes de transmissão por vetores artrópodes e com maior prevalência de infecções são os *Flaviviridae* (como o Dengue - DENV; o Zika - ZIKV e o Vírus da Febre Amarela - YFV), os *Togaviridae* (como Chikungunya – CHIKV; Encefalite Equina Venezuelana - VEEV) e *Bunyaviridae* (Bunyavírus Oropouche - OROV) (FIGUEIREDO, 1999; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCRETON, 2017; PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; DO NASCIMENTO et al., 2019; MESSINA et al., 2019).

O vírus Chikungunya (CHIKV) é atualmente um dos mais conhecidos *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*, exercendo uma importante patogenicidade em humanos e animais (GALÁN-HUERTA et al., 2015; PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017). Este vírus tornou-se mais uma preocupação global após o seu ressurgimento e recente distribuição pelo planeta (FERREIRA et al., 2020; HER et al., 2015; MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016). O CHIKV pode ser transmitido através da picada de mosquitos *Aedes*, e assim desencadear a Febre da Chikungunya. As infecções do vírus e a doença da Febre da Chikungunya ocorrem endemicamente na Ásia, África e no subcontinente indiano. No

entanto, em 2005, após um surto nas ilhas do Oceano Índico, vários surtos consecutivos ocorreram em todo o mundo. No presente, mais de 60 países da África, Américas, Ásia e Europa notificam casos da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A poliartralgia decorrente da infecção em estado crônico da Febre da Chikungunya é caracterizada como incapacitante e tem sido relatada como persistente mesmo quando a febre desaparece, podendo durar semanas, meses e até anos (CHAAITHANYA et al., 2016; MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; DUTTA; TRIPATHI, 2017; SLAVOV et al., 2018). A disseminação do CHIKV no mundo é refletida na grande quantidade de casos. No ano de 2015, apenas nas Américas, 693.489 casos suspeitos e 37.480 casos confirmados de Febre da Chikungunya foram relatados à Organização Pan-Americana da Saúde (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015). Essas características epidemiológicas mostram a importância das infecções por *Alphavirus*, principalmente aqueles pertencentes à família *Togaviridae*.

Considerando o panorama apresentado acima, é evidente que uma única *Alphavirose* pertencente ao gênero *Togaviridae* circulante no Brasil e nas Américas é capaz de um alto número de infecções, sem mencionar outras infecções de outras famílias ou gêneros. Também é evidente a falta de estratégias de vigilância contra arboviroses *Alphavirus* nessas regiões, além da necessidade de métodos de mapeamento e vigilância para antecipar os passos de outras arboviroses e prevenir surtos que podem se espalhar e acometer essas populações. Frente a isso, a peça-chave de maior importância para prevenir e entender os surtos e as dinâmicas de novos vírus e suas epidemiologias é o acompanhamento dos números casos. Estes, por sua vez, necessitam de ferramentas diagnósticas, para então fornecer os dados necessários ao combate destas viroses (GROSSI-SOYSTER et al., 2017; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017; MARCONDES; CONTIGIANI; GLEISER, 2017; STEWART-IBARRA et al., 2018; HORTION et al., 2019).

2.2 ALPHAVIRUSES DO NOVO MUNDO E DO VELHO MUNDO

A família *Togaviridae* chama atenção pelos sintomas que podem variar muito entre os pacientes infectados e os tipos de vírus infectantes. Os *Alphavírus* podem induzir desde artralgias crônicas à encefalites agudas graves nos pacientes. É comum que *Alphaviroses* como o CHIKV, conhecidos como *Alphaviroses do velho mundo*, causem os últimos sintomas. Além do CHIKV, esse grupo é formado por:

- O'nyong-nyong vírus (ONNV) - Este vírus é conhecido por ser endêmico na África Subsaariana, seu nome deriva de povos nativos dessa região, significando “enfraquecimento muito doloroso de articulações”, relacionando a infecção desse vírus com um dos principais sintomas: a artralgia. Assim como em muitas outras infecções de *Togaviridae*, não há no momento tratamento específico para o paciente (REZZA; CHEN; WEAVER, 2017; CLEMENTS et al., 2019).
- Ross River virus (RRV) – É um vírus com potencial emergente na Ásia, sendo endêmico na Austrália e na Papua-Nova Guiné, mantendo marsupiais como reservatórios, gerando cerca de cinco mil infecções por ano e produzindo nos pacientes os sintomas gerais desse grupo de arboviroses (LAU et al., 2017).
- Semliki Forest virus (SFV) – A infecção desse vírus geralmente causa uma doença aguda, incluindo doença febril leve, erupção cutânea, artralgia, mialgia. É um dos vírus mais bem caracterizados do mundo, sendo modelo para o estudo de encefalites virais, sendo inclusive usado como meio de entrega de RNA's anticânceres em tecidos nervosos (RAMACHANDRAN et al., 2017; FRAGKOUDIS et al., 2018).
- Sindbis virus (SINV) – É uma arbovirose endêmica do nordeste da Europa, causando surtos regulares nessa região, mantendo uma manutenção de um ciclo entre pássaros e mosquitos, entretanto, há falta de dados epidemiológicos/demográficos sobre essas infecções na Europa. Seus principais sintomas são o rash e a artralgia (SIGFRID et al., 2018).

Além dos vírus do velho mundo, há também aqueles conhecidos como Alphavirus do velho mundo, que fazem alusão à sua região de disseminação nas Américas. Este grupo é formado por vírus como:

- Vírus da Encefalite equina venezuelana (VEEV) – Trata-se de um Alphavirus também pertencente à família *Togaviridae*. Assim como muitas arboviroses, a doença causada por esse vírus é reconhecida como negligenciada. O vírus é encontrado em focos nas três Américas. O quantitativo real de casos é desconhecido, uma vez que ocorrem mais prevalentemente nas Américas Central e Latina, regiões com falta de monitoramento e de laboratórios para efetuar o diagnóstico. O ciclo desse vírus pode ser enzoótico ou epizoótico, também podendo ser efetuado por mosquitos *Aedes*. Seus sintomas mais importantes são encefalite, febre alta e desenvolvimento de doenças gastrointestinais (STORM et al., 2014; SEYMOUR; WEAVER, 2016; RUSNAK et al., 2019; WONG, 2020).
- Vírus da Encefalite equina do Oeste (VEEO) – Esse vírus pode ser encontrado na América do Norte e do Sul, apresentando em várias linhagens, das quais algumas parecem ser

restritas à América do Sul, enquanto outras ocorrem tanto na América do Norte quanto na do Sul. A encefalite, o principal sintoma da infecção, ocorre em humanos e cavalos, sendo historicamente considerados hospedeiros terminais (ou seja, a viremia não atinge níveis suficientes para infectar possíveis mosquitos vetores) (BERGREN et al., 2020).

- Vírus da Encefalite equina do Leste (VEEL) – Similar ao vírus anterior, ao infectar humanos, equídeos, suínos e aves, estes hospedeiros são terminais. O EEEV também é uma potencial arma biológica, uma vez que é transmissível por aerossol. Por fim, este arbovírus pode ser uma ameaça aos países da América do Norte, como no Estados Unidos, uma vez que demonstra traços de emergência nessa região (MORENS; FOLKERS; FAUCI, 2019).
- Vírus da Febre do Mayaro (MAYV) – Este arbovírus também pertence ao gênero *Alphavirus* e à família *Togaviridae*. Foi descoberto em 1954 pelo isolamento feito do sangue de trabalhadores rurais da vila de Mayaro (Trindade e Tobago), o que levou à nomeação do vírus. Desde então, o número de casos e de animais infectados sugere a presença do vírus em torno da região peri-Amazônica, embora animais infectados tenham sido encontrados numa ampla faixa das Américas e casos de infecções em crianças haitianas tenham sido reportadas. Até então, os indícios da infecção em humanos se estendiam do Serrado brasileiro até as regiões superiores da Amazônia na porção da América central. Apesar de não existirem mortes associadas à infecção, os casos de Mayaro vírus podem apresentar fenômenos hemorrágicos e formas crônicas semelhantes aos da Febre da Chikungunya, com poliartrite e poliartrrose por até um ano, embora nenhum acompanhamento, em humanos, além desse período esteja retratado na literatura (ANDERSON et al., 1957; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014; MELEKIS et al., 2015; MOTA et al., 2015a).

2.3 ARBOVIROSES EMERGENTES E REEMERGENTES NA AMÉRICA LATINA

Em reação aos surtos e a expansões de arboviroses, muita atenção tem sido direcionada para arboviroses com tendências emergentes nas Américas, cujos números de casos e dinâmica epidemiológica não se conhecem, e do mesmo modo, aos vírus reemergentes, que têm sido observados retornar depois de muitos anos sendo considerados como controlados ou extinguidos (KARWOWSKI et al., 2016; LAZEAR; STRINGER; DE SILVA, 2016; LEDNICKY et al., 2016; MARCONDES; XIMENES, 2016; MAVIAN et al., 2017). Dentre esses vírus, e entre os *Alphavirus* da família *Togaviridae*, estão o VEEV e MAYV. Muitos autores apontam a probabilidade de vírus como o MAYV seguir os passos dados por importantes arboviroses, como o ZIKV e o CHIKV, que anteriormente eram

reconhecidos como endêmicos e atualmente estão presente em vários continentes (LONG et al., 2011; ZUCHI et al., 2014; LEDNICKY et al., 2016; MAVIAN et al., 2017).

2.4 MAYARO VÍRUS (MAYV)

Dados reais sobre o Mayaro vírus e a Febre do Mayaro são escassos na literatura, muitos dos dados brutos sobre o vírus e a infecção são reproduzidos em revisões (YASRI; WIWANITKIT, 2015; PATIÑO-BARBOSA et al., 2016). Dessa maneira, a bibliografia sobre a temática do vírus muitas vezes apresenta textos clássicos.

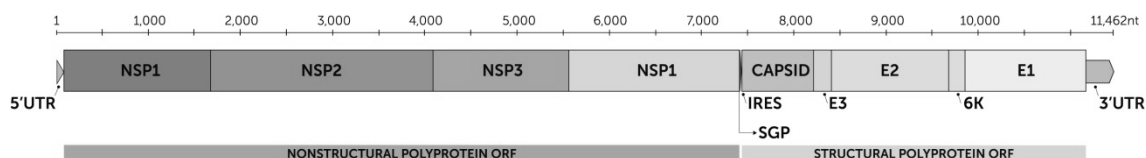
O vírus Mayaro é pertencente ao sorocomplexo antigênico do *Semliki Forest virus* (ANDERSON et al., 1957; POWERS et al., 2006). A informação estrutural específica para o MAYV ainda não está totalmente disponível (ANDERSON et al., 1957; MELEKIS et al., 2015), por isso, a referência atual da estrutura do MAYV é a representação geral dos *Alphavirus*: uma formação icosaédrica envelopada com partículas proteicas. A superfície do vírus apresenta 240 cópias de cada uma das três proteínas estruturais: a proteína de capsídeo (C), que forma o nucleocapsídeo e empacota o genoma viral juntamente com as glicoproteínas de envelope E1 e E2 (NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014; MOTA et al., 2015a).

A glicoproteína E2 é responsável pela ligação do vírus com as células do hospedeiro, como um receptor, enquanto a glicoproteína E1 tem um papel complementar na entrada do vírus, pois é diretamente responsável pela atividade de fusão, essas proteínas são alvos para a produção de possíveis vacinas (LESCAR et al., 2001; FREITAS et al., 2006). As proteínas C, E1 e E2 são montadas em uma estequiometria 1: 1: 1, criando formações de conchas que se completam e ajustam o formato icosaédrico. A bicamada lipídica dos corpos virais é derivada dos hospedeiros. Aparentemente, a organização da bicamada lipídica é um fator crítico para a atividade biológica do MAYV, como também dos demais *Alphavirus*. O conhecimento da replicação do MAYV e seu processo de entrada nas células do hospedeiro é baseado em estudos de outros *Alphavirus*, o modo específico é desconhecido até o momento (KONONCHIK; HERNANDEZ; BROWN, 2011; SOUSA et al., 2011; ESPOSITO; FONSECA, 2017). Entretanto, os níveis de pH, a quantidade de colesterol nas células do hospedeiro proteína de ligação/recepção parecem estar fortemente envolvidos com a endocitose (SOUSA et al., 2011; CARVALHO et al., 2017).

O genoma do MAYV consiste de um RNA positivo de fita simples com 11,5-12 kb. Cerca de dois terços desse RNA é lido diretamente como um mRNA para codificar quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4/P1) (LAVERGNE et al., 2006; ESPOSITO; FONSECA, 2017). As proteínas estruturais e de processamento (C, E3, E2, 6K e

E1) são codificadas a partir de um RNA subgenômico de cadeia positiva, referenciado como RNA 26S, transcrito a partir do flanco 3' do um terço restante do RNA genômico. A organização do genoma pode ser resumida como 5'm7G-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-C-E3-E2-6K-E1-A-3 (LAVERGNE et al., 2006; HALLENGÄRD et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Representação dos genes e genoma do MAYV.



Fonte: Adaptado de MACKAY & ARDEN (2016)

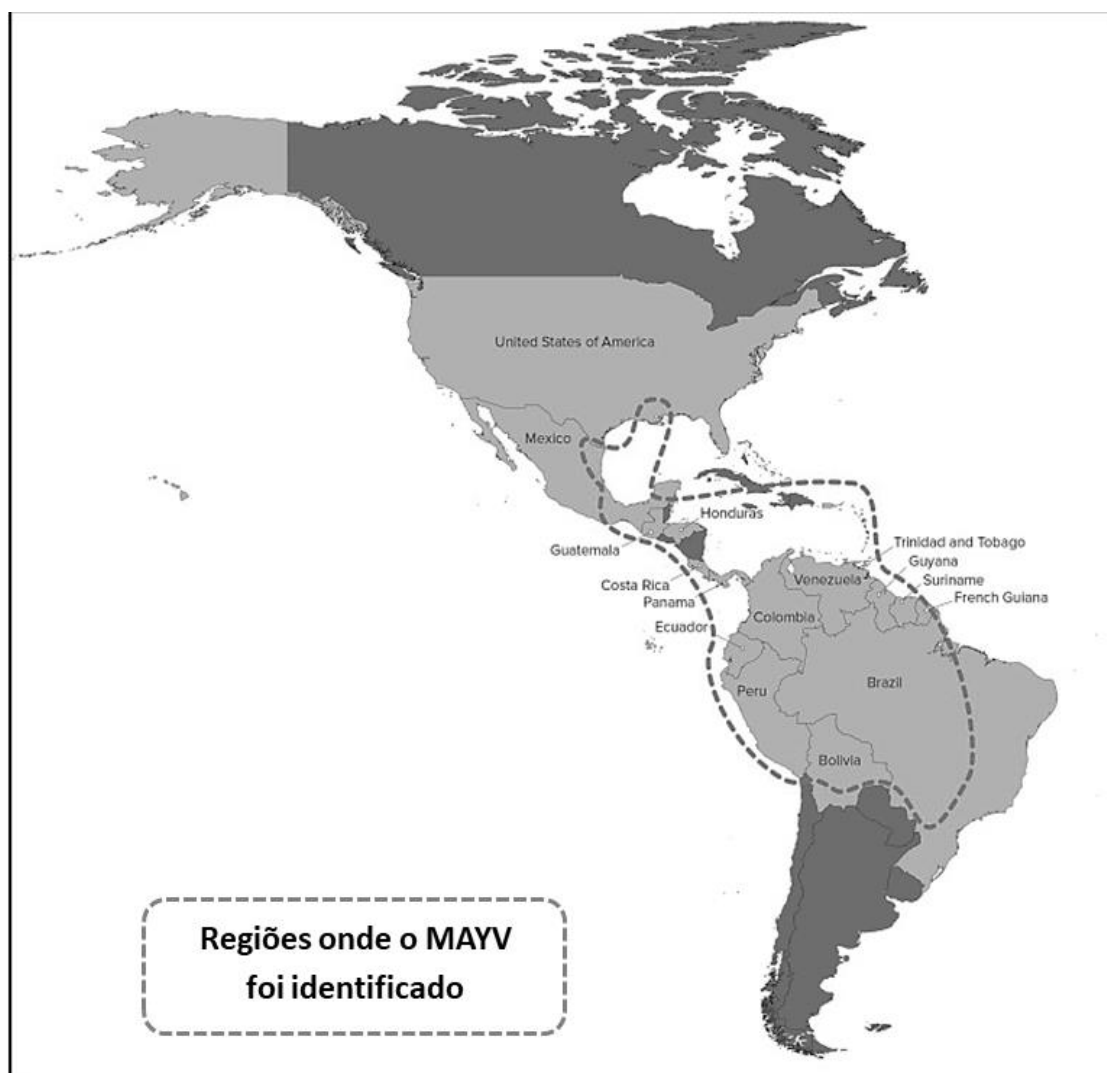
Os genótipos e a filogenia do MAYV podem ser baseados nas sequências dos genes E1-E2 e no genoma completo. Três genótipos de MAYV são atualmente reconhecidos como D (disperso – *dispersed*), L (limitado – *limited*) e N (novo – *New*) (LAVERGNE et al., 2006; POWERS et al., 2006; AZEVEDO et al., 2009; TERZIAN et al., 2015; SERRA et al., 2016). O genótipo D foi primariamente reconhecido em uma vasta área da América do Sul, englobando países como Trindade e Tobago, Brasil, Peru, Bolívia e Venezuela, enquanto genótipo L foi encontrado apenas no Brasil e genótipo N apenas no Peru. Dados recentes de bioinformática sobre o genoma MAYV indicaram possíveis genótipos híbridos MAYV L/D, relacionados aos genes nsP1 e E1, sugerindo a adaptabilidade do gene E1 ao hospedeiro humano, esses dados podem indicar o processo evolutivo e a adaptabilidade do MAYV aos seus hospedeiros (AUGUSTE et al., 2015; MAVIAN et al., 2017).

2.5 ÁREA DE DISSEMINAÇÃO DO MAYV, FEBRE DO MAYARO, SINTOMATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A faixa de disseminação do vírus Mayaro é desconhecida; portanto, a confirmação de infecções, mesmo em animais, é importante para esclarecer a faixa real de disseminação do vírus. Indicações sorológicas ou isolamentos virais em aves mostram que o vírus pode estar presente desde o sul dos EUA (Louisiana) ao Centro-Oeste do Brasil (Mato Grosso do Sul), sugerindo uma extensa área de cobertura do MAYV (CALISHER et al., 1974; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010, 2015). As espécies de aves com infecção por MAYV encontradas no Centro-Oeste do Brasil são migratórias, e podem chegar ao sul do país e à Argentina (NUNES; TOMAS, 2004; MUÑOZ; NAVARRO, 2012; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015;

FIGUEIREDO, 2016). A área formada pela confirmação através de sorologia e isolamento viral do MAYV está representada na Figura 2.

Figura 2 – A área formada pelos casos de MAYV em humanos reconhecidos.



Fonte: Adaptado de MACKAY & ARDEN (2016)

O MAYV pode infectar uma grande variedade de espécies. Baseados em cepas isoladas ou anticorpos, já foram encontrados infectados insetos hematófagos, equídeos, pássaros e vertebrados selvagens entre outros organismos (CALISHER et al., 1974; VASCONCELOS et al., 2001; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015).

Entretanto, a infecção pelo MAYV em humanos é documentada como um processo incomum, onde o ciclo silvestre é a maneira regular de apresentação do vírus (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; MAVIAN et al., 2017). Em contrapartida, a infecção pelo MAYV em humanos é observada em vários países, como Bolívia, Peru, Venezuela,

Brasil, Trindade e Tobago, Equador, Guiana Francesa, Colômbia, Guatemala, Equador, Honduras, Guiana, Panamá, Suriname e Haiti (ANDERSON et al., 1957; SCHAEFFER et al., 1959; GROOT; MORALES; VIDALES, 1961; GALINDO et al., 1966; CALISHER et al., 1974; SEYMOUR; PERALTA; MONTGOMERY, 1983; PINHEIRO et al., 1986; TALARMIN et al., 1998; TESH et al., 1999; HERAUD et al., 1999; DE THOISY et al., 2003; TAVARES-NETO et al., 2004; TORRES et al., 2004; TAYLOR; PATEL; HEROLD, 2005; COIMBRA et al., 2007; FORSHEY et al., 2010; HASSING et al., 2010; IZURIETA et al., 2011; MOTA et al., 2015b; LEDNICKY et al., 2016; LIÉVANO, 2017).

Apesar do exposto, estudos epidemiológicos sobre infecções por *Alphavirus* nas Américas são restritos, o que resulta em uma subestimação do número de casos de infecções (LONG et al., 2011; STORM et al., 2014; ZUCHI et al., 2014). No que diz respeito às infecções por MAYV, a falta de diagnósticos e investimentos em pesquisas e monitoramento limita o quantitativo de casos, tornando a doença da Febre do Mayaro amplamente desconhecida. Estima-se que cerca de 1% de todos os casos de infecção pelo vírus DENV, na realidade, são casos de infecções de MAYV não diagnosticados ou mal diagnosticados. Neste ponto, varreduras de estudos epidemiológicos têm corroborado com a estimativa (FORSHEY et al., 2010; CAMINI et al., 2017).

