



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO

MARIA VIVIANE ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES PRESENTES NAS PROTEÍNAS DO
ENVELOPE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA CIRCULANTE NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE EM 2020-2021**

Recife
2023

MARIA VIVIANE ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES PRESENTES NAS PROTEÍNAS DO
ENVELOPE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA CIRCULANTE NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE EM 2020-2021**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dra. Jamile Taniele da Silva

Coorientador(a): MSc. Anderson Felix dos Santos

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Maria Viviane Alves da.

Identificação de mutações presentes nas proteínas do envelope do Vírus Chikungunya circulante na Região Metropolitana do Recife em 2020-2021 / Maria Viviane Alves da Silva. - Recife, 2023.

56 : il., tab.

Orientador(a): Jamile Taniele da Silva

Coorientador(a): Anderson Feliz dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

10.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Envelope. 2. Genótipos. 3. Mutações. 4. Vírus Chikungunya (CHIKV). I. Silva, Jamile Taniele da. (Orientação). II. Santos, Anderson Feliz dos. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARIA VIVIANE ALVES DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES PRESENTES NAS PROTEÍNAS DO
ENVELOPE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA CIRCULANTE NA REGIÃO
METROPOLITANA DO RECIFE EM 2020-2021**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 25/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dra. Jamile Taniele da Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Claudio César Montenegro Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Viviane Martha Santos de Moraes
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais, José Cláudio e Valdirene, a minhas irmãs, Izabela e Gabriela, meus sobrinhos (Ana Beatriz, L. Bernardo e Liz G.) e ao meu irmão, Everton Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças, coragem e paciência para chegar até aqui, como também aos meus pais, irmãos e meus sobrinhos (Ana Beatriz, Luiz Bernardo e Liz Gabrielle) e meus familiares por todo apoio.

Agradeço também ao meu amigo Lauriano por ter me ajudado em todo o processo de ingresso ao laboratório, como também durante toda a graduação, apoiando e incentivando. A Gabriel que também esteve presente durante todo o processo, como também a Maria Eduarda e Leonydas.

Registro meus agradecimentos ao Anderson e a Bárbara que aceitaram de imediato me orientar, apesar de não ter prosseguido junto a eles devido às mudanças no projeto, como também à Amanda e a Moacyr por terem aprovado minha entrada ao laboratório. Ao André Luiz por auxiliar ensinando os processamentos. Também a toda equipe do NUPIT-SG e da REPLICK.

Meus sinceros agradecimentos à Jamile por sua orientação e acompanhado todo o processo da elaboração do trabalho, sempre se mantendo positiva e disposta a fazer dar certo e, muito pacientemente e em um curto período, se dedicou em dobro para tornar tudo isso possível. Obrigada, de verdade, por ter acreditado em mim.

Quero agradecer também aos integrantes da minha banca avaliadora (Claudio, Viviane e Werbson) por terem aceitado participar e tornar todo esse processo possível.

Por fim, agradeço especialmente ao meu irmão, Everton Rodrigo, que me incentivou bastante desde muito antes do meu ingresso numa instituição de ensino superior. Apesar de não estar mais presente em minha caminhada, suas palavras de encorajamento permanecerão sempre comigo.

A todos, o meu muito obrigada por ter contribuído com minha formação acadêmico-profissional e pessoal. Quero expressar minha imensa admiração a todos vocês por serem incríveis na minha trajetória.

RESUMO

A Febre Chikungunya (FCHIK) é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), transmitido ao humano através da picada das fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes sp.* O Estado de Pernambuco registrou duas ondas epidêmicas da FCHIK, sendo a primeira em 2016 e a segunda por volta de 2021, quando o estado ocupou o topo do ranking nacional em números de casos, registrando 31.861 casos da doença. Atualmente não há vacinas disponíveis para a FCHIK e por não haver tratamentos específicos para a infecção, aplica-se medicações para aliviar os sintomas dos acometidos. O CHIKV, agente etiológico da FCHIK, é um vírus envelopado, cujo genoma é composto por um RNA fita simples sentido positivo (+ssRNA) que codifica duas poliproteínas precursoras, que dão origem às proteínas não estruturais e estruturais. Dentre as proteínas estruturais, destacam-se as glicoproteínas do envelope, E1, E2 e E3, que são mais suscetíveis a sofrerem mutações devido à pressão seletiva exercida sobre elas, além de participarem de processos fundamentais da biologia viral. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar mutações na região codificante das proteínas do envelope de CHIKV circulante na região metropolitana do Recife (RMR) durante 2020-2021. Para isso, foram obtidas 9 amostras de soro de pacientes positivos para CHIKV por RT-qPCR, nas quais foi realizada a extração do RNA viral para o sequenciamento pelo método MinION. Após obtenção das sequências nucleotídicas, inicialmente foi determinado o genótipo circulante por análise filogenética por meio do Software MEGA11, utilizando a sequência da proteína E2. Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas com uma cepa de referência (Genbank HM045811) e traduzidas *in silico* para identificação mutações presentes nas regiões codificantes das proteínas do envelope, utilizando o software MEGA11 e BioEdit. Os resultados demonstram que os isolados deste estudo pertencem ao genótipo ECSA, além disso foram identificadas 14 mutações nas proteínas do envelope do CHIKV circulante na RMR em 2020-2021. Das mutações identificadas, dez estão localizadas na região codificante da proteína E2, o que pode ser explicado pela interação da proteína com os receptores de superfície da célula hospedeira e do mosquito. Apenas uma mutação foi detectada na proteína E3 e outras três na glicoproteína E1. Dentre as mutações identificadas, três mutações (E2-V264A, E1-K211T e E1-A305T) merecem destaque no estudo pois não foram observadas em

isolados de 2016 do Recife/PE. Além disso, estas mutações têm sua ocorrência registrada apenas em algumas cepas do Brasil. Como é o caso da mutação E1-K211T observada apenas no isolado de Santos/SP e da mutação E2-V264A, cuja ocorrência foi reportada na literatura apenas em cepas indianas do genótipo IOL e ECSA, e está presente em cepas recentes do ECSA-Brasil, a partir de 2020. Além disso, foram identificadas mutações cujo impacto biológico foi descrito na literatura por aumentar a competência vetorial de mosquitos *Aedes*, como é o caso da E2-G60D e da E2-V264A. Os dados obtidos nesse estudo reforçam a importância das pesquisas de epidemiologia molecular para a vigilância do surgimento de novas variantes do CHIKV em áreas endêmicas de arboviroses.

Palavras-chave: Envelope; Genótipo; Mutação; Vírus Chikungunya (CHIKV).

ABSTRACT

Chikungunya Fever (CHIKF) is an arbovirus caused by the Chikungunya virus (CHIKV), transmitted to humans through the bite of female mosquitoes of the genus *Aedes sp.* The State of Pernambuco recorded two epidemic waves of FCHIK, the first in 2016 and the second around 2021, when the state occupied the top of the national ranking in number of cases, registering 31,861 cases of the disease. There are currently no vaccines available for FCHIK and because there are no specific treatments for the infection, medications are applied to alleviate the symptoms of those affected. CHIKV, the etiological agent of FCHIK, is an enveloped virus, whose genome is composed of a positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) that encodes two precursor polyproteins, which give rise to non-structural and structural proteins. Among the structural proteins, the envelope glycoproteins, E1, E2 and E3, stand out, which are more susceptible to mutations due to the selective pressure exerted on them, in addition to participating in fundamental processes of viral biology. Thus, the objective of this study was to identify mutations in the coding region of the envelope proteins of CHIKV circulating in the metropolitan region of Recife (RMR) during 2020-2021. For this, 9 serum samples were obtained from patients positive for CHIKV by RT-qPCR, in which the viral RNA was extracted for sequencing by the MinION method. After obtaining the nucleotide sequences, the circulating genotype was initially determined by phylogenetic analysis using the MEGA11 Software, using the E2 protein sequence. Then, the sequences obtained were aligned with a reference strain (Genbank HM045811) and translated in silico to identify mutations present in the coding regions of the envelope proteins, using MEGA11 and BioEdit software. The results demonstrate that the isolates from this study belong to the ECSA genotype, in addition, 14 mutations were identified in the circulating CHIKV envelope proteins in the RMR in 2020-2021. Of the identified mutations, ten are located in the coding region of the E2 protein, which can be explained by the interaction of the protein with the host cell and mosquito surface receptors. Only one mutation was detected in the E3 protein and three in the E1 glycoprotein. Among the identified mutations, three mutations (E2-V264A, E1-K211T and E1-A305T) deserve to be highlighted in the study because they were not observed in 2016 isolates from Recife/PE. Furthermore, these mutations have their occurrence registered only in some strains from Brazil. As is the case of the

E1-K211T mutation observed only in the isolate from Santos/SP and the E2-V264A mutation, whose occurrence was reported in the literature only in Indian strains of the IOL and ECSA genotypes, and is present in recent strains from ECSA-Brazil, as of 2020. In addition, mutations whose biological impact has been described in the literature as increasing the vector competence of *Aedes* mosquitoes, such as E2-G60D and E2-V264A, were identified. The data obtained in this study reinforce the importance of molecular epidemiology research for the surveillance of the emergence of new variants of CHIKV in endemic areas of arboviruses.

Keywords: Chikungunya virus (CHIKV); Envelope; Genotype; Mutation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Edema articular de paciente com Chikungunya.	15
Figura 2 - Disseminação do vírus Chikungunya em vertebrados.	16
Figura 3 - Estrutura do vírus Chikungunya.	17
Figura 4 - Esquema representativo do genoma do CHIKV.	18
Figura 5 - Esquema representativo das regiões codificantes das proteínas no genoma viral.	19
Figura 6 - Ciclo replicativo do CHIKV.	22
Figura 7 - Mapa da distribuição global do vírus Chikungunya.	24
Figura 8 - Situação epidemiológica do Nordeste em 2021.	25
Figura 9 - Árvore filogenética do CHIKV.	34
Figura 10 - Mutações de aminoácidos identificadas nas proteínas do envelope do CHIKV circulante na RMR durante os anos de 2020-2021.	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características dos genes codificantes das proteínas estruturais. 20
- Tabela 2** - Características sociodemográficas e epidemiológicas das amostras de pacientes positivos com CHIKV durante o surto de 2021 na RMR, Pernambuco, Brasil. 33