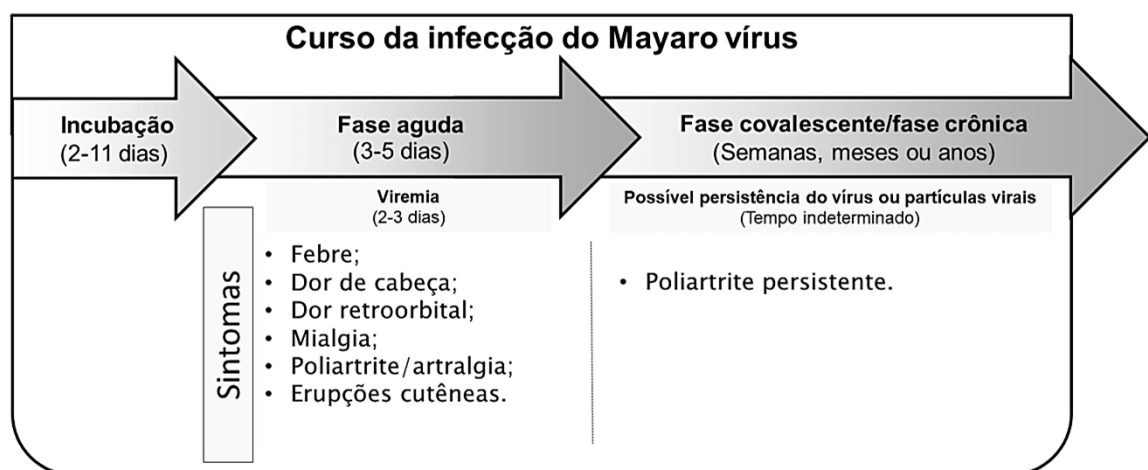
As infecções em humanos também são diagnosticadas em turistas vindos da região da Bacia Amazônica, destacando não apenas a necessidade de considerar o MAYV em viajantes febris retornados, mas também um possível papel em uma transmissão global por meio de viajantes podendo exportar a doença para os territórios da América do Norte e Europa. Turistas retornando para a Holanda, Alemanha e França infectados com o vírus são documentados na literatura. No Peru e no Brasil, viajantes retornando da Amazônia foram diagnosticados infectados ao retornarem, expondo suas regiões de origem (sem histórico da infecção do MAYV ou da doença) ao vírus (TAYLOR; PATEL; HEROLD, 2005; COIMBRA et al., 2007; HASSING et al., 2010; RECEVEUR et al., 2010; NEUMAYR et al., 2012; THEILACKER et al., 2013; FRIEDRICH-JÄNICKE et al., 2014; SLEGERS et al., 2014; MOTA et al., 2015b; ESTOFOLETE et al., 2016; TAPPE et al., 2016; LLAGONNE-BARETS et al., 2016; MAVIAN et al., 2017).

Após a infecção o período de incubação do vírus pode variar de 3 a 11 dias, seguida da fase virêmica, que ocorre em um curto período de tempo (entre 2-3 dias). A fase virêmica ocorre concomitantemente com a fase aguda da doença. Em seres humanos, na fase aguda, o MAYV pode causar uma doença febril, podendo variar de leve a moderadamente grave (Febre de Mayaro) com duração média de 5 dias, variando de 3-7 dias, com recuperação sem

intercorrências. Os sintomas originados na Febre do Mayaro, são os sintomas gerais de infecções: febre, fadiga, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, edema articular, poliartrite, poliartralgia e rigidez das juntas (incluindo dedos, pés, mãos, articulações e tornozelos em geral) e erupções cutâneas, com erupção ocorrendo em mais mais de 40% dos casos, aparecendo antes, simultaneamente ou após sintomas de artralgia. Sintomas como erupção cutânea e artralgia têm duração de 7 a 10 dias. Casos de hemorragia são registrados, porém sem letalidade (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; HALSEY et al., 2013; ZUCHI et al., 2014; VIEIRA et al., 2015; TAPPE et al., 2016; BRUNINI et al., 2017b; DA COSTA et al., 2017).

No entanto, após a fase aguda, após o desaparecimento da febre e outros agravos, alguns sintomas podem durar por período indeterminado, associados a uma fase crônica de poliartralgia incapacitante de longo prazo. Essa fase crônica pode ocorrer em até 50% dos pacientes sintomáticos infectados (TESH, 1982; LAVERGNE et al., 2006; AZEVEDO et al., 2009; HALSEY et al., 2013; ZUCHI et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015; ESPOSITO; FONSECA, 2017). Um resumo gráfico do curso da Febre do Mayaro e dos seus sintomas pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 – Resumo gráfico do curso de infecção do MAYV.



Fonte: Adaptado de FERREIRA et al., (2020).

2.6 TRANSMISSÃO, AGENTES TRANSMISSORES DO MAYV E RESERVATÓRIOS

A transmissão do MAYV aos seres humanos é descrita na literatura através de picadas de mosquitos *Haemagogus janthinomys*. Esta espécie é descrita como raramente vista fora das florestas, sendo então considerado o vetor mais importante para o MAYV, uma vez que esses mosquitos podem ser frequentemente encontrados infectados com o vírus (ANDERSON et al., 1957; CAUSEY, 1964; VASCONCELOS et al., 2001). No entanto, ensaios laboratoriais relatam que o *Ae. aegypti* e o *Ae. Albopictus* podem ser capazes de disseminar a infecção, como um vetor em potencial para um ciclo urbano do MAYV. Ambos os mosquitos mostram igual competência (SMITH; FRANCY, 1991; LONG et al., 2011; SERRA et al., 2016).

O *Ae. Aegypti* está amplamente distribuído nas regiões urbanas tropicais e subtropicais. Uma vez que este mosquito se torne um competente vetor do MAYV, novos surtos de arboviroses e alastramento da área de atuação do vírus podem correr. Semelhante ao já descrito em relação aos vírus Zika e Chikungunya. A mesma proposta pode ser formada para o *Ae. Albopictus*, com distribuição bem conhecida em regiões de clima ameno. Não existem estudos que possam prever com exatidão o resultado da razão entre o potencial de urbanização do MAYV e a magnitude de chances de transmissão a partir de mosquitos *Aedes* durante a fase virêmica da doença (WEAVER; REISEN, 2010; LEDNICKY et al., 2016; RÜCKERT; EBEL, 2018).

Apesar desses dados não estarem disponíveis, certa atenção deve ser dada a alguns fatos. Cinco infecções por MAYV ocorreram em crianças haitianas desde 2016. Como não há histórico de viagem das mesmas para a região amazônica, a infecção provavelmente ocorreu através da transmissão local por meio de mosquitos. Curiosamente as infecções só ocorreram após incursões de paz do exército brasileiro após as tropas serem remanejadas da região amazônica para ajudar a população pós-catástrofe natural (WEAVER; REISEN, 2010; LEDNICKY et al., 2016; MAVIAN et al., 2017; RÜCKERT; EBEL, 2018; BLOHM et al., 2019). Usando as inferências estatísticas multimodais para transmissão potencial, Abad-Franch et al, (2012) indicou que trabalhadores de regiões florestais onde o MAYV atua, provavelmente estão expostos aos ciclos típicos do MAYV mantidos por vetores diurnos de habitação florestal. Em suma, é provável que tenha ocorrido uma transmissão horizontal de soldados infectados para vetores locais no Haiti, e estes vetores podem ter exposto habitantes Haitianos pós incursão de paz (MAVIAN et al., 2017).

Outro cenário potencialmente preocupante está associado às estimativas da Organização Mundial da Saúde, que estimam que, até 2080, os mosquitos *Aedes*,

principalmente o *Ae albopictus*, serão favorecidos por fatores climáticos do aquecimento global, podendo aumentar a transmissão de arbovírus, expondo adicionalmente 2 bilhões de pessoas a mais do que o presente às infecções arbovirais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A infecção natural por MAYV pode ocorrer também em outra espécie de *Aedes*, o *Ae. (Ochlerotatus) serratus*, além de mosquitos *Mansonia venezuelensis*, *Psorophora ferox*, *Psorophora albipes*, *Sabethes* spp. e *Culex* spp. (AITKEN et al., 1960; GROOT; MORALES; VIDALES, 1961; GALINDO; SRIHONGSE, 1967; KARABATSOS, 1985; PINHEIRO; LEDUC, 1988). O entendimento sobre vetores naturais que transmitem o MAYV provém de um pequeno número de estudos ecológicos (LONG et al., 2011). Também são escassos os estudos que apontam reservatórios naturais do vírus e hospedeiros na natureza. A literatura revela um número variável de espécies que podem ser hospedeiras do vírus, englobando equinos, primatas, marsupiais, roedores, preguiças, ungulados, aves carnívoras e migratórias que apresentaram anticorpos contra o vírus nesses estudos (CALISHER et al., 1974; HOCH et al., 1981; SEYMOUR; PERALTA; MONTGOMERY, 1983; DE THOISY et al., 2003; DURBIN et al., 2010; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010, 2015).

Por fim, embora muita atenção tenha sido dada aos mosquitos *Aedes*, também é necessário alertar que a infecção do MAYV via aerossóis é descrita na literatura, embora tenha ocorrido por acidente em laboratório, é necessário pontuar que esta pode se tornar uma rota de transmissão natural em potencial (JUNT et al., 1999; FIGUEIREDO, 2007).

2.7 DIAGNÓSTICOS

Na América do Sul, o correto diagnóstico de arbovirose é um desafio significativo, devida a semelhança dos sintomas que podem ser facilmente confundidos, principalmente com as febres causadas pelos vírus CHIKV, MAYV, ZIKV e DENV, como também podem correr as não-deteções de vírus co-circulantes. Muitos surtos silenciosos de outros arbovírus muitas vezes são despercebidos, pois ocorrem em concomitância com surtos de doenças mais amplamente conhecidas, como a Dengue. Isso promove uma alta chance de não diagnosticar corretamente os casos quando baseados em sintomas (MOURÃO et al., 2012; PANIZ-MONDOLFI et al., 2016; PUCCIONI-SOHLER et al., 2017; RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2017).

A detecção do MAYV ocorre muitas vezes para fins de pesquisas sobre o específico status epidemiológico de uma determinada região (TORRES et al., 2004; BATISTA et al., 2012, 2013; MOURÃO et al., 2012). Estes estudos levam a novos dados que reforçam a

necessidade de vigilância epidemiológica e do acompanhamento de um diagnóstico de precisão, principalmente durante os estágios clínicos iniciais. Os surtos de MAYV têm sido cada vez mais relatados nas Américas em estudos epidemiológicos, o que pode fazer da doença da Febre do Mayaro não apenas um desafio diagnóstico, mas também um desafio para reumatologistas e para os sistemas de saúde públicos, como foi anteriormente o CHIKV (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013; PANIZ-MONDOLFI et al., 2016; RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2017)

O padrão ouro para a detecção do MAYV é o RT-PCR (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*), entretanto, há um elevado custo na produção do método, pois os reagentes são dispendiosos, além da necessidade de mão de obra especializada e o tratamento das amostras dos pacientes. Esses pontos fazem com esse método para diagnóstico não seja amplamente usado. Outro agravamento para o uso do PCR, é o breve período de viremia do MAYV, pois, muitas vezes é após a fase virêmica que o paciente decide procurar intervenção médica e diagnóstico para definir a etiologia dos sintomas. Assim, a determinação do agente causal pode ser dificultada, pois este método diagnóstico é mais eficiente se realizado durante a fase aguda da doença (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; ESPOSITO; FONSECA, 2017; NAVECA et al., 2017; WAGGONER et al., 2018).

Nem todos os métodos sorológicos, como o ELISA, são indicados para a detecção do MAYV, uma vez que estes têm mostrado reatividade cruzada com outros *Alphavirus* (CALISHER et al., 1974; YASRI; WIWANITKIT, 2015; CHERABUDDI et al., 2016). O ministério da saúde tem indicado a execução de dois diferentes tipos de testes sorológicos para confirmar a infecção. Entretanto esse procedimento também encarece o teste e os resultados também são obtidos com relativo tempo de espera (YASRI; WIWANITKIT, 2015; CHERABUDDI et al., 2016; BRASIL, 2017). Atualmente, um único teste sorológico comercial (IgG) ELISA é capaz de detectar o MAYV, mostrando especificidade (95%), entretanto, o mesmo teste apresenta baixa sensibilidade (88%), o que poderia gerar resultados falsos negativos (PRAT et al., 2014). Por fim, não existem testes comerciais moleculares disponíveis até o momento para a detecção do MAYV (PEZZI et al., 2019). Levando em consideração todos esses fatores, diagnósticos moleculares alternativos, como biossensores, podem prover um caminho para a detecção do MAYV.

2.8 BIOSSENSORES

O uso de biotecnologias vem constantemente atribuindo mudanças em processos de produção que podem ser facilitados, mais facilmente manipulados e terem seus custos reduzidos pela atribuição dessa alternativa moderna (THEISEN; LIAO, 2017; DONOHOUE; BARRANGOU; MAY, 2018; RIZWAN et al., 2018).

Nos processos diagnósticos, a biotecnologia é amplamente usada em biossensores. Um biossensor pode ser definido como um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica (quantitativa e/ou qualitativa) através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução. Em suma, são dispositivos constituídos classicamente de um bioreceptor, um transdutor e um processador de dados que, juntos, formam um dispositivo relativamente simples, capaz de inferir uma análise (SAIDUR; AZIZ; BASIRUN, 2017; ENSAFI, 2019b).

O bioreceptor de uma plataforma biossensora pode ser constituído de uma molécula biológica imobilizada, cuja seletividade e afinidade serão as propriedades bioquímicas exploradas no sistema. Quando em contato com o alvo, as reações bioquímicas e biofísicas promovem uma modificação, seja a hibridização do bioreceptor e do alvo, ou simplesmente a ligação entre os dois, induzindo também uma mudança no sinal final. Diante disso, baseado no tipo de molécula imobilizada, há uma subdivisão dos biossensores, que engloba seus bioreceptores, uma vez que há uma grande variedade de moléculas biológicas que podem ser exploradas.

- ✓ Biossensores enzimáticos – Comumente usados quando a biomolécula de interesse (analito) não é possível de detectar diretamente e quando é um substrato. Assim, parâmetros como a velocidade da reação enzimática e a concentração de substrato ou produto podem ser empregados para mensurar o material de interesse (HASSAN; TAMER; OMER, 2016).
- ✓ Genossensores – São biossensores baseados em DNA, onde oligonucleotídeos sintéticos ou amplificados, referentes a genes específicos ou variações genéticas são imobilizados, e cuja afinidade é baseada no processo de hibridização (onde o DNA de fita simples torna-se uma dupla fita), diminuindo a exposição dos nucleotídeos que formam a fita simples (SANI et al., 2019).
- ✓ Aptasensores – São dispositivos baseados nas propriedades de aptâmeros, que por sua vez são moléculas sintéticas de DNA ou RNA de cadeia simples, que podem ligar-se a uma

variedade de moléculas, desde proteínas à moléculas com composições muito específicas (BEZERRA et al., 2019).

✓ Imunosensores – O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, onde moléculas de antígenos ou anticorpos específicos são imobilizados na superfície do transdutor. Como nos outros biossensores, reações bioquímicas de ligação e afinidade são específicas ao analito (FILIK; AVAN, 2019).

O segundo componente dos biossensores, o transdutor, tem como função transformar o evento bioquímico fornecido pelo receptor em um sinal capaz de ser reconhecido e mensurado pelo último componente, que interpretará os dados. Segundo o preceito usado pelo transdutor usado, pode-se obter diferentes classes de biossensores:

✓ Biossensores Ópticos – são baseados nas propriedades de absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência e comprimento de onda, permitindo inferir a presença do analito (DAMBORSKÝ; ŠVITEL; KATRLÍK, 2016).

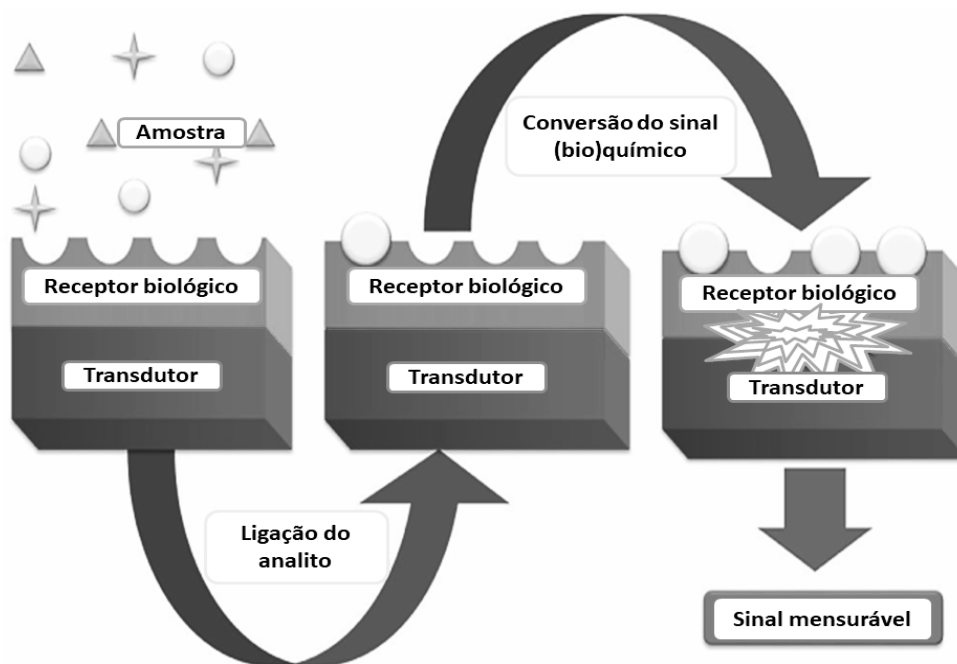
✓ Biossensores Piezoelétricos – são inteiramente baseados nas frequências de ressonância de um cristal ou algum outro material cujas propriedades são bem compreendidas. Segundo a variação de frequências vibratórias é possível determinar a massa presente no sistema (SKLÁDAL, 2016).

✓ Biossensores Térmicos - Baseados na medida de variação de temperatura gerada por catalisação enzimática exotérmica, inferindo assim a concentração do analito (MEHROTRA, 2016).

✓ Biossensores Eletroquímicos: Baseiam-se no consumo ou produção de íons ou elétrons de uma reação bioquímica. A afinidade entre as moléculas é responsável pela produção ou consumo de tais elementos, alterando as propriedades da solução em que se encontram (BEZERRA et al., 2019).

Uma representação esquemática da integração de um biossensor está representada na Figura 4.

Figura 4 – Esquema da integração e funcionamento de um biossensor.



Fonte: Adaptado de GONÇALVES et al., (2014)

2.9 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

As aferições eletroquímicas são realizadas em células onde as variações de grandezas a partir de um analito podem ser conferidas, como corrente, tensão, condutância e impedância. Biossensores eletroquímicos podem realizar aferições na célula eletroquímica pelo uso de eletrodos, pelos quais, mudanças na solução serão propiciadas. Em uma célula eletrolítica com três eletrodos, cada um destes detém funções específicas. O eletrodo de trabalho (*Work electrode* – WE) é conhecido como a parte transdutora do sistema, pelo qual uma faixa de potencial pode ser aplicado (ARDUINI et al., 2016; GUERRA, 2018; FARIA; ZUCOLOTTO, 2019; SANI et al., 2019).

O eletrodo de referência (*Reference electrode* – RE) recebe um potencial fixo durante todo o processo de oxirredução. Uma vez que ele se mantém constante, o sistema pode então ser usado para avaliar algum parâmetro da solução, como deduzir a quantidade de um analito ou sua presença (ARDUINI et al., 2016; DAI et al., 2018; GUERRA, 2018; FARIA; ZUCOLOTTO, 2019).

O contra eletrodo ou eletrodo auxiliar (*Auxiliary* ou *Counter electrode* – AE ou CE) é um aparato desejável nos casos em que há uma necessidade de proteger o eletrodo de referência. Este eletrodo permite que em caso de uma produção de corrente, esta última flua

entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, permitindo que o eletrodo de referência permaneça na solução sem ter interferência de corrente elétrica, mantendo estável seu potencial (ARDUINI et al., 2016; DICULESCU; CHIORCEA-PAQUIM; OLIVEIRA-BRETT, 2016; GUERRA, 2018; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019).

Os WE e AE são constituídos de materiais com boa condutividade, como platina, carbono, etc. Enquanto o RE pode ser constituído de um gama de matérias. Em biossensores, quando estes dispositivos têm dimensões reduzidas, os RE utilizados geralmente são constituídos de prata revestido com uma camada de cloreto de prata (Ag/AgCl) (ARDUINI et al., 2016; DICULESCU; CHIORCEA-PAQUIM; OLIVEIRA-BRETT, 2016; DAI et al., 2018; GUERRA, 2018; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019; SANI et al., 2019).

2.10 ELETRODOS SCREEN PRINTING

Eletrodos do tipo “screen printing”, são elementos que podem ser produzidos (impressos) através de uma técnica simples que pode ser praticada em qualquer ambiente laboratorial, sendo apropriada também para a produção de eletrodos descartáveis. Esses eletrodos são empregados com sucesso na produção de biossensores, proporcionando a produção em massa desses dispositivos a um custo baixo. Eletrodos impressos são atrativos quando se busca o desenvolvimento de sensores/biossensores comerciais, com a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo, contendo todos os eletrodos necessários (eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência) impressos no mesmo suporte. Além disso, estes eletrodos podem ser modificados após produzidos dependendo do interesse final (NASCIMENTO; ANGLES, 1998; YAMANAKA; VESTERGAARD; TAMIYA, 2016).