LISTA DE ABREVIACOES

AA - Aminoácido

AP - Amapá

AUD - Domínio nico do Alphavirus

BA - Bahia

CDC - Centro de Controle e Preveno de Doenças

CHIKV - Vírus Chikungunya

CT - Cycle Threshold

dsRNA - RNA fita dupla

ECSA - Leste-Centro-Sul Africano

FCHIK - Febre Chikungunya

IOL - Linhagem do Oceano Índico

LEVE - Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes

LINAT - Laboratório de Imunomodulao e Novas Abordagens Terapêuticas

MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis

NCBI - National Center for Biotechnology

nsP - Proteína não estrutural

NT - Nucleotídeo

OMS - Organizao Mundial da Saúde

OPAS - Organizao Pan-Americana da Saúde

ORF - Open Reading Frame

PE - Pernambuco

PCR - Reao em Cadeia da Polimerase

PM - Membrana plasmática

RE - Retículo endoplasmático

REPLICK - Rede de Pesquisa Clínica Aplicada em Chikungunya

RMR - Região Metropolitana do Recife

RNA - cido ribonucleico

rpm - Rotaes por minuto

RT-qPCR - Reao em Cadeia da Polimerase quantitativa por Transcrio Reversa

UTR - Região não traduzida

WA - Oeste-Africano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	155
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 A Febre Chikungunya	177
2.1.1 Manifestações clínicas	177
2.1.2 Patogenia	188
2.1.3 Terapia e vacinas	20
2.2 Biologia do CHIKV	20
2.2.1 Organização genômica	21
2.2.2 Proteínas do CHIKV	22
2.2.3 Ciclo Replicativo	244
2.3 Modos de Transmissão	266
2.4 Epidemiologia	266
2.6 Epidemiologia molecular	288
2.6.1 Mutações de importância biológica	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Considerações éticas	32
4.2 Local de estudo	32
4.3 Obtenção das amostras da população de estudo	32
4.4 Ensaios biológicos	322
4.5. RT-qPCR e Sequenciamento	333
4.6 Análise filogenética	344
4.6. Identificação de mutações nas proteínas do envelope	344
5 RESULTADOS	355
5.1. Caracterização das amostras	355
5.2 Análise filogenética	355
5.3 Mutações	377
5.3.1 Glicoproteína E3	377
5.3.2 Glicoproteína E2	388
5.3.3 Glicoproteína E1	388
5.3.4 Diferenças entre as cepas de Recife (2016) e a do presente estudo (2021) . 399	
6 DISCUSSÃO	400

7 CONCLUSÃO	433
REFERÊNCIAS	434
ANEXO 1	522
ANEXO 2	533
APÊNDICE 1.....	544

1 INTRODUÇÃO

A Febre Chikungunya (FCHIK) é uma arbovirose transmitida através de picadas de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes* infectadas, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor em ambientes urbanos (Gould et al., 2017). Essa doença se configura como um problema de grande importância no âmbito da saúde pública, devido à sua crescente disseminação em diversos continentes, ao impacto significativo na saúde física e mental do indivíduo, como também na sociedade, que resulta em altas taxas de morbidade e de sobrecarga em serviços de saúde (Weaver; Forrester, 2015).

Na maioria dos casos, a FCHIK é autolimitada, porém pode evoluir em três diferentes fases clínicas da doença, sendo a fase aguda (1-14 dias do início dos sintomas) caracterizada por febre alta, mialgia, erupção cutânea, cefaleia, entre outros; a fase subaguda (15-89 dias) na qual pode ocorrer a remissão dos sintomas agudos e persistência ou agravamento da artralgia, e a fase crônica (≥ 90 dias) que caracteriza-se pela persistência prolongada de dor e rigidez articular, que pode durar meses ou anos, trazendo prejuízos à saúde mental e física dos indivíduos acometidos (Simon et al., 2015; Van Aalst et al., 2017).

O vírus Chikungunya (CHIKV), agente etiológico da FCHIK, pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (Powers et al., 2001). Ele foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra de soro humano em 1952, na atual Tanzânia (Ross, 1956). Desde o primeiro isolamento, o CHIKV permaneceu endêmico na Ásia e na África. Contudo, após um grande surto epidêmico em 2005-2006, o CHIKV se disseminou para outros continentes, chegando às Américas em 2013. Em 2014, foram confirmados os primeiros casos autóctones no Amapá e Bahia, e em 2016 foram notificados mais de 270 mil casos em todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2018).

O Estado de Pernambuco registrou dois surtos da doença (2016 e 2021), nos quais foi o segundo estado mais afetado em número de casos em 2016 (taxa de incidência de 532,8 casos/100.000 habitantes). Em 2021, o Estado de Pernambuco alcançou o primeiro lugar no ranking nacional, notificando 33% dos casos de todo o território brasileiro (31.861 casos e 2 óbitos) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021).

Diferentes fatores podem contribuir para o aumento do número de casos de CHIKV, entre eles os fatores genéticos virais, como o genótipo e a ocorrência de mutações que podem favorecer o vírus. Dentre as proteínas do CHIKV, as proteínas do envelope sofrem maior pressão seletiva devido sua interação com receptores do mosquito e do hospedeiro, o que pode levar à ocorrência de mutações que podem ter impacto biológico.

Apesar disso, pouco se sabe sobre as variações genômicas e linhagens do CHIKV circulantes no Estado de Pernambuco. Portanto, se faz necessária a descrição do genótipo circulante em 2021, bem como a identificação de variações no genoma do CHIKV, principalmente nas proteínas do envelope. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é realizar a identificação de mutações na região codificante das proteínas do envelope do vírus Chikungunya circulante na Região Metropolitana do Recife durante o surto de 2020-2021.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Febre Chikungunya

A FCHIK é uma doença tropical negligenciada (Rougeron et al., 2015) cujo agente etiológico da FCHIK é o vírus Chikungunya (CHIKV). A FCHIK é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e tem seu período de incubação de 3 a 12 dias (Simon et al., 2015; Souza *et al.*, 2022).

A doença tem início súbito logo após o período de incubação, marcada pela febre imediata e pela artralgia na maioria dos casos (Chhabra et al., 2008).

2.1.1 Manifestações clínicas

Após o início dos sintomas, a FCHIK pode ser clinicamente classificada em 3 fases subsequentes que são determinadas de acordo com o tempo de início dos sintomas, são elas a fase aguda, ou febril; a fase subaguda e a fase crônica (Brasil, 2017).

A fase aguda da FCHIK corresponde ao período do primeiro ao 14º dia do início dos sintomas. É característico desta fase: a febre alta, de início súbito; mialgia; poliartralgia, predominantemente das articulações distais e geralmente é simétrica bilateralmente; edemas, resultantes das inflamações articulares (**Figura 1**); e exantema. Alguns outros sintomas podem acompanhar esta fase, porém são pouco comuns, como a conjuntivite, diarreia, entre outros. A fase subaguda, que inicia no 15º e dura até o 89º dia após o início dos sintomas, é marcada pela ausência da febre, podendo haver o agravamento e/ou a persistência da artralgia. Nesta fase é comum o aparecimento do prurido (coceira) pelo corpo (Brasil, 2017).

A fase crônica, que inicia a partir do 90º dia do início dos sintomas, pode perdurar por meses ou anos. A artralgia persistente e debilitante é o principal sintoma dos pacientes que evoluíram para esta fase (Brasil, 2017).

Figura 1 - Edema articular de paciente com Chikungunya.



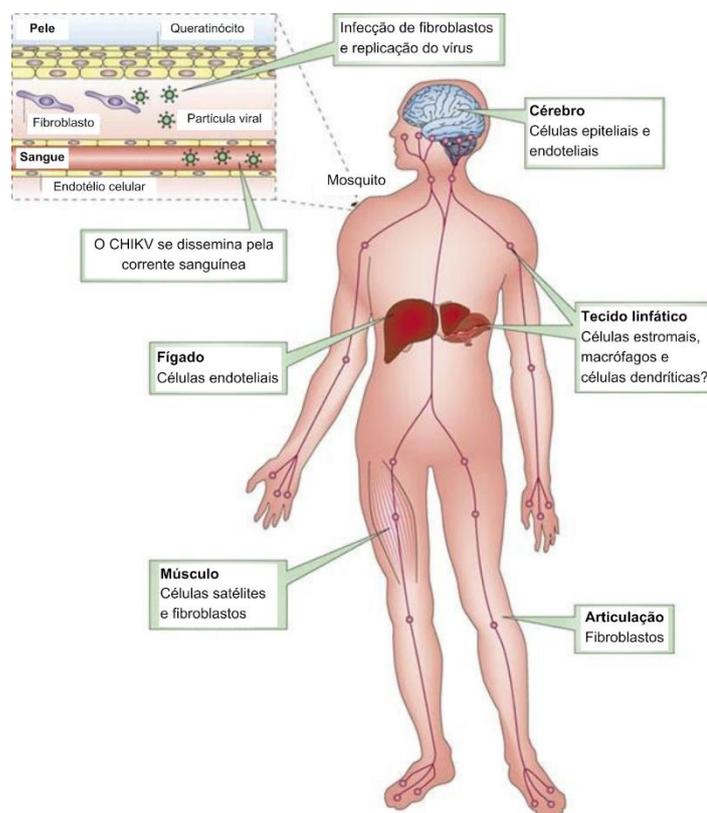
Fonte: Chikungunya: Manejo Clínico (Brasil, 2017).

Os sintomas se desenvolvem em 50 a 97% das pessoas infectadas pelo vírus Chikungunya (Mapalagamage et al., 2022). Apesar de apresentar baixos índices de letalidade, a Chikungunya é caracterizada como uma doença de taxa de morbidade elevada, isso implica dizer que essa infecção pode interferir de forma significativa na qualidade de vida dos acometidos, uma vez que a artralgia persistente resulta na redução da capacidade e produtividade física do indivíduo (Brasil, 2017).

2.1.2 Patogenia

A infecção pelo vírus Chikungunya inicia-se por meio da inoculação da partícula viral através de um organismo vetor (picada de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* ou *A. albopictus* infectadas), na pele humana. Após a inoculação, o vírus se replica em células residentes da pele e alcança a circulação sanguínea através dos vasos sanguíneos, e se dissemina para outras regiões do corpo, como as articulações, fígado, tecidos linfoides e músculos e dá continuidade ao processo de replicação (Lopes Marques et al., 2020) (**Figura 2**).

Figura 2 - Disseminação do vírus Chikungunya em vertebrados.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2: A transmissão do vírus Chikungunya (CHIKV) ocorre após a picada do mosquito (*Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*). O CHIKV então se replica na pele, em fibroblastos, e se dissemina para o fígado, músculos, articulações, tecido linfóide (gânglios linfáticos e baço) e cérebro. As células-alvo são indicadas para cada tecido. Fonte: Adaptado de (Schwartz; Albert, 2010)

Em decorrência do acometimento das articulações durante a infecção pelo vírus, muitos pacientes se queixam de dores intensas nessas regiões, que podem ser até mesmo incapacitantes para o indivíduo (Silva et al., 2021). Durante o desenvolvimento da doença para a fase crônica, há muitos relatos da persistência das dores e rigidez articular (de 30 a 40% dos infectados cronificam) (De Lima Cavalcanti et al., 2022) que pode estar associada à infecção pelo CHIKV, apesar do agente patogênico não ser mais detectado circulando nos pacientes.

O período de viremia humana, em que o RNA viral é detectável em sangue periférico, é de aproximadamente 10 dias e após esse tempo o vírus é eliminado do corpo (Lopes Marques et al., 2020), onde observa-se a resposta imune adaptativa específica para CHIKV de forma evidente, já que antes desse período, a resposta imune inata que atuava predominantemente.