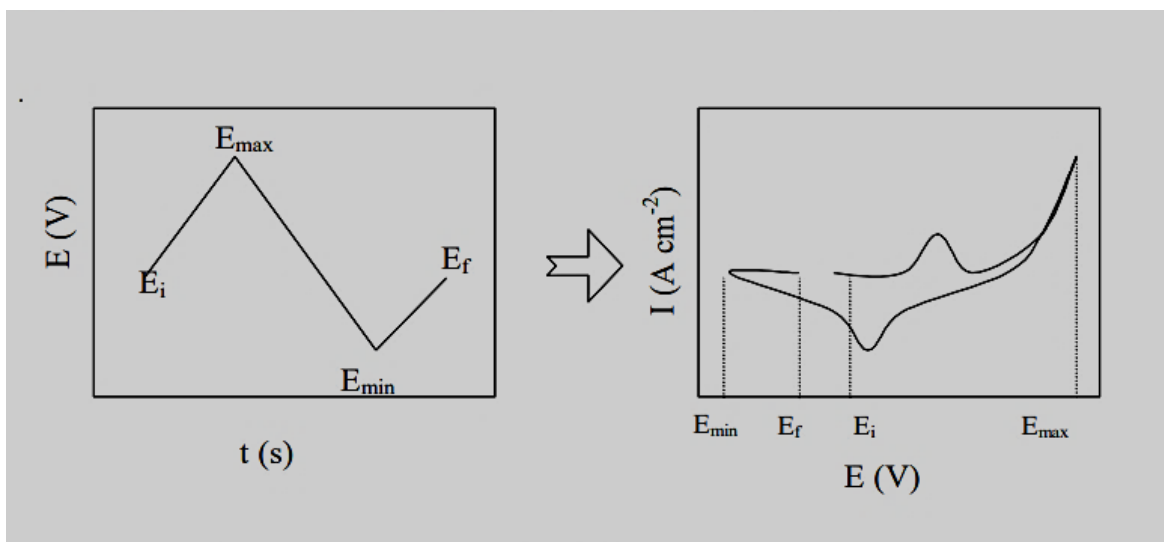
Os eletrodos screen printing podem ser compostos de diversos materiais, possibilitando várias afinidades e interações superficiais com os mais diversos tipos de moléculas, inclusive, biológicas, usadas em biossensores para realizar o reconhecimento (YAMANAKA; VESTERGAARD; TAMIYA, 2016). Carbono, prata-cloreto de prata e grafite são tintas que possuem baixa atividade redox, Essas tintas usadas para a produção desses eletrodos podem ser alteradas pela adição de uma variedade de substâncias, tais como polímeros e metais. Após modificados, os eletrodos screen printing produzidos com pasta de carbono são totalmente viáveis quando usado um mediador e/ou indicador eletroquímicos (DE FIGUEIREDO-FILHO et al., 2017; SMART et al., 2020; XIA et al., 2020).

2.11 MÉTODOS E TÉCNICAS ELETROQUÍMICOS

Existe uma variedade de métodos que podem ser aplicados através da eletroquímica. Entre eles, estão aqueles que monitoram a corrente produzida ao induzir e controlar a diferença de potencial entre dois eletrodos dentro de uma solução, como a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de pulso diferencial (DPV) (ENENGL et al., 2017; JARA-PALACIOS et al., 2017; POVEDANO et al., 2017).

A voltametria cíclica (CV – do inglês, cyclic voltammetry) é um método de caráter qualitativo. Por meio deste método é possível verificar a variação da corrente relativa ao potencial aplicado no WE, impulsionando reações de oxirredução na solução adjacente ao WE durante uma voltametria. Na voltametria cíclica, uma faixa de potencial aplicado se repete ciclicamente entre os valores extremos de potencial inicial (E_1) até chegar ao potencial máximo de uma faixa estabelecida (E_{max}), para decrescer até o potencial mínimo da faixa (E_{min}) e então chegar ao valor final (E_f), como demonstrado na Figura 5. Esse mecanismo gera informações sobre processos redox das espécies eletroativas, permitindo estudos como a velocidade de reações e modificação dessas espécies, a cinética de transferência de carga, reversibilidade de reações eletroquímicas e potenciais redox de substâncias eletroativas (ARDUINI et al., 2016; ENENGL et al., 2017; JARA-PALACIOS et al., 2017; POVEDANO et al., 2017; GUERRA, 2018; FARIA; ZUCOLOTTI, 2019).

Figura 5 – Esquema das fases de uma voltametria cíclica. E (V) – Potencial em volt; t (s) – Tempo em segundos; E_i – Potencial inicial; E_{max} – Potencial máximo; E_{min} – Potencial mínimo; E_f – Potencial final; I (A) – Corrente em amper.



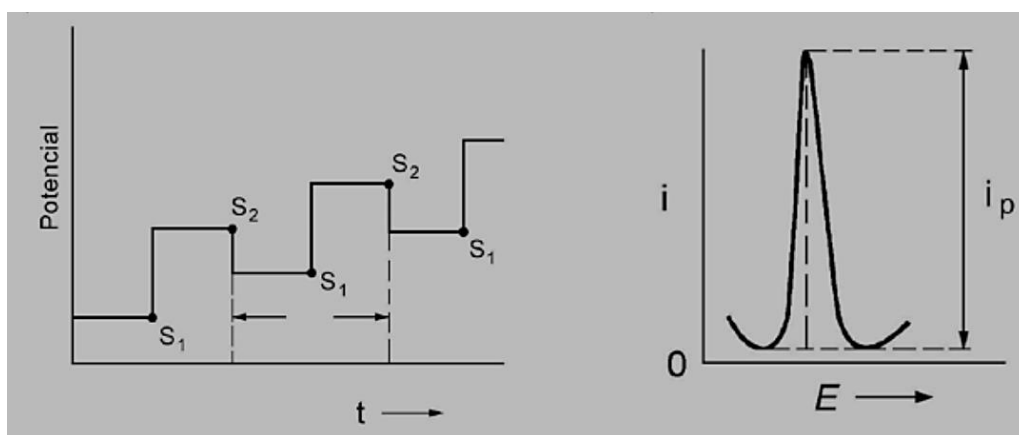
Fonte: Adaptado de GUERRA, (2018).

A voltametria cíclica pode ser utilizada diretamente na modificação de transdutores de biossensores através das técnicas de eletrossínteses, como a eletropolimerização e a eletrodeposição. A eletropolimerização é um processo no qual um monômero conhecido é oxidado em uma região de sua estrutura por um processo anódico. As cargas formadas durante os processos anódicos incitam a afinidade entre moléculas iguais e adjacentes presentes na solução. Essa afinidade é finalizada em uma ligação covalente entre essas moléculas, produzindo um polímero que adere ao eletrodo de trabalho. As vantagens do uso de eletropolimerização são a construção dos filmes poliméricos em uma única etapa e a necessidade de pequenas quantidades de reagentes para sua produção (MARTIN, 2013; LEITE FILHO, 2015; CARVALHO JÚNIOR, 2018).

Na eletrodeposição, uma solução com íons metálicos faz parte da célula eletroquímica, conforme esses íons recebem elétrons e são reduzidos, tendem a se aglomerar em um processo conhecido como nucleação. Essas nucleações culminam na produção de estruturas metálicas sólidas, como placas, pirâmides, cubos e esferas nanométricas que são depositadas no elemento transdutor. Muitos metais são explorados e eletrodepositados na superfície de transdutores para intensificar a corrente produzida, uma vez que são bons condutores (MARTIN, 2013; LEITE FILHO, 2015; CARVALHO JÚNIOR, 2018).

A voltametria de pulso diferencial (DPV – do inglês, *differential pulse voltammetry*) é um método eletroquímico onde um potencial é escalonado em rampa, obedecendo um intervalo de tempo previamente configurado. Nesse modelo, a corrente é registrada duas vezes. A primeira, antes da aplicação do pulso, e a segunda, ao final do pulso. O valor da primeira corrente é subtraído da segunda, a diferença é igual ao valor de corrente sem ruídos, uma vez que a primeira corrente é a capacitiva do sistema e a segunda é a corrente desejada (faradaica), como esquematizado na Figura 6 (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016; AVELINO, 2017).

Figura 6 – Esquema de uma DPV. Potencial (E) pelo tempo (t). S_1 – Corrente corrente capacitiva; S_2 – Corrente faradaica; Corrente (I) pelo Potencial (E).



Fonte: Adaptado de FERREIRA, (2014).

O método de voltametria de pulso diferencial pode ser quantitativo, uma vez que pode mostrar eletroquimicamente o comportamento de pico de corrente em comparação de duas amostras (diferentes picos), sejam essas amostras em solução ou adsorvidas na superfície do eletrodo de trabalho. Da mesma forma, também pode quantificar os picos de uma amostra em relação ao tempo (degradação da amostra). Por fim, esse método também é capaz de caracterizar qualitativamente a presença ou a ausência de materiais que podem ser adicionados em uma solução ou na superfície do eletrodo, uma vez que os perfis eletroquímicos mudam com a adição ou ausência desses materiais, gerando gráficos (voltamogramas) com diferentes perfis (ARAVINDAN; SANGARANARAYANAN, 2017; LUBECKYJ; WINKLER-MOSER; FHANER, 2017; KHALIL et al., 2019).

2.12 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS TRANSDUTORES.

Quando o eletrodo de trabalho é usado em um sistema biossensor, sua superfície é modificada para poder imobilizar o bioreceptor e/ou melhorar as condições para que a solução possa reagir ao receber alguma variação de corrente, potencial, etc. Uma grande variedade de materiais é utilizada a fim de promover modificações do eletrodo de trabalho que possam agregar propriedades como resistência ao desgaste, condutância elétrica, estabilidade, aumento da área de trabalho, baixa ou nenhuma interferência na leitura no sistema, aumento da resposta do sistema, etc (DAI et al., 2018; BEZERRA et al., 2019; FARIA; ZUCOLOTTO, 2019; SANI et al., 2019).

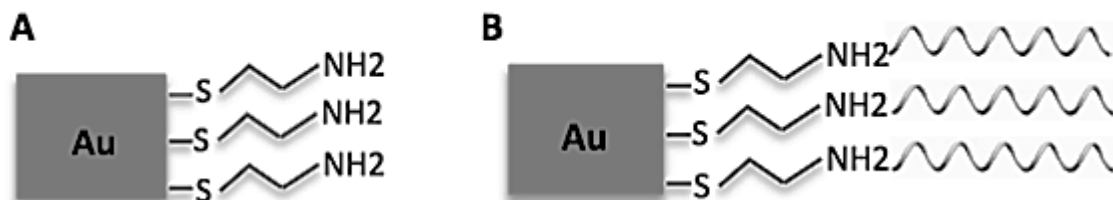
A exploração de materiais semicondutores, partículas metálicas, polímeros, estruturas de carbono, e nano estruturas de metais condutoras vêm crescendo em biossensores de funções específicas (DAI et al., 2018; BEZERRA et al., 2019; FARIA; ZUCOLOTTO, 2019; SANI et al., 2019). Esses materiais são importantes nas modificações pelos motivos citados acima (DAI et al., 2018; BEZERRA et al., 2019; FARIA; ZUCOLOTTO, 2019; SANI et al., 2019). A seguir são apresentadas algumas das modificações que propiciam os passos acima:

2.12.1 Monocamadas

SAM – *self assembled monolayers* – são camadas produzidas quando moléculas são oportunizadas pelas suas propriedades a se organizarem em espaçamentos ordenados em contato com uma superfície na qual têm alguma afinidade (substrato). No SAM, alguma interação fraca entre a molécula e o substrato contribui pra que elas permaneçam imobilizadas. Exemplos clássicos são as monocamadas produzidas a partir de moléculas com grupamentos tióis, como a cisteína, a cistina e a cisteamina que têm afinidade por superfícies de metais nobres como o ouro e a prata. Nessa configuração, as moléculas se organizam e formam uma sequência contínua e estável (CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; CASALINI et al., 2017).

Muitos trabalhos usam a SAM para criar sistemas do tipo LbL (*layer-by-layer*). Nesse tipo de sistema, as moléculas já depositadas como SAM, recebem uma nova camada que se organiza automaticamente sobre a primeira por causa das cargas opostas de grupos funcionais presentes nos dois materiais que se organizam em um LbL. A Figura 7 representa um esquema de SAM e LbL (MARTIN, 2013; CASALINI et al., 2017).

Figura 7 – Representação de um SAM e LbL. (A) SAM formado pela interação da cisteamina e o ouro (Au) e (B) LbL oportunizado pela primeira camada, onde uma sonda de DNA com esqueleto de fosfato (carga negativa) interage com o grupamento amino da cisteamina.



Fonte: Adaptado de CAMPOS-FERREIRA et al., (2013).

2.12.2 Filmes poliméricos

A formação de filmes poliméricos em eletrodos tem vantagem sobre os eletrodos de carbono não modificados, uma vez que apresentem grupos funcionais que podem ser usados pra ajudar na imobilização do bioreceptor, além de criarem camadas uniformes e estáveis, e por fim aderirem bem ao eletrodo de carbono (LEITE FILHO, 2015; BEZERRA et al., 2019).

Aminoácidos e outras moléculas com eletroatividade, ao receberem um certo potencial em uma célula eletrolítica podem ser dotados de cargas, e durante uma voltametria cíclica, onde o potencial varia e o ciclo recomeça numa quantidade variável de vezes, há uma facilitação do processo de formação de filmes orgânicos a partir dos aminoácidos da solução, onde ligações peptídicas ou ligações por desidratação ocorrem no estilo *head and tail* (MARTIN, 2013; LEITE FILHO, 2015).

2.12.3 Partículas metálicas

Partículas nanoscópicas são usadas como materiais condutores em várias atividades biomédicas. Em biossensores eletroquímicos, é possível criar esse tipo de partícula através de voltametria cíclica, de forma semelhante aos filmes poliméricos. O processo de nucleação e crescimento das partículas depende do número de voltas e da faixa de varredura, gerando uma eletrodeposição, onde a partícula metálica é aderida ao eletrodo ou fica suspensa na solução. A produção de nanopartículas de ouro e prata são bem documentadas na literatura através desse processo (POVEDANO et al., 2017; TIĞ, 2017; CARVALHO JÚNIOR, 2018).

2.13 DETECÇÃO DIRETA E INDIRETA EM BIOSSENSORES ELECTROQUÍMICOS GENOSSENSORES

Eletrodos modificados têm várias aplicações no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em DNA. A possibilidade de identificar sequências específicas de DNA atraiu atenção significativa nos últimos anos devido à sua possível aplicação em áreas como detecção de patógenos e diagnóstico de doenças genéticas. Em genossensores, quando uma fita simples de DNA é imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho, seus nucleotídeos ficam expostos, sendo passíveis de interagirem com o sistema bioanalítico eletroquímico. A detecção do analito de interesse, nesse caso uma sequência complementar, pode ser feita baseado no princípio de hibridização das duas sequências nucleotídicas (imobilizada + analito de interesse), originando um DNA de dupla hélice. Nessa configuração, os nucleotídeos não estão mais expostos, interagindo menos com a solução eletroquímica (ARDUINI et al., 2016; CAMPOS-FERREIRA et al., 2016; SAIDUR; AZIZ; BASIRUN, 2017).

Baseado no princípio de hibridização, a detecção da presença do analito pode ser direta ou indireta. No primeiro caso, um nucleotídeo eletroativo é explorado, um potencial específico é aplicado desencadeando uma corrente originada entre a interação deste nucleotídeo e a solução, produzindo uma oxidação ou redução. A literatura descreve bem a detecção direta do analito usando as guaninas (G) da sequência imobilizada. Logicamente, a tendência após a hibridização é que o processo não ocorra como anteriormente, uma vez que o nucleotídeo explorado não está interagindo como anteriormente com a solução, alterando o sinal captado no sistema bioanalítico (*Label free*) (OLIVEIRA et al., 2015; RAFIEE-POUR; BEHPOUR; KESHAVARZ, 2016; WANG et al., 2017).

A detecção indireta faz uso de mediadores químicos, ou seja, moléculas eletroativas. Esses mediadores interagem com os nucleotídeos livres da sequência imobilizada, reduzindo ou oxidando ao receberem o potencial aplicado, produzindo corrente nesse processo. Quando a dupla fita é formada após a hibridização, os mediadores não podem interagir com os nucleotídeos, alterando o sinal de resposta visualizado anteriormente pela interação com os nucleotídeos livres da sequência imobilizada no formato de fita simples. Entre os mediadores eletroquímicos mais utilizados encontra-se o azul de metileno (MB), molécula de baixo peso molecular carregada positivamente, que pode ser facilmente reduzida por dois elétrons à leucometileno. Este processo pode ser monitorado facilmente por voltametria cíclica (CV) ou voltametria de pulso diferencial (DPV) e tem sido o princípio de muitos genossensores

desenvolvidos até o momento (CHEN et al., 2013; YANG et al., 2014; BEZERRA et al., 2019).

O MB apresenta a capacidade de se intercalar às moléculas de DNA através da interação com suas bases guaninas. A ausência do ligante permite que o MB se ligue com alta eficiência ao DNA, produzindo um forte sinal eletroquímico, enquanto a presença do alvo complementar ligante não permite a interação do indicador redox, produzindo um sinal consequentemente menor (BANG; CHO; KIM, 2005; KHEZRIAN et al., 2013).

3 METODOLOGIA

O planejamento, organização e produção do trabalho experimental foram realizados nas instalações da divisão de Biotecnologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

3.2 BIOINFORMÁTICA

Com o intuito de produzir plataformas biossensoras específicas para o MAYV, capaz de identificar todos os três genótipos virais, 34 genomas completos do MAYV disponibilizadas em bancos de dados foram selecionados e baixados do ViPR (<https://www.viprbrc.org/>) e analisados no software CLC Main Workbench 8.0[®] e então alinhados pelo algoritmo de alimentação proprietário do software. Os parâmetros utilizados foram: Gap open cost=10.0; Gap open cost=1.0; Gap extension cost=1.0; End gap cost=Como qualquer um dos outros. As extremidades 3' e 5' não alinhados foram cortados, fornecendo 34 sequências com 11099 nucleotídeos cada. Em seguida, foram realizadas buscas por regiões 100% conservadas entre todos os 34 genomas. As regiões encontradas foram marcadas e salvas.

Baseado no tamanho das sequências usadas em genossensores presentes na literatura (SOUZA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2012; CAMPOS-FERREIRA et al., 2013, 2016; OLIVEIRA et al., 2015), foram eliminadas as sequências cujas extensões eram menores que 22 e maiores que 25 nucleotídeos. As sequências resultantes foram comparadas uma a uma com os bancos de dados de genomas virais e genoma humano do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) em busca de possíveis matches. Todas as sequências com probabilidade de anelamento com até 4 de erro de pareamento no anelamento foram excluídas usando a ferramenta "Find binding sites" do software CLC Main Workbench 8.0[®].

A ferramenta "Analyze primer properties" do software foi utilizada para verificar as propriedades das sequências restantes (temperatura de anelamento, auto-anelamento, e anelamento por início e fim de sequência – respectivamente: melting temperature, self annealing e self-end annealing). Baseados nos dados de propriedade, estrutura e tamanho, três sequências mostraram ser plausíveis de uso:

- (1) 3'-ACC GAC TTC TTT GTA CTT CCA GGC A-5';

- (2) 3'-AGA TAG ACG ACC TGC AGT CAG TGA-5'; e
- (3) 3'-CTA AAT AGG TGC TCT ACA CGA CAC-5'.

Quando comparada com as demais, a sequência 2 apresenta um maior conteúdo de guaninas [n = 7], esse conteúdo é importante para o biossensores eletroquímicos de detecção direta ou indireta. Por fim, essa sequência foi nomeada como sonda PO₄-ssDNA. Uma sequência quimicamente modificada, adicionando um grupamento amino na terminação 3' também foi produzida e denominada sonda NH₂-ssDNA. A sequência quimicamente modificada foi produzida com o propósito de verificar as melhores condições de uso da sequência específica obtida.

A sequência complementar de DNA das duas sondas obtidas foi:

- 3' - TCA CTG ACT GCA GGT CGT CTA TCT - 5'.

A sequência complementar foi nomeada como CssDNA. Uma sequência não-complementar, nomeada como (NCssDNA), foi usada para verificar a especificidade da sonda escolhida, cuja sequência é:

- 3' - CCA TCT GTG GCA TGA ACC CAA TAG C - 5'.

3.2 MATERIAIS E REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas usando água ultra pura. As tintas foram adquiridas da Gwent Group® - Londres, Reino Unido (Ag/AgCl) e da Loctite group® - Holanda (carbono), sendo armazenadas e utilizadas de acordo com as especificações dos fabricantes. Os aminoácidos L-ácido glutâmico e L-Cisteína monoméricos e 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris base), assim como o nitrato de prata, citrato de sódio e azul de metileno (MB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company® - St Louis, EUA. O tampão fosfato salino - PBS (10X) foi obtido da Gibco Company® (Life technology) - Nova York, EUA. As sondas de DNA e suas sequências complementar e não-complementar foram obtidas da Exxtend Biotecnologia® - Paulínia, Brasil.