2.1.3 Terapia e vacinas

Apesar dos grandes surtos da FCHIK ocorrido em diversos países, ainda não se tem tratamentos específicos para a doença, sendo necessário o uso de meio alternativos que visam o alívio dos sintomas associados à infecção pelo CHIKV. Atualmente, faz-se o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) para tratar a artrite/artralgia resultante da infecção (Tharmarajah, Mahalingam, Zaid, 2017). Alguns outros fármacos são utilizados também para tratar a artralgia/artrite, como o fosfato de cloroquina que é eficaz para artrite crônica, o antiviral ribavirina que reduz o inchaço nas articulações e tecidos moles, dentre outros.

Apesar disso, ainda não há antivirais e vacinas específicos para a FCHIK disponíveis (Tharmarajah, Mahalingam, Zaid, 2017; Manzoor *et al.*, 2022). Entretanto, algumas vacinas já estão sendo desenvolvidas e encontram-se em fases de teste, como a TSI-GSD-218, uma vacina que utiliza vírus vivo atenuado que está sendo desenvolvida pelo Instituto de Pesquisa Médica de Doenças Infecciosas do Exército dos Estados Unidos, como também as VRC-CHKV, MVCHIK e a CHIKV/IRES (Manzoor *et al.*, 2022).

2.2 Biologia do CHIKV

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus*, da família dos *Togaviridae* (Powers *et al.*, 2001).

O CHIKV é um vírus esférico, de aproximadamente 70 nm de diâmetro (Khan *et al.*, 2002), envelopado, cujo envelope é formado por duas glicoproteínas, a proteína de fusão E1 e a proteína de ligação E2, com proteínas E3 associadas (Simizu *et al.*, 1984). As proteínas do envelope são incorporadas a uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, que envolve o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo do CHIKV é icosaédrico e é formado por proteínas do capsídeo envolvendo o RNA genômico (Holland Cheng *et al.*, 1995) (**Figura 3**).

Figura 3 - Estrutura do vírus Chikungunya

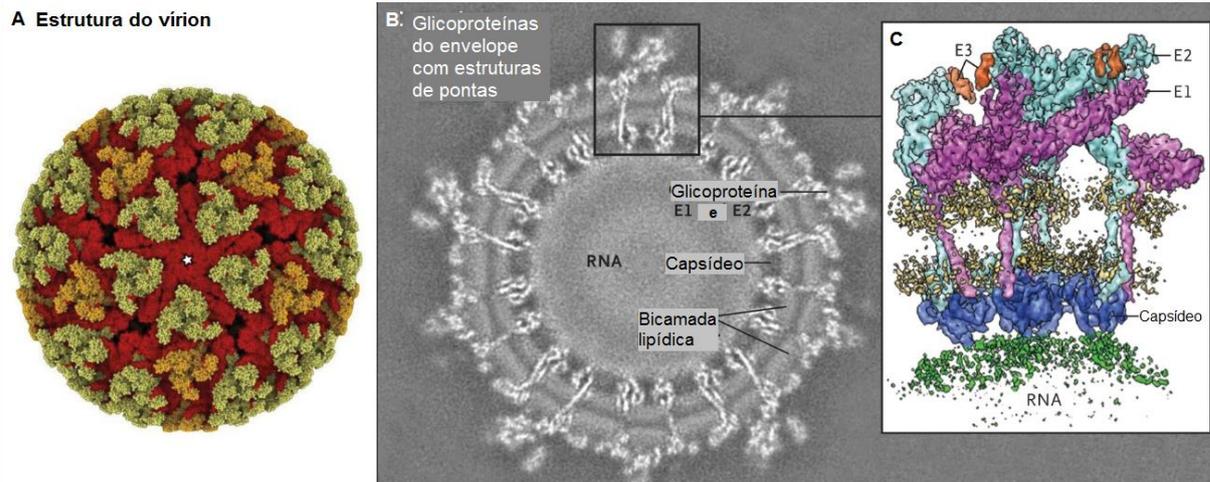


Figura 3: Em A mostra a estrutura do virion. B mostra a organização das estruturas do envelope viral de CHIKV. Em C a reconstrução microscópica crioelétrica do vírus Chikungunya, indicando E1 (magenta), E2 (ciano), E3 (laranja) e PC (azul), e a membrana viral (amarela) e o RNA genômico (verde). Fonte: Adaptado de (Weaver; Lecuit, 2015)

2.2.1 Organização genômica

O genoma do CHIKV é composto por uma RNA fita simples de sentido positivo (+ssRNA), com aproximadamente 11,8kb, que estão distribuídas entre um Cap na extremidade 5', acompanhado de duas janelas de leitura aberta (ORFs do inglês *Open Reading Frames*), com uma região não codificante de proteínas (UTR do inglês *Untranslated Region*) separando-as, seguindo com uma cauda Poli-A em sua extremidade 3' (Khan et al., 2002) (**Figura 4**).

Figura 4 - Esquema representativo do genoma do CHIKV

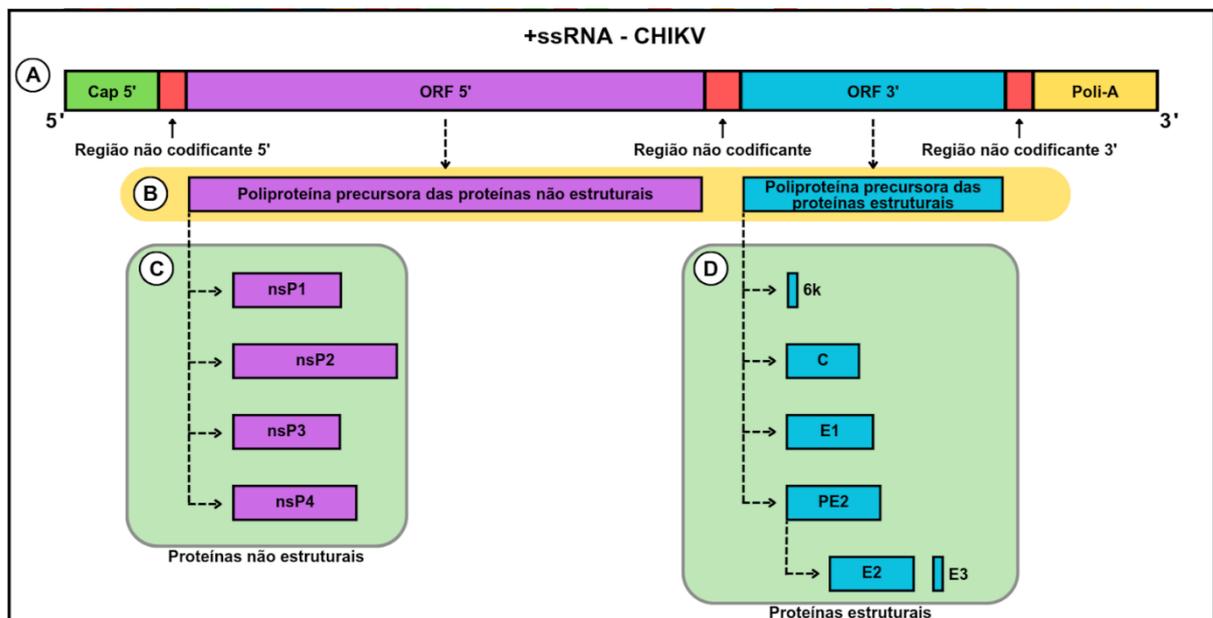
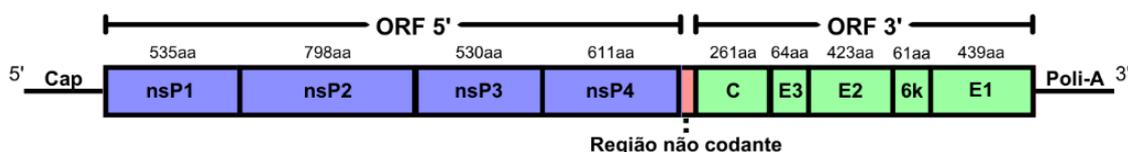


Figura 4: Imagem representativa da organização genômica do CHIKV. Em **(A)** é ilustrado o +ssRNA do CHIKV, esquematizando a estrutura do genoma viral que contém um Cap na sua extremidade 5' (verde), uma ORF 5' e outra 3' (roxo e azul, respectivamente), uma cauda poli-A na extremidade 3' e três regiões não codificantes de proteínas, separando as estruturas citadas anteriormente. Em **B**, mostra as poliproteínas originadas a partir da tradução das ORFs 5' e 3', sendo a P1234 (em roxo) e a PC-pE2-6K-E1 (azul), respectivamente. **C** ilustra as proteínas não estruturais nsP1, 2, 3 e 4, geradas a partir de clivagem da poliproteína precursora P1234, enquanto **D** representa a proteína do capsídeo (C), 6k, E1, PE2 (dá origem a E2 e E3), que são as proteínas estruturais. Fonte: Autoria própria.

O genoma do CHIKV se organiza da seguinte forma: Cap 5' > nsP1 > nsP2 > nsP3 > nsP4 > Região não codante > C > E3 > E2 > 6k > E1 > Poli-A (3') (De Figueiredo; Figueiredo, 2014). A ORF da extremidade 5' corresponde a aproximadamente dois terços ($\frac{2}{3}$) do genoma e codifica a poliproteína precursora das proteínas não-estruturais (nsPs). Essa poliproteína, denominada P1234, após sofrer clivagens proteolíticas, resulta nas proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A ORF da extremidade 3' codifica a poliproteína PC-pE2-6K-E1, que é precursora das proteínas estruturais, correspondendo a cerca de um terço ($\frac{1}{3}$) do genoma viral (Strauss; Strauss, 1994) (**Figura 5**).

Figura 5 - Esquema representativo das regiões codificantes das proteínas no genoma viral



Fonte: Autoria própria.

2.2.2 Proteínas do CHIKV

As nsPs do CHIKV atuam no processo de replicação viral. A nsP1 é responsável pela ancoragem do complexo de replicação na membrana (Delang et al., 2016). A proteína nsP2 é responsável pelo processamento das poliproteínas não estruturais (P1234 e P123), como também atua na transcrição do RNA genômico, como helicase, trifosfatase e protease e na síntese de RNA subgenômico (Hahn; Strauss; Strauss, 1989; Karpe; Aher; Lole, 2011). A nsP3 é subdividida em três domínios executam funções de hidrólise da ADP-ribose, exibição da ADP-ribose e ligação de RNA em seu primeiro domínio, o central é denominado de domínio único do *Alphavirus* (AUD), isso porque está presente apenas nesse gênero, de função ainda indefinida, e um C-terminal hiper variável, domínio terminal, que desempenha um papel em interações do tipo vírus-hospedeiro, podendo ser um fator determinante na patogenicidade (Gao et al., 2019). A nsP4, por sua vez, é uma RNA polimerase

dependente de RNA, catalisadora da síntese de RNA viral a partir de um molde de RNA (Chen et al., 2017).