3.3 EQUIPAMENTOS

Todas as mensurações eletroquímicas foram feitas ao acoplar os eletrodos fabricados a um potenciostato AUTOLAB PGSTAT®, utilizando o software NOVA 2.0. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.4 PREPARAÇÃO DAS SONDAS, ALVO E OUTRAS SOLUÇÕES

Uma solução-mãe a partir de H₂O *DNase free* foi preparada à partir de cada uma das sequências, contendo 10mM cada e foram armazenadas em freezer (-4 °C) até o momento do uso. As diluições consecutivas foram feitas em tampão PBS 1X. Todos os reagentes foram usados como adquiridos, em alta pureza.

Uma solução de Tris-HCL (20 mM aquosa) foi preparada. Uma solução de MB de 500 µM foi produzida usando a solução anterior. As soluções de aminoácidos foram preparadas em concentração de 10 mM cada, em PBS 1X (solução aquosa) e usadas frescas (recentemente preparadas). A solução com monômeros de ácido glutâmico foi submetida à sonicação 45 minutos antes do uso para homogeneização. Nitrato de prata e citrato de sódio foram preparados (1:1) em uma solução aquosa de 500 µM. Todas as soluções foram preparados em água ultrapura e armazenas em geladeira (~10 °C) e usadas em pH 7.4.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Um gel de agarose 2% em tampão borato de sódio (Ácido bórico 36,4 mM e NaOH 10mM, pH 8,0) contendo 0,01% de brometo de etídio foi preparado para confirmar a especificidade da sonda e o alvo sintéticos. Cinco poços foram preparados no gel, seguindo a ordem que foram aplicados:

- 1- Ladder Invitrogen® padrão de 50 bp (3 µL).
- 2- Sonda PO₄-ssDNA (5µL contendo 100µM);
- 3- CssDNA (5µL contendo 100µM);
- 4- Sonda PO₄-ssDNA e CssDNA (5µL contendo 100µM cada), previamente submetidos à hibridização por 10 minutos à 59,6 °C;
- 5- Sonda PO₄-ssDNA e NCssDNA (5µL contendo 100µM cada), também previamente submetidos à hibridização por 10 minutos à 59,6 °C.

Após aplicadas as amostras de material, o gel foi submetido à 40 minutos de migração eletroforética a 100 V, as bandas correspondentes à sonda, ao alvo e à sonda e alvo hibridizados foram visualizadas sob iluminação de luz UV.

3.6 PRODUÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS

As plataformas para biossensores eletroquímicos foram baseadas em um sistema com três eletrodos (Eletrodo de Trabalho, Contra Eletrodo e Eletrodo de Trabalho) do tipo *Screen*

Printed. O Eletrodo de Referência foi constituído de tinta Ag/AgCl sobreposta em uma linha condutora, sendo curada a 60 °C por 30 minutos. Os eletrodos de Trabalho e Contra Eletrodo foram produzidos com tinta de carbono sobreposta em outras duas linhas condutoras, secos também em estufa a 60 °C por 1 hora e 30 minutos. O tamanho dos biossensores foi calculado de acordo com os estudos de condutibilidade e interferências dos sinais elétricos, que foram acompanhados no software NOVA, versão 2.0 em estudos anteriores do grupo de pesquisa em nosso laboratório.

As três linhas condutoras foram construídas em cima de tiras de policloreto de polivinila (PVC). O eletrodo de trabalho foi produzido para que tivesse uma área de superfície e contato de aproximadamente 7 mm². Após secos e curados, os eletrodos foram submersos em ácido sulfúrico 1% por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos, o processo foi repetido duas vezes. Após esse período, três lavagens consecutivas com água ultra pura foram realizadas para retirar resquícios do ácido.

3.7 MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS

3.7.1 Adição de monocamadas de L-cisteína

Para a adição de monocamadas de L-cisteína (MonoCys) no eletrodo de trabalho, uma solução recém preparada de 10 mM de L-cisteína em PBS 1X (pH 7.4). foi depositada em cima dos eletrodos de trabalho (5 µL) por 15 minutos para interagir com o mesmo. Após esse período, esses eletrodos foram lavados com 500 µL de água Mili-Q para a retirada dos monômeros não adsorvidos na superfície do eletrodo, então os eletrodos foram deixados secar em temperatura ambiente.

3.7.2 Eletropolimerizações e eletrodeposições

Para a formação do filme de Poli-L-cisteína (PolyCys) na superfície do eletrodo de trabalho, a técnica de eletropolimerização da L-cisteína foi utilizada. A solução L-cisteína acima citada foi preparada, 50 µL dessa solução foi depositada em cima da área de trabalho. Usando voltametria cíclica (CV), 10 ciclos foram aplicados sob a faixa de varredura de 50 mV/s, em uma faixa de potencial de -0.2 V à +1.2 V. Após o processo de CV, os eletrodos foram lavados com 500 µL de água Mili-Q para a retirada dos monômeros não ligados, então os eletrodos foram deixados secar em temperatura ambiente.

De modo semelhante, para a formação do filme de Poli-L-ácido glutâmico (PolyGlutAc) no eletrodo, a eletropolimerização do L-ácido glutâmico foi conduzida por meio

de CV, onde 50 μL de uma solução recém produzida de 10 mM de L-ácido glutâmico em PBS 1X (pH 7.4) foi inserida em cima da área de trabalho, seguida da aplicação de 10 ciclos foram sob a faixa de varredura de 100 mV/s, em uma faixa de potencial de -0.8 V à $+2.0\text{ V}$. Após o processo de CV, os eletrodos também foram lavados com 500 μL de água Mili-Q para a retirada dos monômeros não ligados e deixados secar em temperatura ambiente.

Para a eletrodeposição das nanopartículas de prata (AgNP), 50 μL da solução de nitrato de prata e citrato de sódio foram adicionados à área de trabalhos dos eletrodos impressos. A CV foi usada para proporcionar a nucleação das AgNP sob as seguintes condições: 25 ciclos foram aplicados em uma faixa de potencial de -1.25 V à -0.7 sob uma faixa de varredura em 50 mV/s. Após a eletrodeposição, os eletrodos foram lavados com água Mili-Q (2 mL) para retirada de partículas não agregadas aos eletrodos.

3.7.3 Imobilização das sondas de DNA

Após a secagem dos eletrodos, 5 μL de sonda de DNA específica foram adicionados na superfície dos eletrodos de trabalho. Para promover o processo de adsorção física, o eletrodo foi deixado em repouso por 30 minutos à temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.4 Hibridização de sonda-alvo

5 μL de alvo específico foram adicionados na superfície dos eletrodos após a etapa de imobilização. Para promover o processo da hibridização, os eletrodos modificados e cujas sondas foram imobilizadas foram confinados em uma câmara de hibridização com shake constante por 10 minutos à temperatura de $59.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura ótima para a hibridização segundo as propriedades analisadas pelo CLC Main Workbench 8.0®).

3.8 MENSURAÇÕES ELETROQUÍMICAS

O comportamento dos eletrodos modificados foram observados através da aplicação de voltametria de pulso diferencial (DPV). Para isso, 5 μL de uma solução aquosa de azul de metileno - ou *Methylene Blue* (MB) - na concentração de 500 mM foi adicionada após todas as etapas no eletrodo de trabalho por 5 minutos para interagir com os materiais dos eletrodos modificados. Após esse período, todos os eletrodos foram lavados com 500 μL de tampão Tris-HCL (pH 7.4) em concentração de 20 mM para a retirada de MB reagente sobressalente. Em seguida 50 μL do mesmo tampão Tris-HCL foram usados para a leitura, atuando como solução doadora de elétrons. A varredura foi feita entre -0.6 e 0 V de potencial, e a taxa de

velocidade de varredura aplicada foi de 50 mV/s. Todas as mensurações foram feitas em temperatura ambiente, os resultados foram tratados pelas ferramentas “moving average” (tratamento de linha de base) e “Smooth” (em nível 2) do software proprietário do NOVA 2.0.

Uma mensuração contínua foi realizada em eletrodos com modificação de AgNPs. A varredura estendeu-se para +0.3 para visualizar o segundo pico de corrente entre o potencial de -0.1 e +0.1 devido à presença do AgNP.

3.9 DESIGN DOS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos foram desenvolvidos para propiciar a detecção da sequência complementar do MAYV (C_{ss}DNA). Para isso, foram delineados seis diferentes sistemas de detecção de plataformas biossensoras:

Tabela 1 – Delineamento das plataformas biossensoras desenvolvidas.

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5	Sistema 6
Eletrodeposição de AgNP	+	+	-	-	-	-
Uso de L-Cisteína	+	+	+	+	+	-
Uso de L-ácido glutâmico	-	-	-	-	-	+
Eletropolimerização	-	+	-	-	+	+
PO4-ssDNA	+	+	+	-	+	-
NH ₂ -ssDNA	-	-	-	+	-	+

Fonte: Autor

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

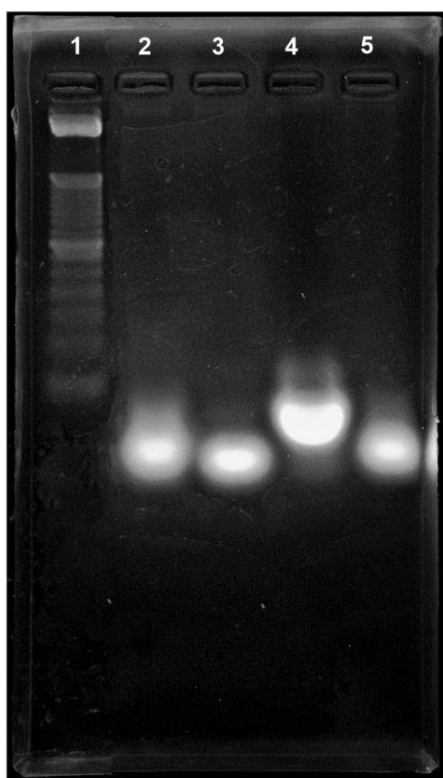
Os dados foram avaliados por múltiplos testes t ($p < 0,05$) para comparar dados de grupos independentes. Os outliers foram identificados e removidos pelo teste ROUT ($Q = 10\%$).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA Sonda DE DNA

A capacidade de interação da sonda com o alvo sintético foi testada em gel de agarose (Figura 8), onde foi possível visualizar uma banda de maior peso molecular depositada no poço número 4, em comparação às depositadas nos outros poços.

Figura 8 – Teste de hibridização da sonda de MAYV e alvo em eletroforese em gel de agarose. Nos poços foram aplicados: (1) padrão Ladder; (2) Sonda de DNA MAYV; (3) Alvo sintético de DNA do MAYV; (4) Sonda de DNA do MAYV e alvo complementar sintético após o processo de hibridização e (5) Sonda de DNA do MAYV e alvo não-complementar sintético após o processo de hibridização.



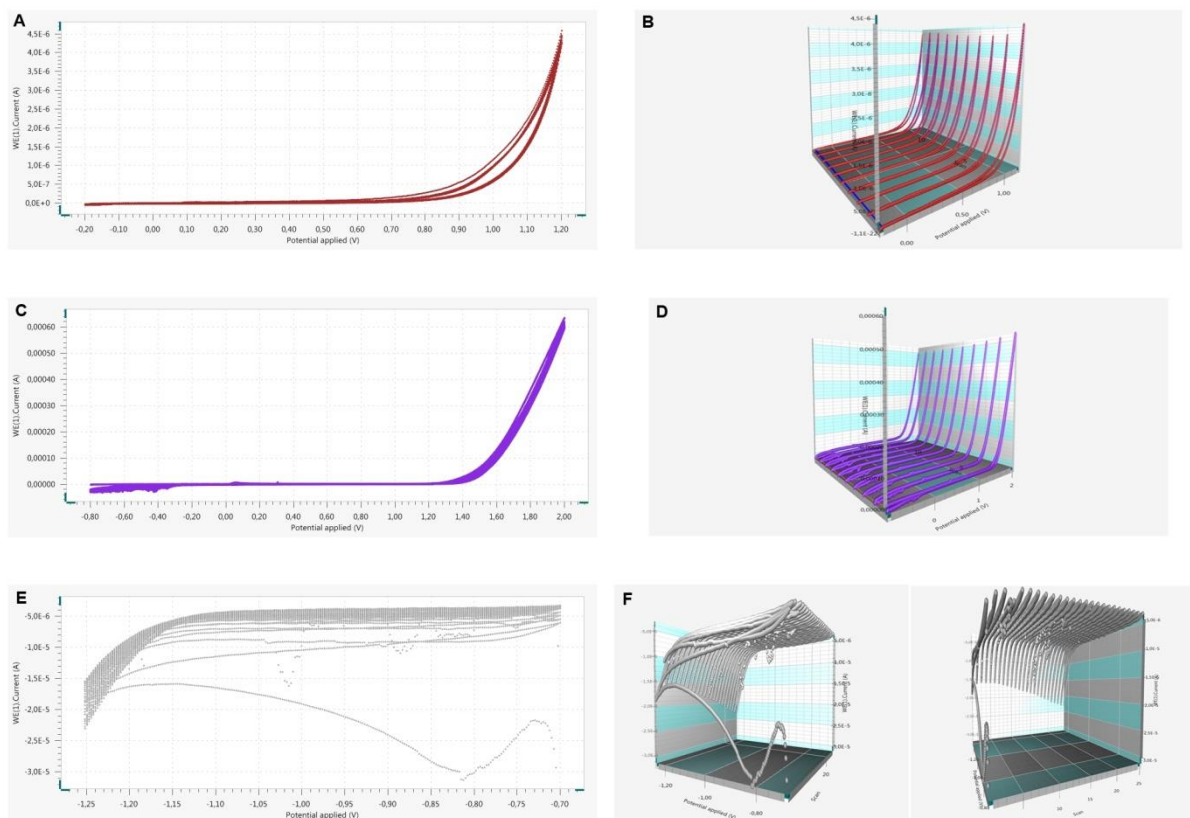
Fonte: Acervo pessoal.

4.2 ELETRODOS MODIFICADOS

Os voltamosgramas obtidos durante a eletropolimerizações de PolyCys, PolyGlutAc e a eletrodeposição de AgNPs, mostram perfis com picos anódicos e catódicos. Os picos

anódicos das eletropolimerizações de PolyCys, PolyGlutAc foram bem definidos, enquanto o pico catódico das AgNPs também foi bem marcado (Figura 9).

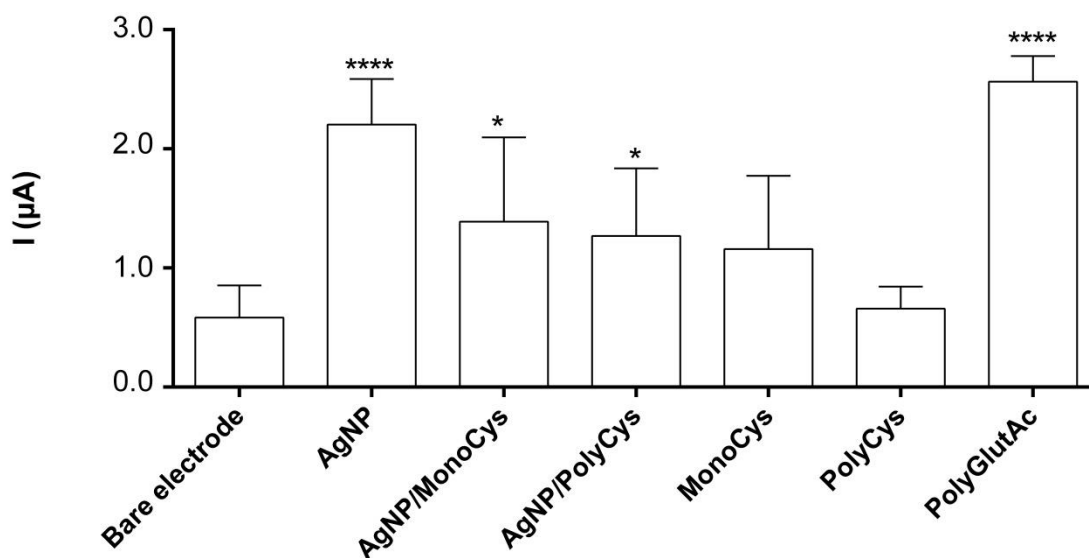
Figura 9 – Voltamogramas das eletropolimerizações e eletrodeposições. A e B – Eletropolimerizações de poli-L-cisteína; (C e D) eletrodeposições de poli-L-ácido glutâmico e (E e F) eletrodeposição/nucleação de AgNPs.



Fonte: acervo pessoal.

Todos os picos de corrente dos eletrodos modificados foram comparados com o eletrodo sem modificações, para caracterizar eletroquimicamente as modificações através de DPV (potencial variável de -0.6 até 0 V). Os picos de corrente foram visualizados entre -0.4 e -0.3 V. Somente os eletrodos AgNP, AgNP/MonoCys e PolyGlutAc foram estatisticamente diferentes do eletrodo sem modificações (test $t - p < 0.05$) (Figura 10). A comparação entre os eletrodos MonoCys e AgNP/MonoCys não diferiram estatisticamente ($p = 0.5963$). De forma similar, PolyCys e AgNP/PolyCys também não diferiram um do outro ($p = 0.0554$).

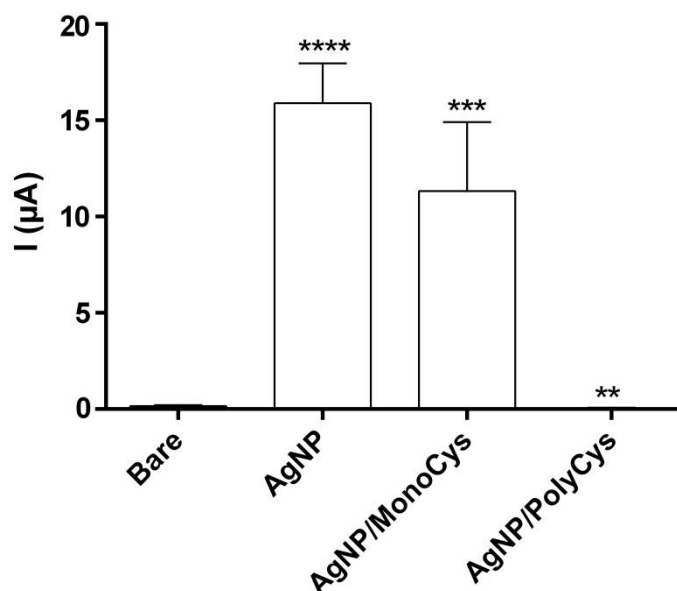
Figura 10 – Análise das modificações dos eletrodos. Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão. Os dados foram comparados eletrodo sem modificações pelo *t* test ($p < 0.05$) — * $p < 0.05$ ou **** $p < 0.0001$ vs. eletrodo sem modificações.



Fonte: Acervo pessoal.

Os eletrodos modificados com a eletrodeposição de AgNPs foram caracterizados com uma mensuração secundária de DPV, com uma faixa de potencial entre -0.1 e +0.1 V (Figura 11). Nesta segunda mensuração, todos os eletrodos modificados com a eletrodeposição de AgNPs foram diferentes estatisticamente do eletrodo sem modificações (teste *t*, $p < 0.05$).

Figura 11 – Caracterização de eletrodos com eletrodeposição de AgNPs e modificações secundárias (AgNP/MonoCys e AgNP/PolyCys). Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão. Os dados foram comparados com o eletrodo sem modificações pelo *t* test ($p < 0.05$) — ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ou **** $p < 0.0001$ vs. Eletrodo sem modificações.

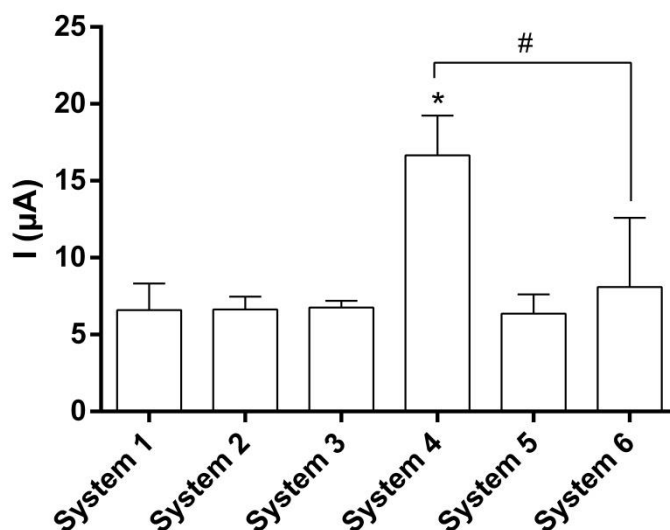


Fonte: Acervo pessoal.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DAS SONDAS E OTIMIZAÇÃO

As imobilizações das sondas foram testadas em todos os sistemas usando 5 μL de $\text{PO}_4\text{-ssDNA}$ ou $\text{NH}_2\text{-ssDNA}$, numa concentração de 5 μM . Os resultados são apresentados na Figura 12. Não foram notadas diferenças entre os sistemas com ou sem AgNPs.

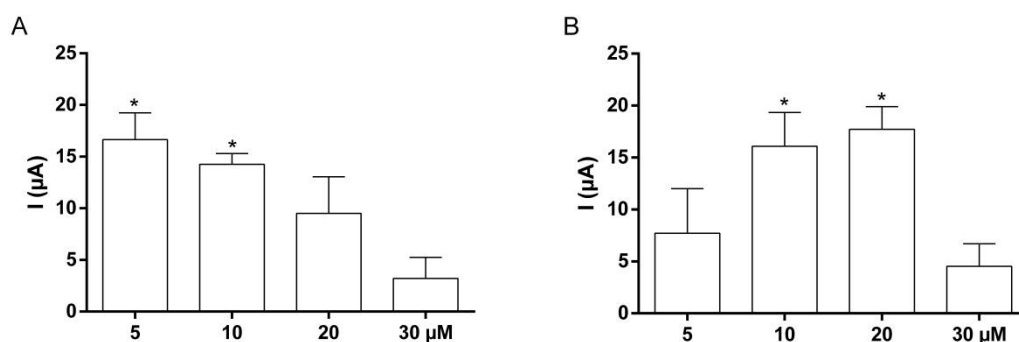
Figura 12 – Imobilização de sondas de DNA em diferentes sistemas testados. A imobilização da sonda $\text{PO}_4\text{-ssDNA}$ (Sistemas 1, 2, 3 e 5) e sonda $\text{NH}_2\text{-ssDNA}$ (Sistemas 4 e 6). Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão. Todos os dados dos sistemas foram comparados entre si pelo t test ($p < 0.05$) — * $p < 0.05$; e # $p < 0.05$. Sistema 4 vs. Sistema 6.



Fonte: Acervo pessoal.

Considerando que os mais altos picos de corrente foram observados nos sistemas 4 e 6, a otimização das sondas foi conduzida usando esses dois sistemas. Os resultados do processo de otimização são apresentados na Figura 13. Seguindo os resultados obtidos, as concentrações de 5 μM foi escolhida para o Sistema 4 (Figura 13 A) e 10 μM para o Sistema 6 (Figura 13 B).

Figura 13 – Otimização em eletrodos modificados. A – Sistema 4, e B - Sistema 6. Os valores são as médias $\pm$ desvio padrão. Todos dados dos sistemas foram comparados entre si pelo *t* test ($p < 0.05$) — * $p < 0.05$.

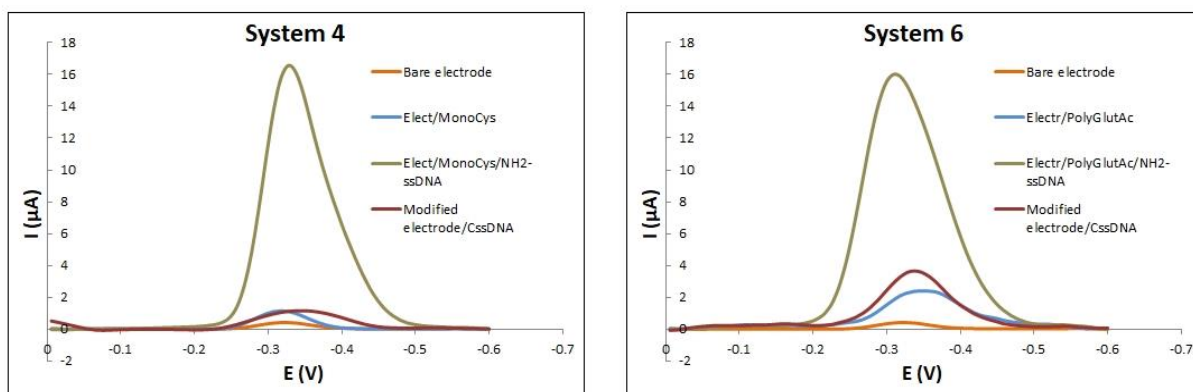


Fonte: Acervo pessoal.

4.4 REPRESENTAÇÃO FINAL DO SISTEMA DE DETECÇÃO DO MAYV

Os sistemas 4 e 6 apresentaram altos picos de corrente em comparação com os outros (Elect/MonoCys/ NH_2 -ssDNA e Elect/PolyGlutAc/ NH_2 -ssDNA) e foram testados para a hibridização com o alvo (C_{ss}DNA). Os resultados mostraram que ambos são capazes de detectar o alvo específico sintético do MAYV. As diferenças finais entre as fases dos dois sistemas construídos são apresentados na Figura 14. Devido a ausência de sobreposição, o Sistema 6 foi escolhido como o melhor sistema entre os outros sistemas testados para a detecção do MAYV.

Figura 14 – Comportamento eletroquímico de cada etapa da construção dos Sistemas 4 e 6. As mensurações foram realizadas por DPV.



Fonte: Acervo pessoal.

5 DISCUSSÃO

Na observação da imagem de eletroforese em gel de agarose (Figura 8) uma banda de maior peso pode ser visualizada no caminho do poço 4, uma vez que neste mesmo poço havia a solução de sonda+alvo após o processo de hibridização, pode-se considerar que esta banda é uma molécula de DNA dupla fita, o que fica mais evidente ao compará-la com as outras bandas que mostram menor peso molecular (uma vez que são fitas simples de DNA). O caminho do poço número 5 da mesma figura mostra uma banda que aparenta ser formada por uma fita de DNA fita simples. No poço 5 foi aplicada a solução de sonda+alvo não-complementar após o processo de hibridização. Este resultado indica que a sonda do MAYV construída por ferramentas de bioinformática foi capaz de se ligar-se somente com a sequência nucleotídica complementar.

Neste trabalho, seis diferentes plataformas eletroquímicas biossensoras foram desenvolvidas para detectar o MAYV. Esses sistemas foram investigados em cada etapa após modificação dos eletrodos *screen-printed*. Todas as modificações dos eletrodos foram feitas com sucesso. A mudança de pico de corrente após as modificações confirma isso. Uma das modificações promovidas foi baseada na produção de monocamada de L-cisteína. A conformação assumida pela L-cisteína deve ocorrer devido à interação entre os grupamentos desse aminoácido e o carbono, formando então a monocamada (Eletrodo MonoCys – Sistema 1). Para a formação de uma monocamada, uma interação fraca precisa ser estabelecida.

Eletrodos feitos de pasta de carbono muitas vezes apresentam grupamentos como OH e COOH em sua superfície. E em solução aquosa, o aminoácido L-cisteína perde facilmente o hidrogênio, anteriormente ligado ao enxofre do grupamento tiol (SH) (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007; YI et al., 2017). Uma ligação de hidrogênio é uma interação fraca que ocorre quando um átomo muito eletronegativo, como um oxigênio, está ligado covalentemente a um hidrogênio, atraindo fortemente os elétrons da nuvem eletrônica deste hidrogênio, induzindo a formação de uma zona menos eletronegativa na nuvem, ou seja, é a formação de uma região mais positiva que o restante da nuvem eletrônica. Esta parte mais positiva atrai para si outros átomos com características eletronegativas fortes, como o enxofre. Dessa maneira, pode-se hipotetizar que a síntese da monocamada de L-cisteína é baseada na interação fraca de uma ligação de hidrogênio entre o enxofre desse aminoácido (OLIVEIRA, 2015) e os grupamentos OH e COOH do eletrodo de carbono, induzindo a uma interação como uma ligação de hidrogênio entre o eletrodo de carbono e o aminoácido L-cisteína.

Foram produzidas, também com sucesso, através do processo de eletrossíntese, as AgNPs (por eletrodeposição) e os filmes poliméricos (a partir dos aminoácidos L-ácido glutâmico e L-cisteína) (por eletropolimerizações), como mostra a Figura 9. As leituras primárias dos experimentos foram conduzidas na faixa de potencial de 0.4 à 0.3 V, os sinais de pico de corrente que são observados nessa faixa de potencial representam o potencial de oxidação do MB (SANI et al., 2019). Embora seja observado o aumento do pico após a deposição de L-cisteína (eletrodo Elect/MonoCys – Sistema 1), nenhuma diferença estatística foi encontrada em comparação ao eletrodo sem modificações (Figura 3).

Com o propósito de avaliar a influência das nanopartículas de prata produzidas nos resultados, os experimentos foram conduzidos na ausência e na presença de AgNPs. Os eletrodos modificados com AgNPs foram analisados mais de uma vez, onde a leitura estendida na faixa de potencial entre -0.1 à +0.1 V revelou a presença dessas estruturas nos eletrodos (Figura 11 – Sistemas). A diminuição do sinal de pico de corrente após a deposição cisteína (Elect/AgNP/MonoCys – Sistema 1) dificultou o contato das AgNPs com a solução adjacente, prevenindo a formação de picos de corrente. Da mesma forma, a diminuição do pico de corrente no eletrodo Elect/AgNP/PolyCys (Sistema 2) mostra um impedimento de corrente, uma vez que o filme impede o contato de AgNPs e a solução adjacente. Em resumo, no potencial entre -0,1 a +0,1 V, uma corrente representativa pode ser visualizada em eletrodos modificados com AgNPs quando comparados ao eletrodo puro. Este pico diminui quando algum material é colocado na superfície desses eletrodos.

No eletrodo Elect/AgNP/MonoCys (Sistema 1), a monocamada é formada pela interação do grupo SH presente no aminoácido L-cisteína e as AgNPs, mas esta interação não bloqueia totalmente o contato das AgNPs com a solução, portanto, a corrente é visível e o desvio é proporcional à disposição de L-cisteína/áreas sem revestimento completo. Na modificação do eletrodo Eletr/AgNP/PolyCys (Sistema 2), a formação do polímero evita o contato das AgNPs com a solução, resultando na diminuição do pico de corrente. E apesar da síntese do filme PolyCys, o aumento do pico de corrente não foi observado nos Sistemas 2 e 5.

A diminuição do sinal de corrente após a deposição de L-cisteína na superfície dos eletrodos com AgNPs indica a ocorrência de interações moleculares entre o aminoácido L-cisteína e as nanopartículas de prata, produzindo uma monocamada (Elect/AgNP/MonoCys – Sistema 1). O grupo tiol (SH) da L-cisteína apresenta alta afinidade com superfícies de prata e ouro, produzindo uma ligação estável (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016). Além disso, as moléculas que contêm grupo tiol são amplamente utilizadas para conectar dois componentes

diferentes em uma plataforma única, neste processo, primeiramente ocorre à interação do metal nobre e do grupo tiol; depois, essas moléculas com grupo tiol ligadas a metais nobres são modificadas, como braços conectores, para interagir com o segundo componente. Em biossensores eletroquímicos, essas etapas podem ser realizadas para produzir plataformas estáveis de detecção (RASHEED; SANDHYARANI, 2017).

As sondas foram adquiridas em duas formas, uma sem modificações, apresentando um “esqueleto de fosfatos”, e a segunda sonda com uma modificação NH_2 na terminação 3' (PO_4 -ssDNA e NH_2 -ssDNA, respectivamente). A carga negativa do esqueleto de fosfatos pode interagir com as cargas positivas dos grupamentos NH_2 dos aminoácidos, em uma adsorção física (BEZERRA et al., 2019). Dessa maneira, o NH_2 da sonda modificada pode interagir com a carga negativa dos grupamentos COOH dos aminoácidos, também em uma adsorção física. Essas últimas, interações devem ocorrer nos Sistemas 4 e 6 (Elect/PolyGlutAc/ NH_2 -ssDNA) (RASHID; YUSOF, 2017).

Todas as modificações feitas utilizando aminoácidos mostraram ser capazes de imobilizar as sondas de DNA. Neste tipo de modificação, foram testados os dois tipos de sondas. A configuração desenvolvida pelas interações químicas que criam um impedimento estérico, impedindo a interação entre as cargas positivas dos grupamentos NH_2 no Eletrodo MonoCys e o esqueleto de fosfato da sonda PO_4 -ssDNA, resultando numa baixa interação entre essa sonda e o eletrodo modificado com a monocamada. Entretanto, o grupamento carboxílico do eletrodo modificado com a monocamada (MonoCys) é capaz, sem impedimento estérico, de promover interações com a sonda NH_2 -ssDNA, o que resulta em um aumento de quantidade na de sonda NH_2 -ssDNA imobilizada, e por consequência, aumento da corrente em resposta.

Para explicar se o pico de corrente observado no eletrodo modificado MonoCys/ NH_2 -ssDNA ocorreu devido a interações entre a sonda NH_2 -ssDNA e a monocamada do aminoácido L-cisteína ou se seria devido a interações diretas entre a sonda NH_2 -ssDNA com o carbono da superfície do eletrodo, foi conduzido na experimento, depositando diretamente a sonda modificada NH_2 -ssDNA no eletrodo de carbono. Após lavados, as mensurações mostraram um pico de corrente similar ao pico de corrente observado no eletrodo sem modificações (branco). Em outras palavras, o pico de corrente visualizado no eletrodo modificado MonoCys/ NH_2 -ssDNA é devido a interação entre algum grupamento presente na L-cisteína e o carbono que não seja o grupamento NH_2 , uma vez que esse mesmo grupamento está presente na sonda NH_2 -ssDNA.

Todos os eletrodos com sondas de DNA imobilizadas também capazes de hibridizar com seu alvo sintético. Os maiores picos de corrente em todos os sistemas foram visualizado em eletrodos modificados com sondas de DNA, isso deve-se a maior quantidade de moléculas de MB, que se ligam as sondas de DNA presentes nesses eletrodos. Entretanto, há uma diminuição do pico de corrente quando o alvo (C_{ss}DNA) é aplicado, isso pode ocorrer devido a competição entre o analito e as moléculas de MB pela ligação à sonda de DNA. Nesse evento, há menos interações entre as moléculas de MB se ligando as sondas de DNA, dessa maneira, diminuindo o pico de corrente (SANI et al., 2019).

Neste trabalho, a aplicação da sonda aminada (NH₂-ssDNA) sempre resultou nos mais altos picos de corrente em comparação com os outros sistemas onde foi aplicada a sonda sem alterações químicas (PO₄-ssDNA). Somente o sistema 6 de diferenciar todos os passos da construção das plataformas eletroquímicas. Estes são os primeiros sistemas eletroquímicos desenvolvidos especificamente para detecção de MAYV e etapas para otimização dessas plataformas de biossensores eletroquímicos são necessárias.

6 CONCLUSÃO

Uma sonda para detecção do MAYV foi construída utilizando-se ferramentas de bioinformática, sendo capaz de ligar-se com a sequência nucleotídica complementar. Dois tipos de sendo foram usadas, uma sonda sem modificações, com esqueleto de fosfato (PO₄-ssDNA), e a sonda com uma modificação NH₂ na terminação 3' (NH₂-ssDNA). De modo a tornar possível a detecção do MAYV, por métodos eletroquímicos, seis diferentes plataformas eletroquímicas biossensoras foram desenvolvidas em eletrodos screen-printed.

As plataformas biossensoras construídas foram modificadas utilizando-se os aminoácidos L-ácido glutâmico e L-cisteína (para formação de finos filmes poliméricos sobre os eletrodos, por eletropolimerizações), como também pela eletrossíntese de AgNPs por eletrodeposição. As modificações feitas nos eletrodos mostraram ser capazes de imobilizar as sondas de DNA. Somado a isso, todos os eletrodos modificados contendo as duas diferentes sondas de DNA imobilizadas foram capazes de hibridizar com seu alvo sintético.

Os eletrodos modificados que apresentavam a sonda aminada (NH₂-ssDNA) apresentaram os mais altos picos de corrente em comparação com aos demais sistemas testados, sendo, portanto, a mais promissora para o desenvolvimento de biossensores/detecção do Mayaro vírus.

Dentre os sistemas propostos, somente o Sistema seis, que apresentava eletropolimerização de L-ácido glutâmico e sonda NH₂-ssDNA apresentou resultados que possibilitaram diferenciar todos os passos da construção/modificação das plataformas eletroquímicas. Sendo assim, o Sistema seis o mais promissor para construção de biossensores portáteis e sensíveis ao Mayaro vírus.

Em termos gerais, para o nosso conhecimento, estes são os primeiros sistemas eletroquímicos desenvolvidos especificamente para detecção de MAYV, assim como as etapas para otimização dessas plataformas de biossensores eletroquímicos. Os resultados apresentados são relevantes para o desenvolvimento de estudos futuros que permitirão a construção de biossensores portáteis e sensíveis ao MAYV.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, por meio de bioinformática, foram apresentadas três sequências específicas que podem ser usadas para a detecção do Mayaro vírus. Entre as sequências apresentadas uma foi usada como sonda de DNA para a detecção do Mayaro vírus em plataformas de biossensores eletroquímicos. Várias modificações em eletrodos do tipo *Screen Printed* foram realizadas para imobilizar as sondas. As eletrossínteses foram capazes de produzir filmes poliméricos de cisteína e ácido glutâmico, além de produzir com sucesso, nanopartículas de prata. Além dessas, produzimos monocamadas tanto sobre as partículas de prata como no eletrodo de carbono.

Seis sistemas foram desenvolvidos para detecção do Mayaro vírus, e todos foram capazes de imobilizar a sonda DNA, diferenciando entre o primeiro passo da modificação e o passo de imobilização. No entanto, os resultados mostraram que apenas um desses sistemas apresentou relativa viabilidade para ser usado no diagnóstico de infecção do Mayaro vírus. Os próximos passos incluem as otimizações de todos os passos desse sistema, como testes de detecção limite, tempo de prateleira (viabilidade do sistema pelo tempo) e de amostras biológicas.

Somado a isso, durante o desenvolvimento desse trabalho, uma revisão de literatura foi produzida, e suas informações foram transcritas em um artigo de revisão, sendo publicado em periódico da área da saúde destinada a biomedicina tropical, assim como publicações desenvolvidas em parcerias com outros laboratórios, versando também sobre arboviroses.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; GRIMMER, G. H.; DE PAULA, V. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; BRAGA, W. S. M.; LUZ, S. L. B. Mayaro virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.
- AITKEN, T. H. G.; DOWNS, W. G.; ANDERSON, C. R.; SPENCE, L.; CASALS, J. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. **Science**, v. 131, n. 3405, p. 986, 1960.
- ANDERSON, C. R.; DOWNS, W. G.; WATTLE, G. H.; AHIN, N. W.; REESE, A. A. Mayaro virus: a new human disease agent. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957.
- ARAVINDAN, N.; SANGARANARAYANAN, M. V. Differential pulse voltammetry as an alternate technique for over oxidation of polymers: Application of electrochemically synthesized over oxidized poly (Alizarin Red S) modified disposable pencil graphite electrodes for simultaneous detection of hydroquinone. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 789, p. 148–159, 2017.
- ARDUINI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; PIERMARINI, S.; RICCI, F.; VOLPE, G. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114–126, 2016.
- 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, 2013.
- AUGUSTE, A. J.; LIRIA, J.; FORRESTER, N. L.; GIAMBALVO, D.; MONCADA, M.; LONG, K. C.; MORÓN, D.; DE MANZIONE, N.; TESH, R. B.; HALSEY, E. S. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742, 2015.
- AVELINO, K. Y. P. dos S. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em**

nanoestruturas para o diagnóstico ultrasensível do oncogene quimérico

BCR/ABL Universidade Federal de Pernambuco, , 2017. .

AZEVEDO, R. S. S.; SILVA, E. V. P.; CARVALHO, V. L.; RODRIGUES, S. G.; NETO, J. P. N.; MONTEIRO, H. A. O.; PEIXOTO, V. S.; CHIANG, J. O.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Mayaro fever virus, Brazilian amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830, 2009.

BANG, G. S.; CHO, S.; KIM, B.-G. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 6, p. 863–70, dez. 2005.

BATISTA, P. M.; ANDREOTTI, R.; ALMEIDA, P. S. de; MARQUES, A. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F. da C. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013.

BATISTA, P. M.; ANDREOTTI, R.; CHIANG, J. O.; FERREIRA, M. S.; VASCONCELOS, P. F. da C. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 168–173, 2012.

BERGREN, N. A.; HALLER, S.; ROSSI, S. L.; SEYMOUR, R. L.; HUANG, J.; MILLER, A. L.; BOWEN, R. A.; HARTMAN, D. A.; BRAULT, A. C.; WEAVER, S. C. “Submergence” of Western equine encephalitis virus: Evidence of positive selection argues against genetic drift and fitness reductions. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008102, 2020.

BETTAZZI, F.; MARRAZZA, G.; MINUNNI, M.; PALCHETTI, I.; SCARANO, S. Biosensors and related bioanalytical tools. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 77, p. 1–33, 2017.

BEZERRA, G.; CÓRDULA, C.; CAMPOS, D.; NASCIMENTO, G.; OLIVEIRA, N.; SEABRA, M. A.; VISANI, V.; LUCAS, S.; LOPES, I.; SANTOS, J. Electrochemical aptasensor for the detection of HER2 in human serum to assist in the diagnosis of early stage breast cancer. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 411, n. 25, p. 6667–6676, 2019.

BLOHM, G.; ELBADRY, M. A.; MAVIAN, C.; STEPHENSON, C.; LOEB, J.; WHITE, S.;

TELISMA, T.; CHAVANNES, S.; DE ROCHAR, V. M. B.; SALEMI, M. Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 87, p. 151–153, 2019.