As proteínas estruturais têm papel importante na estrutura, reconhecimento e proteção do vírus. A poliproteína sofre uma auto proteólise instantânea, liberando a proteína do capsídeo (C) que reconhece sinais específicos do empacotamento para formar o nucleocapsídeo (Bala Murugan; Sathishkumar, 2016). A E2 é a proteína responsável pela interação vírus-hospedeiro (Kuo et al., 2012), uma vez que é reconhecida pelos receptores presentes nas membranas celulares dos hospedeiros (Schnierle, 2019). A E1, por sua vez, tem função de fundir o envelope do CHIKV à membrana do endossoma que envolve o vírus dentro do citoplasma da célula (Kuo et al., 2012). Somente após essa fusão, o capsídeo viral é liberado no interior da célula do hospedeiro (Schnierle, 2019). A proteína E3 realiza o direcionamento da poliproteína (com exceção da proteína do capsídeo que já foi liberada) ao retículo endoplasmático (RE) onde será processada pela peptidase de sinal, proteases presentes na membrana do hospedeiro (Bala Murugan; Sathishkumar, 2016). A proteína 6k, por sua vez, é um peptídeo de sequência sinalizadora para a translocação da E1 (Singh et al., 2018), assim como pode formar canais de íons de cátions que alteram a permeabilidade da membrana, atuando como viroporina (Singh et al., 2018). A **Tabela 1** apresenta as principais características dos genes codificantes das proteínas e suas respectivas funções principais.

Tabela 1 - Características dos genes codificantes das proteínas estruturais

GENE	POSIÇÃO NO GENOMA COMPLETO (NT)	POSIÇÃO NA POLIPROTEÍNA ESTRUTURAL (AA)	COMPRIMENTO (AA)	FUNÇÃO
ORF2	7550-11296	1-1248	1248	Poliproteína precursora das proteínas estruturais.
C	7550-8332	1-261	261	Formação do nucleocapsídeo.
E3	8333-8524	262-325	64	Direciona a poliproteína ao RE para processamento.
E2	8525-9793	326-748	423	Reconhecimento pela membrana hospedeira.
6K	9794-9976	749-809	61	Sequência sinalizadora para a translocação da proteína E1 e atua como viroporina.
E1	9977-11293	810-1248	439	Proteína de fusão do envelope à membrana do endossoma.

Tabela 1: Características dos genes codificantes das proteínas estruturais do CHIKV, segundo a literatura. A localização e comprimento das proteínas foram obtidas considerando a sequência do vírus Chikungunya da cepa ROSS de baixa passagem do GenBank (HM045811). Fonte: Autoria própria.

2.2.3 Ciclo Replicativo

A entrada do CHIKV em células suscetíveis ocorre quando a proteína E2, presente no envelope, interage com receptores de membrana das células do hospedeiro. A célula hospedeira realiza uma endocitose, formando uma vesícula revestida de clatrina que engloba o vírus. Essas vesículas (endossomais) possuem o pH ácido, fazendo com que ocorra mudanças conformacionais nos heterodímeros (E1-E2), expondo o peptídeo de ligação da E1. A proteína E1 atua promovendo a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, liberando assim o nucleocapsídeo no citoplasma celular, que se associa a subunidades ribossomais que fazem com que o capsídeo se desmonte no citosol, expondo o RNA viral (Schnierle, 2019; Silva & Dermody, 2017).

A replicação do vírus Chikungunya inicia logo após a liberação do RNA genômico no citoplasma da célula alvo, sendo traduzido e gerando a poliproteína P1234 (precursora das proteínas não estruturais). A P1234 sofre clivagem autocatalítica da nsP2 que desagrega a nsP4 da P123. A proteína nsP4 atua como RNA polimerase e a P123 como RNA replicase que juntas sintetizam o RNA de cadeia negativa, tendo como base o RNA genômico viral, formando RNA fita dupla (dsRNA) (Silva & Dermody, 2017). Após essa etapa, a P123 é novamente clivada e libera a nsP1 que permite exclusivamente a síntese de RNA cadeia positiva. Após nova clivagem, nsP2 e nsP3 são separados e atuam na síntese do RNA subgenômico 26S (Kumar et al., 2015). Com a tradução do RNA 26S, a poliproteína PC-pE2-6k-E1 é sintetizada e clivada (autoproteólise), liberando a proteína do capsídeo (C) que forma o nucleocapsídeo junto com o RNA genômico sintetizado. Após a montagem, nucleocapsídeo se agrega ao heterodímero E1/E2 presente na membrana plasmática, o que resulta no brotamento do vírion maduro (Silva & Dermody, 2017) (**Figura 6**).

Figura 6 - Ciclo replicativo do CHIKV.