BOGOCH, I. I.; BRADY, O. J.; KRAEMER, M. U. G.; GERMAN, M.; CREATORE, M. I.; KULKARNI, M. A.; BROWNSTEIN, J. S.; MEKARU, S. R.; HAY, S. I.; GROOT, E. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335–336, 2016.

BRASIL. **MANUAL PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES NO ESTADO DE GOIÁS** . Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/wp-content/uploads/2016/12/manual-diagnostico-das-arboviroses-go.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2020.

BRUNINI, S.; FRANÇA, D. D. S.; SILVA, J. B.; SILVA, L. N.; SILVA, F. P. A.; SPADONI, M.; REZZA, G. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 1025, 2017a.

BRUNINI, S.; FRANÇA, D. D. S.; SILVA, J. B.; SILVA, L. N.; SILVA, F. P. A.; SPADONI, M.; REZZA, G. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 1025–1026, jun. 2017b. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/6/16-0929_article.htm>. Acesso em: 1 ago. 2018.

CALISHER, C. H.; GUTIERREZ, E.; MANESS, K. S.; LORD, R. D. Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. 1974.

CAMINI, F. C.; DA SILVA CAETANO, C. C.; ALMEIDA, L. T.; DA COSTA GUERRA, J. F.; DE MELLO SILVA, B.; DE QUEIROZ SILVA, S.; DE MAGALHÃES, J. C.; DE BRITO MAGALHÃES, C. L. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus research**, v. 236, p. 1–8, 2017.

CAMPOS-FERREIRA, D. S.; NASCIMENTO, G. A.; SOUZA, E. V. M.; SOUTO-MAIOR, M. A.; ARRUDA, M. S.; ZANFORLIN, D. M. L.; EKERT, M. H. F.; BRUNESKA, D.; LIMA-FILHO, J. L. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica chimica acta**, v. 804, p. 258–263, 2013.

CAMPOS-FERREIRA, D. S.; SOUZA, E. V. M.; NASCIMENTO, G. A.; ZANFORLIN, D. M. L.; ARRUDA, M. S.; BELTRAO, M. F. S.; MELO, A. L.; BRUNESKA, D.; LIMA-FILHO, J. L. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 443–450, 2016.

CANALI, M.; RIVAS-MORALES, S.; BEUTELS, P.; VENTURELLI, C. The Cost of Arbovirus Disease Prevention in Europe: Area-Wide Integrated Control of Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Emilia-Romagna, Northern Italy. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 444, 2017.

CARVALHO, C. A. M.; SILVA, J. L.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, A. M. O. On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. **PeerJ**, v. 5, p. e3245, 2017.

CARVALHO JÚNIOR, J. A. Estudo da incorporação de nanopartículas de dióxido de silício em filmes de polianilina a diferentes pHs. 2018.

CASALINI, S.; BORTOLOTTI, C. A.; LEONARDI, F.; BISCARINI, F. Self-assembled monolayers in organic electronics. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 1, p. 40–71, 2017.

CAUSEY, O. R. The isolation of virus from natural and sentinel hosts in the Amazon Valley. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 12, n. 1, 1964.

CHAAITHANYA, I. K.; MURUGANANDAM, N.; SURYA, P.; ANWESH, M.; ALAGARASU, K.; VIJAYACHARI, P. Association of Oligoadenylate Synthetase Gene Cluster and DC-SIGN (CD209) Gene Polymorphisms with Clinical Symptoms in Chikungunya Virus Infection. **DNA and cell biology**, v. 35, n. 1, p. 44–50, 2016.

CHEN, J. R.; JIAO, X. X.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Probe-label-free electrochemical aptasensor based on methylene blue-anchored graphene oxide amplification. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 6, p. 861, 2013.

CHERABUDDI, K.; IOVINE, N. M.; SHAH, K.; WHITE, S. K.; PAISIE, T.; SALEMI, M.; MORRIS JR, J. G.; LEDNICKY, J. A. Zika and Chikungunya virus co-infection in a traveller returning from Colombia, 2016: virus isolation and genetic analysis. **JMM case reports**, v. 3,

n. 6, 2016.

CLEMENTS, T. L.; ROSSI, C. A.; IRISH, A. K.; KIBUUKA, H.; ELLER, L. A.; ROBB, M. L.; KATAAHA, P.; MICHAEL, N. L.; HENSLEY, L. E.; SCHOEPP, R. J. Chikungunya and O'nyong-nyong Viruses in Uganda: Implications for Diagnostics. In: Open forum infectious diseases, 3, **Anais...**Oxford University Press US, 2019.

COELHO, F. C.; CODEÇO, C. T. Precision epidemiology of arboviral diseases. **Journal of Public Health and Emergency**, v. 3, p. 1, 2019.

COIMBRA, T. L. M.; SANTOS, C. L. S.; SUZUKI, A.; PETRELLA, S.; BISORDI, I.; NAGAMORI, A. H.; MARTI, A. T.; SANTOS, R. N.; FIALHO, D. M.; LAVIGNE, S. 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.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCRETON, G. R. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. **Current opinion in immunology**, v. 48, p. 1–6, 2017.

DA COSTA, V. G.; DE REZENDE FÉRES, V. C.; SAIVISH, M. V.; DE LIMA GIMAQUE, J. B.; MORELI, M. L. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 84–85, 2017.

DAI, T.; PU, Q.; GUO, Y.; ZUO, C.; BAI, S.; YANG, Y.; YIN, D.; LI, Y.; SHENG, S.; TAO, Y. Analogous modified DNA probe and immune competition method-based electrochemical biosensor for RNA modification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 114, p. 72–77, 2018.

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91–100, 2016.

DE FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BACCARIN, M.; JANEGITZ, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A disposable and inexpensive bismuth film minisensor for a voltammetric determination of diquat and paraquat pesticides in natural water samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 749–756, 2017.

DE THOISY, B.; GARDON, J.; SALAS, R. A.; MORVAN, J.; KAZANJI, M. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326, 2003.

DENTE, M. G.; RICCARDO, F.; NACCA, G.; RANGHIASCI, A.; ESCADAFAL, C.;

GAAYEB, L.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M. A.; MANUGUERRA, J.-C.; PICARD, M.; FERNÁNDEZ-PINERO, J. Strengthening Preparedness for Arbovirus Infections in Mediterranean and Black Sea Countries: A Conceptual Framework to Assess Integrated Surveillance in the Context of the One Health Strategy. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 3, p. 489, 2018.

DICULESCU, V. C.; CHIORCEA-PAQUIM, A.-M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Applications of a DNA-electrochemical biosensor. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 23–36, 2016.

DO NASCIMENTO, T. B. P.; DE ALMEIDA, E. L.; GRÜTZMANN, A.; ZAMBALDE, A. L.; DE SOUZA BERMEJO, P. H.; CAMPOS, A. C.; MARTINS, T. C. M. e-Participation in the Exploration of Innovations: Confronting Aedes aegypti and Microcephaly in Brazil. In: International Conference on Electronic Government and the Information Systems Perspective, **Anais...**Springer, 2019.

DONOHOU, P. D.; BARRANGOU, R.; MAY, A. P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-Cas systems. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 134–146, 2018.

DURBIN, R. M.; ALTSHULER, D. L.; DURBIN, R. M.; ABECASIS, G. R.; BENTLEY, D. R.; CHAKRAVARTI, A.; CLARK, A. G.; COLLINS, F. S.; DE LA VEGA, F. M.; DONNELLY, P.; EGHOLM, M.; FLICEK, P.; GABRIEL, S. B.; GIBBS, R. A.; KNOPPERS, B. M.; LANDER, E. S.; LEHRACH, H.; MARDIS, E. R.; MCVEAN, G. A.; NICKERSON, D. A.; PELTONEN, L.; SCHAFER, A. J.; SHERRY, S. T.; WANG, J.; WILSON, R. K.; GIBBS, R. A.; DEIROS, D.; METZKER, M.; MUZNY, D.; REID, J.; WHEELER, D.; WANG, J.; LI, J.; JIAN, M.; LI, G.; LI, R.; LIANG, H.; TIAN, G.; WANG, B.; WANG, J.; WANG, W.; YANG, H.; ZHANG, X.; ZHENG, H.; LANDER, E. S.; ALTSHULER, D. L.; AMBROGIO, L.; BLOOM, T.; CIBULSKIS, K.; FENNELL, T. J.; GABRIEL, S. B.; JAFFE, D. B.; SHEFLER, E.; SOUGNEZ, C. L.; BENTLEY, D. R.; GORMLEY, N.; HUMPHRAY, S.; KINGSBURY, Z.; KOKO-GONZALES, P.; STONE, J.; MCKERNAN, K. J.; COSTA, G. L.; ICHIKAWA, J. K.; LEE, C. C.; SUDBRAK, R.; LEHRACH, H.; BORODINA, T. A.; DAHL, A.; DAVYDOV, A. N.; MARQUARDT, P.; MERTES, F.; NIETFELD, W.; ROSENSTIEL, P.; SCHREIBER, S.; SOLDATOV, A. V.; TIMMERMAN, B.; TOLZMANN, M.; EGHOLM, M.; AFFOURTIT, J.; ASHWORTH, D.; ATTIYA, S.; BACHORSKI, M.; BUGLIONE, E.; BURKE, A.; CAPRIO, A.; CELONE,

C.; CLARK, S.; CONNERS, D.; DESANY, B.; GU, L.; GUCCIONE, L.; KAO, K.;
 KEBBEL, A.; KNOWLTON, J.; LABRECQUE, M.; MCDADE, L.; MEALMAKER, C.;
 MINDERMAN, M.; NAWROCKI, A.; NIAZI, F.; PAREJA, K.; RAMENANI, R.; RICHES,
 D.; SONG, W.; TURCOTTE, C.; WANG, S.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; DOOLING,
 D.; FULTON, L.; FULTON, R.; WEINSTOCK, G.; DURBIN, R. M.; BURTON, J.;
 CARTER, D. M.; CHURCHER, C.; COFFEY, A.; COX, A.; PALOTIE, A.; QUAIL, M.;
 SKELLY, T.; STALKER, J.; SWERDLOW, H. P.; TURNER, D.; DE WITTE, A.; GILES,
 S.; GIBBS, R. A.; WHEELER, D.; BAINBRIDGE, M.; CHALLIS, D.; SABO, A.; YU, F.;
 YU, J.; WANG, J.; FANG, X.; GUO, X.; LI, R.; LI, Y.; LUO, R.; TAI, S.; WU, H.; ZHENG,
 H.; ZHENG, X.; ZHOU, Y.; LI, G.; WANG, J.; YANG, H.; MARTH, G. T.; GARRISON, E.
 P.; HUANG, W.; INDAP, A.; KURAL, D.; LEE, W.-P.; FUNG LEONG, W.; QUINLAN, A.
 R.; STEWART, C.; STROMBERG, M. P.; WARD, A. N.; WU, J.; LEE, C.; MILLS, R. E.;
 SHI, X.; DALY, M. J.; DEPRISTO, M. A.; ALTSHULER, D. L.; BALL, A. D.; BANKS, E.;
 BLOOM, T.; BROWNING, B. L.; CIBULSKIS, K.; FENNELL, T. J.; GARIMELLA, K. V.;
 GROSSMAN, S. R.; HANDSAKER, R. E.; HANNA, M.; HARTL, C.; JAFFE, D. B.;
 KERNYTSKY, A. M.; KORN, J. M.; LI, H.; MAGUIRE, J. R.; MCCARROLL, S. A.;
 MCKENNA, A.; NEMESH, J. C.; PHILIPPAKIS, A. A.; POPLIN, R. E.; PRICE, A.;
 RIVAS, M. A.; SABETI, P. C.; SCHAFFNER, S. F.; SHEFLER, E.; SHLYAKHTER, I. A.;
 COOPER, D. N.; BALL, E. V.; MORT, M.; PHILLIPS, A. D.; STENSON, P. D.; SEBAT, J.;
 MAKAROV, V.; YE, K.; YOON, S. C.; BUSTAMANTE, C. D.; CLARK, A. G.; BOYKO,
 A.; DEGENHARDT, J.; GRAVEL, S.; GUTENKUNST, R. N.; KAGANOVICH, M.;
 KEINAN, A.; LACROUTE, P.; MA, X.; REYNOLDS, A.; CLARKE, L.; FLICEK, P.;
 CUNNINGHAM, F.; HERRERO, J.; KEENEN, S.; KULESHA, E.; LEINONEN, R.;
 MCLAREN, W. M.; RADHAKRISHNAN, R.; SMITH, R. E.; ZALUNIN, V.; ZHENG-
 BRADLEY, X.; KORBEL, J. O.; STÜTZ, A. M.; HUMPHRAY, S.; BAUER, M.; KEIRA
 CHEETHAM, R.; COX, T.; EBERLE, M.; JAMES, T.; KAHN, S.; MURRAY, L.;
 CHAKRAVARTI, A.; YE, K.; DE LA VEGA, F. M.; FU, Y.; HYLAND, F. C. L.;
 MANNING, J. M.; MCLAUGHLIN, S. F.; PECKHAM, H. E.; SAKARYA, O.; SUN, Y. A.;
 TSUNG, E. F.; BATZER, M. A.; KONKEL, M. K.; WALKER, J. A.; SUDBRAK, R.;
 ALBRECHT, M. W.; AMSTISLAVSKIY, V. S.; HERWIG, R.; PARKHOMCHUK, D. V.;
 SHERRY, S. T.; AGARWALA, R.; KHOURI, H. M.; MORGULIS, A. O.; PASCHALL, J.
 E.; PHAN, L. D.; ROTMISTROVSKY, K. E.; SANDERS, R. D.; SHUMWAY, M. F.;
 XIAO, C.; MCVEAN, G. A.; AUTON, A.; IQBAL, Z.; LUNTER, G.; MARCHINI, J. L.;
 MOUTSIANAS, L.; MYERS, S.; TUMIAN, A.; DESANY, B.; KNIGHT, J.; WINER, R.;

CRAIG, D. W.; BECKSTROM-STERMBERG, S. M.; CHRISTOFORIDES, A.;
 KURDOGLU, A. A.; PEARSON, J. V.; SINARI, S. A.; TEMBE, W. D.; HAUSSLER, D.;
 HINRICHS, A. S.; KATZMAN, S. J.; KERN, A.; KUHN, R. M.; PRZEWORSKI, M.;
 HERNANDEZ, R. D.; HOWIE, B.; KELLEY, J. L.; CORD MELTON, S.; ABECASIS, G.
 R.; LI, Y.; ANDERSON, P.; BLACKWELL, T.; CHEN, W.; COOKSON, W. O.; DING, J.;
 MIN KANG, H.; LATHROP, M.; LIANG, L.; MOFFATT, M. F.; SCHEET, P.; SIDORE, C.;
 SNYDER, M.; ZHAN, X.; ZÖLLNER, S.; AWADALLA, P.; CASALS, F.; IDAGHDOUR,
 Y.; KEEBLER, J.; STONE, E. A.; ZILVERSMIT, M.; JORDE, L.; XING, J.; EICHLER, E.
 E.; AKSAY, G.; ALKAN, C.; HAJIRASOULIHA, I.; HORMOZDIARI, F.; KIDD, J. M.;
 CENK SAHINALP, S.; SUDMANT, P. H.; MARDIS, E. R.; CHEN, K.; CHINWALLA, A.;
 DING, L.; KOBOLDT, D. C.; MCLELLAN, M. D.; DOOLING, D.; WEINSTOCK, G.;
 WALLIS, J. W.; WENDL, M. C.; ZHANG, Q.; DURBIN, R. M.; ALBERS, C. A.; AYUB,
 Q.; BALASUBRAMANIAM, S.; BARRETT, J. C.; CARTER, D. M.; CHEN, Y.; CONRAD,
 D. F.; DANECEK, P.; DERMITZAKIS, E. T.; HU, M.; HUANG, N.; HURLES, M. E.; JIN,
 H.; JOSTINS, L.; KEANE, T. M.; QUANG LE, S.; LINDSAY, S.; LONG, Q.;
 MACARTHUR, D. G.; MONTGOMERY, S. B.; PARTS, L.; STALKER, J.; TYLER-
 SMITH, C.; WALTER, K.; ZHANG, Y.; GERSTEIN, M. B.; SNYDER, M.; ABYZOV, A.;
 BALASUBRAMANIAN, S.; BJORNSEN, R.; DU, J.; GRUBERT, F.; HABEGGER, L.;
 HARAKSINGH, R.; JEE, J.; KHURANA, E.; LAM, H. Y. K.; LENG, J.; JASMINE MU, X.;
 URBAN, A. E.; ZHANG, Z.; LI, Y.; LUO, R.; MARTH, G. T.; GARRISON, E. P.; KURAL,
 D.; QUINLAN, A. R.; STEWART, C.; STROMBERG, M. P.; WARD, A. N.; WU, J.; LEE,
 C.; MILLS, R. E.; SHI, X.; MCCARROLL, S. A.; BANKS, E.; DEPRISTO, M. A.;
 HANDSAKER, R. E.; HARTL, C.; KORN, J. M.; LI, H.; NEMESH, J. C.; SEBAT, J.;
 MAKAROV, V.; YE, K.; YOON, S. C.; DEGENHARDT, J.; KAGANOVICH, M.;
 CLARKE, L.; SMITH, R. E.; ZHENG-BRADLEY, X.; KORBEL, J. O.; HUMPHRAY, S.;
 KEIRA CHEETHAM, R.; EBERLE, M.; KAHN, S.; MURRAY, L.; YE, K.; DE LA VEGA,
 F. M.; FU, Y.; PECKHAM, H. E.; SUN, Y. A.; BATZER, M. A.; KONKEL, M. K.;
 WALKER, J. A.; XIAO, C.; IQBAL, Z.; DESANY, B.; BLACKWELL, T.; SNYDER, M.;
 XING, J.; EICHLER, E. E.; AKSAY, G.; ALKAN, C.; HAJIRASOULIHA, I.;
 HORMOZDIARI, F.; KIDD, J. M.; CHEN, K.; CHINWALLA, A.; DING, L.; MCLELLAN,
 M. D.; WALLIS, J. W.; HURLES, M. E.; CONRAD, D. F.; WALTER, K.; ZHANG, Y.;
 GERSTEIN, M. B.; SNYDER, M.; ABYZOV, A.; DU, J.; GRUBERT, F.; HARAKSINGH,
 R.; JEE, J.; KHURANA, E.; LAM, H. Y. K.; LENG, J.; JASMINE MU, X.; URBAN, A. E.;
 ZHANG, Z.; GIBBS, R. A.; BAINBRIDGE, M.; CHALLIS, D.; COAFRA, C.; DINH, H.;

KOVAR, C.; LEE, S.; MUZNY, D.; NAZARETH, L.; REID, J.; SABO, A.; YU, F.; YU, J.; MARTH, G. T.; GARRISON, E. P.; INDAP, A.; FUNG LEONG, W.; QUINLAN, A. R.; STEWART, C.; WARD, A. N.; WU, J.; CIBULSKIS, K.; FENNELL, T. J.; GABRIEL, S. B.; GARIMELLA, K. V.; HARTL, C.; SHEFLER, E.; SOUGNEZ, C. L.; WILKINSON, J.; CLARK, A. G.; GRAVEL, S.; GRUBERT, F.; CLARKE, L.; FLICEK, P.; SMITH, R. E.; ZHENG-BRADLEY, X.; SHERRY, S. T.; KHOURI, H. M.; PASCHALL, J. E.; SHUMWAY, M. F.; XIAO, C.; MCVEAN, G. A.; KATZMAN, S. J.; ABECASIS, G. R.; BLACKWELL, T.; MARDIS, E. R.; DOOLING, D.; FULTON, L.; FULTON, R.; KOBOLDT, D. C.; DURBIN, R. M.; BALASUBRAMANIAM, S.; COFFEY, A.; KEANE, T. M.; MACARTHUR, D. G.; PALOTIE, A.; SCOTT, C.; STALKER, J.; TYLER-SMITH, C.; GERSTEIN, M. B.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHAKRAVARTI, A.; KNOPPERS, B. M.; ABECASIS, G. R.; BUSTAMANTE, C. D.; GHARANI, N.; GIBBS, R. A.; JORDE, L.; KAYE, J. S.; KENT, A.; LI, T.; MCGUIRE, A. L.; MCVEAN, G. A.; OSSORIO, P. N.; ROTIMI, C. N.; SU, Y.; TOJI, L. H.; TYLER-SMITH, C.; BROOKS, L. D.; FELSENFELD, A. L.; MCEWEN, J. E.; ABDALLAH, A.; JUENGER, C. R.; CLEMM, N. C.; COLLINS, F. S.; DUNCANSON, A.; GREEN, E. D.; GUYER, M. S.; PETERSON, J. L.; SCHAFER, A. J.; ABECASIS, G. R.; ALTSHULER, D. L.; AUTON, A.; BROOKS, L. D.; DURBIN, R. M.; GIBBS, R. A.; HURLES, M. E.; MCVEAN, G. A. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 28 out. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09534>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

DUTTA, S. K.; TRIPATHI, A. Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. **Virology**, v. 511, p. 207–213, 2017.

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. Chemically modified electrodes. In: **Handbook of Electrochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 295–327.

ENENGL, C.; ENENGL, S.; BOUGUERRA, N.; HAVLICEK, M.; NEUGEBAUER, H.; EGBE, D. A. M. Explaining the Cyclic Voltammetry of a Poly (1, 4-phenylene-ethynylene)-alt-poly (1, 4-phenylene-vinylene) Copolymer upon Oxidation by using Spectroscopic Techniques. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 1, p. 93–100, 2017.

ENSAFI, A. A. **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2019a.

ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2019b. p. 1–10.

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

ESTOFOLETE, C. F.; MOTA, M. T. O.; VEDOVELLO, D.; GÓNGORA, D. V. N. de; MAIA, I. L.; NOGUEIRA, M. L. Mayaro fever in an HIV-infected patient suspected of having chikungunya fever. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 648–652, 2016.

FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTI, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, p. 149–155, 2019.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FERREIRA, D. S. C. Desenvolvimento de genossensores para o diagnóstico do Papilomavírus Humano (HPV). 2014.

FERREIRA, J. M.; CAMPOS-FERREIRA, D. S.; DE SOUSA FIGUEIREDO, E. V. M.; DE LIMA FILHO, J. L. Mayaro fever: A brief review on the immune profile. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 10, n. 3, p. 95, 2020a.

FERREIRA, J.; SANTOS, L. D.; OLIVEIRA, S.; SANTOS, B. R.; SANTOS, A. C.; DE MOURA, E.; DE SOUZA FIGUEIREDO, E. V.; LIMA FILHO, J. Chikungunya virus infection outcome: a systematic review of host genetics. **Immunological Investigations**, 2020b.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 32, n. 2, p. 154–158, 1999.

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. Serious disease outbreaks caused by viruses transmitted by *Aedes aegypti* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 265–266, 2016.

FIGUEIREDO, M. L. G. de; 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.

FILIK, H.; AVAN, A. A. Nanostructures for nonlabeled and labeled electrochemical immunosensors: Simultaneous electrochemical detection of cancer markers: A review. **Talanta**, p. 120153, 2019.

FORSHEY, B. M.; GUEVARA, C.; LAGUNA-TORRES, V. A.; CESPEDES, M.; VARGAS, J.; GIANELLA, A.; VALLEJO, E.; MADRID, C.; AGUAYO, N.; GOTUZZO, E. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.

FRAGKLOUDIS, R.; DIXON-BALLANY, C. M.; ZAGRAJEK, A. K.; KEDZIERSKI, L.; FAZAKERLEY, J. K. Following acute encephalitis, Semliki Forest virus is undetectable in the brain by infectivity assays but functional virus RNA capable of generating infectious virus persists for life. **Viruses**, v. 10, n. 5, p. 273, 2018.

FREITAS, M. S.; DA POIAN, A. T.; BARTH, O. M.; REBELLO, M. A.; SILVA, J. L.; GASPAR, L. P. The fusogenic state of Mayaro virus induced by low pH and by hydrostatic pressure. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 325–335, 2006.

FRIEDRICH-JÄNICKE, B.; EMMERICH, P.; TAPPE, D.; GÜNTHER, S.; CADAR, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J. Genome analysis of Mayaro virus imported to Germany from French Guiana. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1255, 2014.

GALÁN-HUERTA, K. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A.; RAMOS-JIMÉNEZ, J. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GALINDO, P.; SRIHONGSE, S. Transmission of arboviruses to hamsters by the bite of naturally infected Culex (Melanoconion) mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 16, n. 4, p. 525–530, 1967.

GALINDO, P.; SRIHONGSE, S.; DE RODANICHE, E.; GRAYSON, M. A. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959–1962. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 15, n. 3, p. 385–400, 1966.

GONÇALVES, A. M.; PEDRO, A. Q.; SANTOS, F. M.; MARTINS, L. M.; MAIA, C. J.; QUEIROZ, J. A.; PASSARINHA, L. A. Trends in protein-based biosensor assemblies for drug screening and pharmaceutical kinetic studies. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12461–12485, 2014.

GROOT, H.; MORALES, A.; VIDALES, H. Virus isolations from forest mosquitoes in San Vicente de Chucuri, Colombia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 10, n. 3, p. 397–402, 1961.

GROSSI-SOYSTER, E. N.; COOK, E. A. J.; DE GLANVILLE, W. A.; THOMAS, L. F.; KRYSTOSIK, A. R.; LEE, J.; WAMAE, C. N.; KARIUKI, S.; FÈVRE, E. M.; LABEAUD, A. D. Serological and spatial analysis of alphavirus and flavivirus prevalence and risk factors in a rural community in western Kenya. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 10, p. e0005998, 2017.

GUERRA, A. C. S. **Biossensor como proposta alternativa para o ensino de eletroquímica** Brasil, , 2018. .

HALLENGÄRD, D.; KAKOULIDOU, M.; LULLA, A.; KÜMMERER, B. M.; JOHANSSON, D. X.; MUTSO, M.; LULLA, V.; FAZAKERLEY, J. K.; ROQUES, P.; LE GRAND, R. Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. **Journal of virology**, v. 88, n. 5, p. 2858–2866, 2014.

HALSEY, E. S.; SILES, C.; GUEVARA, C.; VILCARROMERO, S.; JHONSTON, E. J.; RAMAL, C.; AGUILAR, P. V.; AMPUERO, J. S. Mayaro virus infection, Amazon basin region, Peru, 2010–2013. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839, 2013.

HASSAN, M. E.; TAMER, T. M.; OMER, A. M. Methods of enzyme immobilization. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. 6, p. 385–392, 2016.

HASSING, R.-J.; LEPARC-GOFFART, I.; BLANK, S. N.; THEVARAYAN, S.; TOLOU, H.; VAN DOORNUM, G.; VAN GENDEREN, P. J. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **Journal of Infection**, v. 61, n. 4, p. 343–345, 2010.

HER, Z.; TENG, T.-S.; TAN, J. J. L.; TEO, T.-H.; KAM, Y.-W.; LUM, F.-M.; LEE, W. W. L.; GABRIEL, C.; MELCHIOTTI, R.; ANDIAPPAN, A. K.; LULLA, V.; LULLA, A.; WIN,

M. K.; CHOW, A.; BISWAS, S. K.; LEO, Y.-S.; LECUIT, M.; MERITS, A.; RÉNIA, L.; NG, L. F. P. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 1, p. 24–41, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452586>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

HERAUD, J.-M.; HOMMEL, D.; HULIN, A.; DEUBEL, V.; POVEDA, J. D.; SARTHOU, J. L.; TALARMIN, A. First case of yellow fever in French Guiana since 1902. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 429, 1999.

HOCH, A. L.; PETERSON, N. E.; LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 3, p. 689–698, 1981.

HORTION, J.; MUTUKU, F. M.; EYHERABIDE, A. L.; VU, D. M.; BOOTHROYD, D. B.; GROSSI-SOYSTER, E. N.; KING, C. H.; NDENGA, B. A.; LABEAUD, A. D. Acute Flavivirus and Alphavirus Infections among Children in Two Different Areas of Kenya, 2015. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 1, p. 170–173, 2019.

HU, R.; WEN, W.; WANG, Q.; XIONG, H.; ZHANG, X.; GU, H.; WANG, S. Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1. **Biosensors & bioelectronics**, v. 53, p. 384–9, mar. 2014.

IZURIETA, R. O.; MACALUSO, M.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; GUERRA, B.; CRUZ, L. M.; GALWANKAR, S.; VERMUND, S. H. Hunting in the rainforest and Mayaro virus infection: an emerging alphavirus in Ecuador. **Journal of global infectious diseases**, v. 3, n. 4, p. 317, 2011.

JARA-PALACIOS, M. J.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; HEREDIA, F. J.; HERNANZ, D. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, p. 211–215, 2017.

JUNT, T.; HERAUD, J.-M.; LELARGE, J.; LABEAU, B.; TALARMIN, A. Determination of natural versus laboratory human infection with Mayaro virus by molecular analysis. **Epidemiology & Infection**, v. 123, n. 3, p. 511–513, 1999.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, American Society of Tropical Medicine and Hygiene. **San Antonio, TX [PubMed]**, 1985.

KARWOWSKI, M. P.; NELSON, J. M.; STAPLES, J. E.; FISCHER, M.; FLEMING-DUTRA, K. E.; VILLANUEVA, J.; POWERS, A. M.; MEAD, P.; HONEIN, M. A.; MOORE, C. A. Zika virus disease: a CDC update for pediatric health care providers. **Pediatrics**, v. 137, n. 5, p. e20160621, 2016.

KHALIL, H. A.; EL-YAZBI, A. F.; HAMDY, D. A.; BELAL, T. S. Application of HPTLC, spectrofluorimetry and differential pulse voltammetry for determination of the antifungal drug posaconazole in suspension dosage form. In: *Annales pharmaceutiques francaises*, 5, **Anais...Elsevier**, 2019.

KHEZRIAN, S.; SALIMI, A.; TEYMOURIAN, H.; HALLAJ, R. Label-free electrochemical IgE aptasensor based on covalent attachment of aptamer onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid/chitosan nanocomposite modified electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 43, p. 218–25, maio 2013.

KONONCHIK, J. P.; HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T. An alternative pathway for alphavirus entry. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 304, 2011.

LAU, C.; AUBRY, M.; MUSSO, D.; TEISSIER, A.; PAULOUS, S.; DESPRÈS, P.; DE-LAMBALLERIE, X.; PASTORINO, B.; CAO-LORMEAU, V.-M.; WEINSTEIN, P. New evidence for endemic circulation of Ross River virus in the Pacific Islands and the potential for emergence. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 73–76, 2017.

LAVERGNE, A.; DE THOISY, B.; LACOSTE, V.; PASCALIS, H.; POULIQUEN, J.-F.; MERCIER, V.; TOLOU, H.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; TALARMIN, A. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus research**, v. 117, n. 2, p. 283–290, 2006.

LAZEAR, H. M.; STRINGER, E. M.; DE SILVA, A. M. The emerging Zika virus epidemic in the Americas: Research priorities. **Jama**, v. 315, n. 18, p. 1945–1946, 2016.

LEDNICKY, J.; DE ROCHARS, V. M. B.; ELBADRY, M.; LOEB, J.; TELISMA, T.; CHAVANNES, S.; ANILIS, G.; CELLA, E.; CICCOCCHI, M.; OKECH, B. Mayaro virus in

child with acute febrile illness, Haiti, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 11, p. 2000, 2016.

LEITE FILHO, V. F. Eletropolimerização e caracterização de polianilina com incorporação de nanopartículas de TiO₂ a diferentes pHs. 2015.

LESCAR, J.; ROUSSEL, A.; WIEN, M. W.; NAVAZA, J.; FULLER, S. D.; WENGLER, G.; WENGLER, G.; REY, F. A. The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 137–148, 2001.

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.

LIÉVANO, H. G. Estudios sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 41, n. Suplemento, p. 12–33, 2017.

LLAGONNE-BARETS, M.; ICARD, V.; LEPARC-GOFFART, I.; PRAT, C.; PERPOINT, T.; ANDRÉ, P.; RAMIÈRE, C. A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. **Journal of Clinical Virology**, v. 77, p. 66–68, 2016.

LONG, K. C.; ZIEGLER, S. A.; THANGAMANI, S.; HAUSSER, N. L.; KOCHER, T. J.; HIGGS, S.; TESH, R. B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 4, 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.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.-B. Lessons learned on Zika virus vectors. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005511, 2017.

LUBECKYJ, R. A.; WINKLER-MOSER, J. K.; FHANER, M. J. Application of differential pulse voltammetry to determine the efficiency of stripping tocopherols from commercial fish oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 4, p. 527–536, 2017.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and infection**, v. 18, n. 12, p. 724–734, 2016.

MALHOTRA, S.; VERMA, A.; TYAGI, N.; KUMAR, V. Biosensors: principle, types and applications. **Int. J. Adv. Res. Innov. Ideas Educ**, v. 3, n. 2, p. 3639–3644, 2017.

MARCONDES, C. B.; CONTIGIANI, M.; GLEISER, R. M. Emergent and Reemergent Arboviruses in South America and the Caribbean: Why So Many and Why Now? **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 3, p. 509–532, 2017.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. de F. F. de. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2016.

MARTIN, C. da S. Estudo e caracterização da eletropolimerização de moléculas nanoestruturadas a Base de Schiff. 2013.

MAVIAN, C.; RIFE, B. D.; DOLLAR, J. J.; CELLA, E.; CICCOCCHI, M.; PROSPERI, M. C. F.; LEDNICKY, J.; MORRIS, J. G.; CAPUA, I.; SALEMI, M. Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8718, 2017.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

MELEKIS, E.; TSIKA, A. C.; LICHIERE, J.; CHASAPIS, C. T.; MARGIOLAKI, I.; PAPAGEORGIOU, N.; COUTARD, B.; BENTROP, D.; SPYROULIAS, G. A. NMR study of non-structural proteins—part I: ¹H, ¹³C, ¹⁵N backbone and side-chain resonance assignment of macro domain from Mayaro virus (MAYV). **Biomolecular NMR assignments**, v. 9, n. 1, p. 191–195, 2015.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; WINT, G. R. W.; RAY, S. E.; PIGOTT, D. M.; SHEARER, F. M.; JOHNSON, K.; EARL, L. The current and future global distribution and population at risk of dengue. **Nature microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1508–1515, 2019.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Eastern Equine Encephalitis Virus—Another Emergent Arbovirus in the United States. **New England Journal of Medicine**, v.

381, n. 21, p. 1989–1992, 2019.

MOTA, M. T. de O.; RIBEIRO, M. R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M. L. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015a.

MOTA, M. T. O.; VEDOVELLO, D.; ESTOFOLETE, C.; MALOSSI, C. D.; ARAÚJO, J. P.; NOGUEIRA, M. L. 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, 2015b.

MOURÃO, M. P. G.; BASTOS, M. de S.; DE FIGUEIREDO, R. P.; GIMAQUE, J. B. L.; DOS SANTOS GALUSSO, E.; KRAMER, V. M.; DE OLIVEIRA, C. M. C.; NAVECA, F. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–46, 2012.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, n. 2, p. 288–302, 2012.

MURUGAN, S. B.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 10, p. 933–937, 2016.

NAPOLEÃO-PEGO, P.; GOMES, L.; PROVANCE-JR, D.; DE-SIMONE, S. Mayaro virus disease. **J Hum Virol Retrovirol**, v. 1, n. 3, p. 18, 2014.

NASCIMENTO, G. A.; SOUZA, E. V. M.; CAMPOS-FERREIRA, D. S.; ARRUDA, M. S.; CASTELLETTI, C. H. M.; WANDERLEY, M. S. O.; EKERT, M. H. F.; BRUNESKA, D.; LIMA-FILHO, J. L. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 61–66, 2012.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por“ silk-screen”. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

NAVECA, F. G.; NASCIMENTO, V. A. do; SOUZA, V. C. de; NUNES, B. T. D.; RODRIGUES, D. S. G.; VASCONCELOS, P. F. da C. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510–513,

2017.

NEUMAYR, A.; GABRIEL, M.; FRITZ, J.; GÜNTHER, S.; HATZ, C.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; BLUM, J. Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 695, 2012.

NUNES, A. P.; TOMAS, W. M. Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: caracterização e conservação. **Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E)**, 2004.

OLIVEIRA, B. G. O estado da arte da ligação de Hidrogênio. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1313–1322, 2015.

OLIVEIRA, N.; SOUZA, E.; FERREIRA, D.; ZANFORLIN, D.; BEZERRA, W.; BORBA, M. A.; ARRUDA, M.; LOPES, K.; NASCIMENTO, G.; MARTINS, D. A sensitive and selective label-free electrochemical DNA biosensor for the detection of specific dengue virus serotype 3 sequences. **Sensors**, v. 15, n. 7, p. 15562–15577, 2015.

PALCHETTI, I.; BETTAZZI, F.; BAUSSANT, T. Electrochemical Hybridization-Based Biosensor in Environmental Monitoring. In: **Nanotechnology and Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 353–374.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **PAHO WHO | Chikungunya | 2015**. Disponível em:

<https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=7929&Itemid=40931&lang=en>. Acesso em: 16 jan. 2019.

PANIZ-MONDOLFI, A. E.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; BLOHM, G.; MARQUEZ, M.; VILLAMIL-GOMEZ, W. E. **ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics** BioMed Central, , 2016. .

PANJAN, P.; VIRTANEN, V.; SESAY, A. M. Determination of stability characteristics for electrochemical biosensors via thermally accelerated ageing. **Talanta**, v. 170, p. 331–336, 2017.

PATÍÑO-BARBOSA, A. M.; BEDOYA-ARIAS, J. E.; CARDONA-OSPINA, J. A.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Bibliometric assessment of the scientific production of literature regarding Mayaro. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 4, p. 532–534,

2016.

PAULES, C. I.; FAUCI, A. S. Yellow fever—once again on the radar screen in the Americas. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 15, p. 1397–1399, 2017.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; JULIANO, R. S.; CAMPOS, Z.; VELEZ, J.; NOGUEIRA, R. M. R.; KOMAR, N. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125–133, 2015.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; TAVARES, F. N.; COSTA, E. V. da; BURLANDY, F. M.; MURTA, M.; PELLEGRIN, A. O.; NOGUEIRA, M. F.; SILVA, E. E. da. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 829–833, 2010.

PEZZI, L.; REUSKEN, C. B.; WEAVER, S. C.; DREXLER, J. F.; BUSCH, M.; LABEAUD, A. D.; DIAMOND, M. S.; VASILAKIS, N.; DREBOT, M. A.; SIQUEIRA, A. M. GloPID-R report on Chikungunya, O'nyong-nyong and Mayaro virus, part I: Biological diagnostics. **Antiviral research**, 2019.

PIETILÄ, M. K.; HELLSTRÖM, K.; AHOLA, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. **Virus research**, v. 234, p. 44–57, 2017.

PINHEIRO, F. de P.; ROSA, A.; FREITAS, R. B.; ROSA, J. F. S.; VASCONCELOS, P. F. C. aspectos clínico-epidemiológicos. In: **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. [s.l.: s.n.]p. 375–408.

PINHEIRO, F. P.; LEDUC, J. W. Mayaro virus disease. **The arboviruses: epidemiology and ecology**, v. 3, p. 137–150, 1988.

POVEDANO, E.; CINCOTTO, F. H.; PARRADO, C.; DÍEZ, P.; SÁNCHEZ, A.; CANEVARI, T. C.; MACHADO, S. A. S.; PINGARRÓN, J. M.; VILLALONGA, R. Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 β -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 343–351, 2017.

POWERS, A. M.; AGUILAR, P. V.; CHANDLER, L. J.; BRAULT, A. C.; MEAKINS, T. A.;

- WATTS, D.; RUSSELL, K. L.; OLSON, J.; VASCONCELOS, P. F. C.; DA ROSA, A. T. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461–469, 2006.
- PRAT, C. M.; FLUSIN, O.; PANELLA, A.; TENEBRAY, B.; LANCIOTTI, R.; LEPARC-GOFFART, I. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 12, p. 2129, 2014.
- PUCCIONI-SOHLER, M.; ROVERONI, N.; ROSADAS, C.; FERRY, F.; PERALTA, J. M.; TANURI, A. Dengue infection in the nervous system: lessons learned for Zika and Chikungunya. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 75, n. 2, p. 123–126, 2017.
- RAFIEE-POUR, H.-A.; BEHPOUR, M.; KESHAVARZ, M. A novel label-free electrochemical miRNA biosensor using methylene blue as redox indicator: application to breast cancer biomarker miRNA-21. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 202–207, 2016.
- RAMACHANDRAN, M.; YU, D.; DYCZYNSKI, M.; BASKARAN, S.; ZHANG, L.; LULLA, A.; LULLA, V.; SAUL, S.; NELANDER, S.; DIMBERG, A. Safe and effective treatment of experimental neuroblastoma and glioblastoma using systemically delivered triple microRNA-detargeted oncolytic Semliki Forest virus. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 6, p. 1519–1530, 2017.
- RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 4, p. 981–1000, 2017.
- RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and bio-sensing research**, v. 16, p. 19–31, 2017.
- RECEVEUR, M. C.; GRANDADAM, M.; PISTONE, T.; MALVY, D. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 18, p. 19563, 2010.
- REZZA, G.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. **Pathogens and global health**, v. 111, n. 6, p. 271–275, 2017.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 2018.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; PANIZ-MONDOLFI, A. E.; VILLAMIL-GÓMEZ, W. E.; NAVARRO, J. C. Mayaro, Oropouche and Venezuelan Equine Encephalitis viruses: following in the footsteps of Zika? **Travel medicine and infectious disease**, v. 15, p. 72–73, 2017.

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? **Trends in parasitology**, 2018.

SAIDUR, M. R.; AZIZ, A. R. A.; BASIRUN, W. J. Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 125–139, 2017.

SANI, M.; DIYANA, N.; ARIFFIN, E. Y.; SHERYN, W.; SHAMSUDDIN, M. A.; HENG, L. Y.; LATIP, J.; HASBULLAH, S. A.; HASSAN, N. I. An Electrochemical DNA Biosensor for Carcinogenicity of Anticancer Compounds Based on Competition between Methylene Blue and Oligonucleotides. **Sensors**, v. 19, n. 23, p. 5111, 2019.

SANTIAGO, F. W.; HALSEY, E. S.; SILES, C.; VILCARROMERO, S.; GUEVARA, C.; SILVAS, J. A.; RAMAL, C.; AMPUERO, J. S.; AGUILAR, P. V. Long-term arthralgia after Mayaro virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004104, 2015.

SCHAEFFER, M.; GAJDUSEK, D. C.; LEMA, A. B.; EICHENWALD, H. Epidemic jungle fevers among Okinawan colonists in the Bolivian rain forest. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 8, n. 3, p. 372–396, 1959.

SERRA, O. P.; CARDOSO, B. F.; RIBEIRO, A. L. M.; SANTOS, F. A. L. dos; SLHESSARENKO, R. D. 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.

SEYMOUR, C.; PERALTA, P. H.; MONTGOMERY, G. G. Serologic evidence of natural togavirus infections in Panamanian sloths and other vertebrates. **The American journal of**

tropical medicine and hygiene, v. 32, n. 4, p. 854–861, 1983.

SHI, A.; WANG, J.; HAN, X.; FANG, X.; ZHANG, Y. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 200, p. 206–212, set. 2014.

SIGFRID, L.; REUSKEN, C.; ECKERLE, I.; NUSSENBLATT, V.; LIPWORTH, S.; MESSINA, J.; KRAEMER, M.; ERGONUL, O.; PAPA, A.; KOOPMANS, M. Preparing clinicians for (re-) emerging arbovirus infectious diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 229–239, 2018.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 127–133, 2016.

SLAVOV, S. N.; OTAGUIRI, K. K.; BIANQUINI, M. L.; BITENCOURT, H. T. O.; CHAGAS, M. C. M.; DE SOUSA GUERREIRO, D. S.; FIGUEIREDO, L. T. M.; COVAS, D. T.; KASHIMA, S. Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2018.

SLEGERS, C. A. D.; KEUTER, M.; GÜNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; VAN DER VEN, A. J.; DE MAST, Q. 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.

SMART, A.; CREW, A.; PEMBERTON, R.; HUGHES, G.; DORAN, O.; HART, J. P. Screen-Printed Carbon Based Biosensors and their Applications in Agri-Food Safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 115898, 2020.

SMITH, D. W. Arboviruses. **Microbiology Australia**, v. 39, n. 2, p. 65, 2018.

SMITH, G. C.; FRANCY, D. B. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 1, p. 89–93, 1991.

SOUSA, I. P.; CARVALHO, C. A. M.; FERREIRA, D. F.; WEISSMÜLLER, G.; ROCHA, G. M.; SILVA, J. L.; GOMES, A. M. O. Envelope lipid-packing as a critical factor for the biological activity and stability of alphavirus particles isolated from mammalian and mosquito

cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 3, p. 1730–1736, 2011.

SOUZA, E.; NASCIMENTO, G.; SANTANA, N.; FERREIRA, D.; LIMA, M.; NATIVIDADE, E.; MARTINS, D.; LIMA-FILHO, J. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 5616–5629, 2011.

STEWART-IBARRA, A. M.; RYAN, S. J.; KENNESON, A.; KING, C. A.; ABBOTT, M.; BARBACHANO-GUERRERO, A.; BELTRÁN-AYALA, E.; BORBOR-CORDOVA, M. J.; CÁRDENAS, W. B.; CUEVA, C. The Burden of Dengue Fever and Chikungunya in Southern Coastal Ecuador: Epidemiology, Clinical Presentation, and Phylogenetics from the First Two Years of a Prospective Study. 2018.

STORM, N.; WEYER, J.; MARKOTTER, W.; KEMP, A.; LEMAN, P. A.; DERMAUX-MSIMANG, V.; NEL, L. H.; PAWESKA, J. T. Human cases of Sindbis fever in South Africa, 2006–2010. **Epidemiology & Infection**, v. 142, n. 2, p. 234–238, 2014.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012.

SUWANMANEE, S.; SURASOMBATPATTANA, P.; SOONTHORNWORASIRI, N.; HAMEL, R.; MANEEKAN, P.; MISSÉ, D.; LUPLERTLOP, N. Monitoring arbovirus in Thailand: surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. **Acta tropica**, v. 188, p. 244–250, 2018.

TALARMIN, A.; CHANDLER, L. J.; KAZANJI, M.; DE THOISY, B.; DEBON, P.; LELARGE, J.; LABEAU, B.; BOURREAU, E.; VIÉ, J. C.; SHOPE, R. E. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 3, p. 452–456, 1998.

TAPPE, D.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; JUST-NÜBLING, G.; SCHUSTER, G.; GÓMEZ-MEDINA, S.; GÜNTHER, S.; MUÑOZ-FONTELA, C.; SCHMIDT-CHANASIT, J. Sustained elevated cytokine levels during recovery phase of Mayaro virus infection. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 4, p. 750, 2016.

TAVARES-NETO, J.; FREITAS CARVALHO, J.; NUNES, M. R. T.; ROCHA, G.; RODRIGUES, S. G.; DAMASCENO, E.; DARUB, R.; VIANA, S.; VASCONCELOS, P. F.

da C. Pesquisa de anticorpos contra arbovírus e o vírus vacinal da febre amarela em uma amostra da população de Rio Branco, antes e três meses após a vacina 17D. 2004.

TAYLOR, S. F.; PATEL, P. R.; HEROLD, T. J. S. Recurrent arthralgias in a patient with previous Mayaro fever infection. **Southern medical journal**, v. 98, n. 4, p. 484–486, 2005.

TERZIAN, A. C. B.; AUGUSTE, A. J.; VEDOVELLO, D.; FERREIRA, M. U.; DA SILVA-NUNES, M.; SPERANÇA, M. A.; SUZUKI, R. B.; JUNCANSEN, C.; ARAÚJO JR, J. P.; WEAVER, S. C. Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 2, p. 401–404, 2015.

TESH, R. B. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. **Annual review of medicine**, v. 33, n. 1, p. 31–40, 1982.

TESH, R. B.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.; DAMODARAN, C.; CALAMPA, C.; CABEZAS, C.; RAMIREZ, G.; VASQUEZ, B.; HAYES, C. G.; ROSSI, C. A. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical infectious diseases**, v. 28, n. 1, p. 67–73, 1999.

THEILACKER, C.; HELD, J.; ALLERING, L.; EMMERICH, P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; KERN, W. V; PANNING, M. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 369, 2013.

THEISEN, M.; LIAO, J. C. Industrial biotechnology: Escherichia coli as a host. **Industrial Biotechnology: Microorganisms**, v. 1, p. 149–181, 2017.

TIĞ, G. A. Highly sensitive amperometric biosensor for determination of NADH and ethanol based on Au-Ag nanoparticles/poly (L-cysteine)/reduced graphene oxide nanocomposite. **Talanta**, v. 175, p. 382–389, 2017.

TORRES, J. R.; RUSSELL, K. L.; VASQUEZ, C.; TESH, R. B.; SALAS, R.; WATTS, D. M. Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 1304, 2004.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; RODRIGUES, S. G.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; DÉGALLIER, N.; DA ROSA, T.; JORGE, F. S. Inadequate

management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S155–S164, 2001.

VIEIRA, C. J. da S. P.; DA SILVA, D. J. F.; BARRETO, E. S.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; OZANIC, K.; SCHMIDT, D. J.; DRUMOND, B. P.; MONDINI, A.; NOGUEIRA, M. L. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta tropica**, v. 147, p. 12–16, 2015.

WAGGONER, J. J.; ROJAS, A.; MOHAMED-HADLEY, A.; DE GUILLÉN, Y. A.; PINSKY, B. A. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, p. 1–4, 2018.

WANG, L.; XIONG, Q.; XIAO, F.; DUAN, H. 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 136–151, 2017.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010.

WHO. ARBOVIRUSES AND HUMAN DISEASE. 1966. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40664/WHO_TRS_369.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 11 ago. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quantitative risk assessment of the effects of climate change on selected causes of death, 2030s and 2050s**. [s.l.] World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chikungunya**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

XIA, H.; TANG, H.; ZHOU, B.; LI, Y.; ZHANG, X.; SHI, Z.; DENG, L.; SONG, R.; LI, L.; ZHANG, Z. Mediator-free electron-transfer on patternable hierarchical meso/macro porous bienzyme interface for highly-sensitive sweat glucose and surface electromyography monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, p. 127962, 2020.

YAMANAKA, K.; VESTERGAARD, M. C.; TAMIYA, E. Printable electrochemical biosensors: a focus on screen-printed electrodes and their application. **Sensors**, v. 16, n. 10, p.

1761, 2016.

YANG, X.; QIAN, J.; JIANG, L.; YAN, Y.; WANG, K.; LIU, Q.; WANG, K. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on two-level cascaded signal amplification strategy. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 96, p. 7–13, abr. 2014.

YASRI, S.; WIWANITKIT, V. **New human pathogenic dengue like virus infections (Zika, Alkhumraand Mayaro viruses): A short review**Elsevier, , 2015. .

YEUNG, M. W.; TOMLINSON, G.; LOEB, M.; SANDER, B. Health-related quality of life in persons with West Nile virus infection: a longitudinal cohort study. **Health and quality of life outcomes**, v. 15, n. 1, p. 210, 2017.

YI, Y.; WEINBERG, G.; PRENZEL, M.; GREINER, M.; HEUMANN, S.; BECKER, S.; SCHLÖGL, R. Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode. **Catalysis Today**, v. 295, p. 32–40, 2017.

ZARA, A. L. de S. A.; SANTOS, S. M. dos; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do Aedes aegypti: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391–404, 2016.

ZUCHI, N.; HEINEN, L. B. da S.; SANTOS, M. A. M. dos; PEREIRA, F. C.; SLHESSARENKO, R. D. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820–823, 2014.

APÊNDICE A: ARTIGO PUBLICADO

Publicado na Revista: Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.

Fator de Impacto: 1.587





Review Article

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.apjtb.org

doi: 10.4103/2221-1691.276315

Impact Factor: 1.59

Mayaro fever: A brief review on the immune profile

Jean Moisés Ferreira¹, Danielly Santos Campos-Ferreira¹, Elaine Virgínia Martins de Sousa Figueiredo², José Luiz de Lima Filho¹¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil²Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica – LABMEG, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus Arapiraca, 57300-970, Arapiraca, Alagoas, Brazil

ABSTRACT

Mayaro virus is an emergent alphavirus that infects humans, leading to Mayaro fever. Approximately fifty percent of infected patients develop arthritis symptoms in the recovery phase, a phase that can last up to a year. The literature about Mayaro virus infection and its immune response is scarce, which may hamper the development of treatment strategies. We summarize changes in cytokines and chemokines in the acute and recovery phase in Mayaro virus infected patients, and relate this molecular characterization with the immune response. VEGF and IL-12/p70 show pronounced changes in patients in the acute phase, suggesting the development of cellular immunity and Th1 response. IL-6, IL-7, CXCL8/IL-8, IL-13, IL-17, and IFN- γ are elevated in patients with arthritis symptoms in the long-term recovery phase, which may be related to the continuous inflammatory process, a possible Th2 inhibiting and promoting Th17 process. Although few studies discuss the issue, with a small number of patients and different backgrounds, inflammatory and immune response and manifestations seem to be closely linked. This information may help to develop the appropriate treatment strategies in Mayaro virus infection. Therefore, we analyzed and summarized data available in literature.

KEYWORDS: Emergent virus; Mayaro virus; Cytokines; Chemokine; Molecular characterization

1. Introduction

Mayaro virus (MAYV) is an arbovirus that belongs to the *Alphavirus* genus and *Togaviridae* family. It occurs in the peri-Amazonian region and is considered as a potential emergent virus[1–3]. MAYV infects humans through the bite of mosquitoes, which induces Mayaro fever disease and can lead to hemorrhagic

phenomena and persistent incapacitating arthritis[4–7].

The main clinical manifestation of Mayaro fever is incapacitating arthritis, which can be manifested in the long-term recovery phase as a chronic form, occurring in up to 50% of patients and persisting for at least one year[8–10]. Because of the scarce literature about MAYV, the specific mechanisms involved in infection, pathogenesis and chronic manifestations are not clear[11,12], hampering the development of therapeutic strategies of chronic arthritis caused by this virus[13].

Analysis of patients with Mayaro fever revealed that chronic arthritis in the long-term recovery phase occurs independently of the immune response mediated by anti-MAYV neutralizing antibodies[9], excluding the adaptive immunity participation in this process and indicating the major participation of innate immunity response. Following being established for alphaviruses infections, the persistence of the symptoms of chronic arthritis may be related to the maintenance of the virus or their products in target cells, with subsequent accumulation of immune-inflammatory mediators such as cytokine interleukin 6 (IL-6) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)[14].

Cytokine and chemokine characterizations of MAYV infection can be an important tool to develop the adequate treatment and the therapeutic practices against the Mayaro fever disease[13], similar

[✉]To whom correspondence may be addressed. E-mail: jean.moises@hotmail.com

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

©2020 Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Produced by Wolters Kluwer-Medknow. All rights reserved.

How to cite this article: Ferreira JM, Campos-Ferreira DS, Figueiredo EVMD, Lima Filho JLD. Mayaro fever: A brief review on the immune profile. Asian Pac J Trop Biomed 2020; 10(3): 95-100.

Article history: Received 26 September 2019; Revision 15 November 2019; Accepted 15 January 2020; Available online 7 February 2020

APÊNDICE B: ARTIGO EM COLABORAÇÃO 1

Publicado na Revista: Immunological Investigations.

Fator de Impacto: 2.687





Chikungunya Virus Infection Outcome: A Systematic Review of Host Genetics

Jean Moisés Ferreira^a, Leandro Douglas Silva Santos^b, Susana Paiva Oliveira^b, Bárbara Rayssa Correia dos Santos^b, Ana Caroline Melo dos Santos^b, Edilson Leite de Moura^b, Elaine Virginia Martins de Souza^b, and José Luiz de Lima Filho^a

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil; ^bLaboratório de Biologia Molecular E Expressão Gênica - LABMEG, Universidade Federal de Alagoas (UFAL) – Campus Arapiraca, Arapiraca, Alagoas, Brazil

ABSTRACT

Background: Chikungunya virus (CHIKV) is a global concern, inducing chikungunya fever and triggering an arthritogenic chronic phase beyond some severe forms. Outcomes of CHIKV infections in humans are dependent on genetic variations. Here, a systematic review was performed to show evidence of genetic variations on infection outcomes of patients.

Methods: Searches were performed in Scopus, SciELO, MEDLINE/ PubMed, Web of Science, OneFile (GALE), Periódicos CAPES and ScienceDirect Journals databases. The PICOS approach was used to assess the eligibility of records. A meta-analysis was also conducted to show an association between described alleles/genes and CHIKV infection outcome.

Results: Reviews of genetic variants were conducted on genes: *CD 209*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *MIF*, *TLR-3*, *TLR-7*, *TLR-8*, *MYD-88*, *KIR*, *HLA-B*; *HLA-C*; *DRB1* and *DQB1*. Studies were performed on Gabon, Singapore, and India, including Indians, Malay, Gabonese and Chinese ethnicities and published between 2009–2017. The meta-analysis was performed with *DRB1* *01; *03; *04; *07; *10; *11; *13; *14 and *15 and *DQB1* *02; *03; *05 and *06 alleles with Indian population sample. Sampling power was >80% and a significant positive association between *DRB1**14 and CHIKV infection was found (OR = 1.67, 95% CI = 1.04–2.67; *p* = .03).

Conclusion: Majority of the studies were conducted in India. Meta-analysis suggests that *DRB1**14 is related to the susceptibility of symptomatic CHIKV infection in Indian population. The literature about CHIKV infection and genetic variations is scarce. The precise role of genetic variation in CHIKV is not clear yet. Further studies are necessary to provide more concrete evidences.

KEYWORDS

CHIKV; arbovirus infection; genetic polymorphism; HLA II genes

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus belonging to the family *Togaviridae* and genus *Alphavirus*. The CHIKV is generally transmitted by the bite of infected *Aedes* mosquitoes and, may trigger important pathogenicity in humans and animals, causing an acute febrile disease with debilitating arthritis, the chikungunya fever (Galán-Huerta

CONTACT Jean Moisés Ferreira  jean.moisés@hotmail.com  LIKA, Centro De Biociências, Universidade Federal De Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-420, Brazil

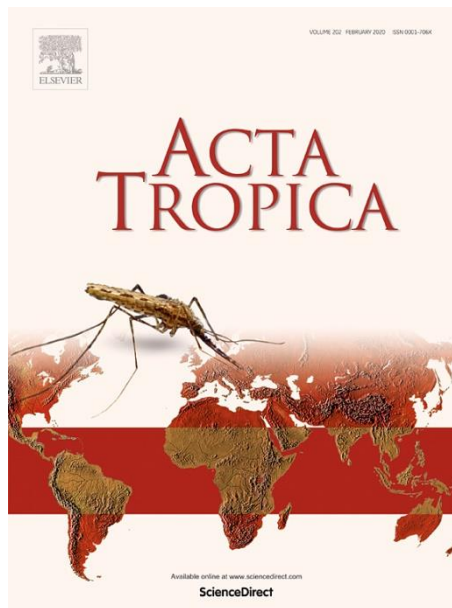
 Supplemental data for this article can be accessed publisher's website.

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

APÊNDICE C: ARTIGO EM COLABORAÇÃO 2

Publicado na Revista: Acta Tropica.

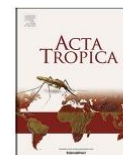
Fator de Impacto: 2.629





Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Association of polymorphisms in serotonin and nitric oxide genes with clinical outcome of dengue in Brazilian northeast population

Ana Caroline Melo dos Santos^a, Edilson Leite de Moura^a, Denise Macêdo da Silva^b, Alexandre Wendell Araujo Moura^b, Jean Moises Ferreira^c, Abel Barbosa Lira Neto^b, Aline Cristine Pereira e Silva^d, Verônica de Medeiros Alves^e, Tatiane Luciano Balliano^f, Karol Fireman de Farias^b, José Luiz de Lima Filho^c, Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo^{b,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n Tabuleiro do Martins, CEP: 57072-900, Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brazil

^b Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, 57309-005, Arapiraca, AL, Brazil

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Laboratório de Cronobiologia Molecular, Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, 57309-005, Arapiraca, AL, Brazil

^e Escola de Enfermagem e Farmácia – ESENFAR – Campus AC Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, CEP: 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil

^f Instituto de Química e Biotecnologia. Laboratório de Cristalografia. Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro dos Martins, Maceió, AL, CEP: 57072-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Polymorphism
Serotonin
Nitric oxide
Interferon-gamma
Susceptibility
Protection

ABSTRACT

Serotonin and nitric oxide seem to be involved in Dengue virus infection. The aim of this study was to investigate if SNPs in serotonin and nitric oxide are associated with dengue severity. A retrospective case-control study was conducted, with groups of dengue fever (DF; n = 78) and dengue hemorrhagic fever patients (DHF; n = 49). Genotyping was performed using qPCR and PCR. The power of the sample size was calculated by G*power software. The heterozygous SL for 5-HTTLPR SNP was significantly correlated with protection against progression to DHF in the codominant SS/SL/LL (OR = 0.22, 95% CI = 0.06–0.81, p = 0.011) and overdominant models SL vs SS + LL (OR = 0.19, 95% CI = 0.06–0.65, p = 0.003). For the ENOS (rs1799983) SNP, the genotype GT was positively associated with protection for development of the clinical form in DHF compared to dengue fever (OR = 0.39, 95% CI = (0.13–1.14), p = 0.0058) in codominant GG/GT/TT and overdominant model GT vs GG + TT (OR = 0.35, 95% CI = (0.12–1.02), p = 0.04). To our knowledge, this is the first study to identify the association of the serotonin and nitric oxide SNPs with dengue severity.

1. Introduction

Dengue is one of the most important arboviruses in the world, resulting in problems in the areas of public health, environmental, economic and social. Prevalence / incidence rates in the last five decades have increased (WHO, 2012). Estimates indicate that 390 million dengue infections occur per year, and 96 million of them are asymptomatic for the infection, which is a determining factor for the transmission cycle (Bhatt et al., 2013; Duong et al., 2015).

In Latin America, the circulation of four dengue virus serotypes confers a hyperendemic pattern and increases the number of outbreaks, modifying the morbidity and mortality profile among populations

(Torres et al., 2017). In endemic countries, around 50–100 million new cases of infection are estimated (World Health Organization, 2012). Brazil is one of the Latin America countries with the highest number of dengue cases reported, including a significant percentage of deaths and severe cases of the disease (World Health Organization, 2012). In 2015, 1 688 688 cases of dengue were reported, with 1 714 confirmed cases of severe dengue fever and 140 deaths (BRASIL-PORTAL SAUDE, 2017).

Factors such as age, gender, ethnicity, viral serotype (genotype) and host genetic might be involved in the evolution of the infection (Herrero et al., 2013; dos Santos et al., 2016). The infection might present clinical manifestations, varying from febrile to severe clinical form with plasma leakage, increased vascular permeability,

* Corresponding author.

E-mail address: elainevms@yahoo.com.br (E.V.M. de Souza Figueiredo).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.015>

Received 4 January 2018; Received in revised form 5 November 2018; Accepted 14 November 2018

Available online 16 November 2018

0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.