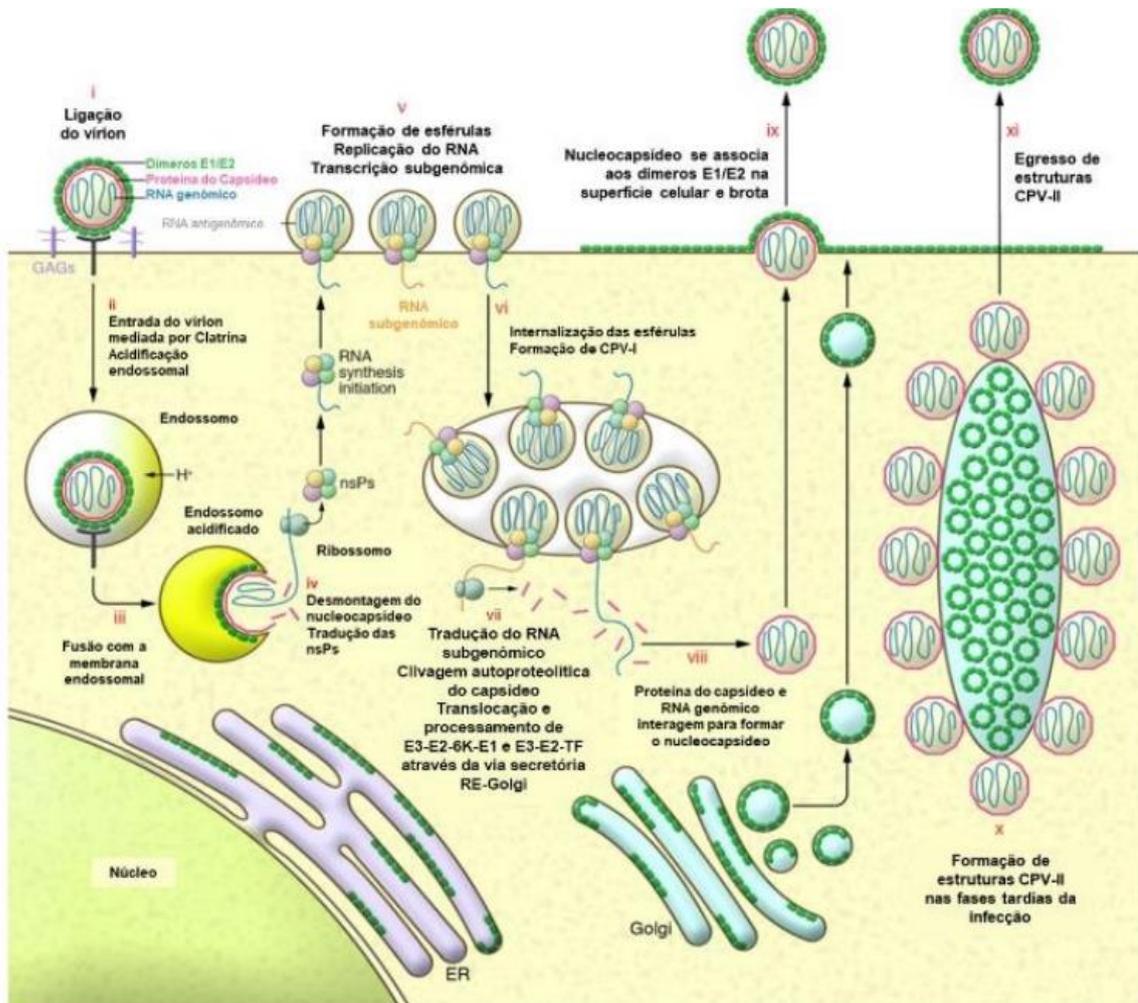


Figura 6: (i) E2 se liga à superfície celular por meio de um receptor desconhecido e possivelmente glicoproteínas como fatores de ligação. (ii) CHIKV entra na célula através de endocitose mediada por clatrina. A acidificação dos endossomos leva à inserção do peptídeo de fusão em E1 na membrana endossomal. (iii) A fusão do envelope viral e da membrana endossomal libera o nucleocapsídeo no citosol. (iv) A desmontagem do nucleocapsídeo libera o RNA genômico de sentido positivo e ocorre a tradução da proteína não estrutural (nsP). (v) Quatro nsPs, junto com o RNA genômico e presumivelmente as proteínas hospedeiras, montam na membrana plasmática (PM) e a modificam para formar compartimentos de replicação viral (esférulas) contendo dsRNA viral. O nsP1-4 funciona como uma replicase e localiza-se no pescoço da esférula para gerar vRNAs genômicos, antígenômicos e subgenômicos. (vi) A internalização das esférulas permite a formação de grandes vacúolos citopáticos (CPV-1) que abrigam múltiplas esférulas. As esferas na PM ou no CPV-I são totalmente funcionais. (vii) A tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural e a autoproteólise do capsídeo libera o capsídeo livre no citoplasma. Translocação das poliproteínas E3-E2-6K-E1/E2-E2-TK para o RE. E2/E1 são modificados pós-traducionalmente, transitam pelo sistema secretor e são depositados na PM. (viii) A interação do capsídeo com o RNA genômico leva à formação de nucleocapsídeos icosaédricos. (ix) Nucleocapsídeos agrupam-se com E2/E1 na PM, resultando em brotamento de vírions descendentes maduros. (x) Mais tarde na infecção, CPV-IIs se formam, contendo redes hexagonais de E2/E1 e são cravejados com nucleocapsídeos. Fonte: Adaptado de (Silva & Dermody, 2017).

2.3 Modos de Transmissão

A transmissão do CHIKV ocorre através de um organismo vetor infectado do gênero *Aedes* e pode ocorrer em dois ciclos distintos: selvagem e urbano (Singh; Unni, 2011). No ciclo selvagem, o CHIKV é transmitido entre vetores dos mosquitos *Aedes spp.* primatófilicos e diferentes espécies de primatas não-humanos. Estes ciclos ocorrem em regiões de florestas e rurais (Diallo et al., 2012). Devido à expansão territorial para ambientes florestais, o CHIKV se adaptou para o ciclo urbano, onde os principais vetores são os mosquitos *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* (Guthid et al., 2020)

O *Ae. aegypti* é uma espécie de mosquito, na qual os machos se alimentam de matéria vegetal, predominantemente, e as fêmeas necessitam se alimentar de sangue para o amadurecimento dos seus ovos que serão depositados nas paredes internas de objetos próximos à superfície da água. A transmissão do CHIKV pelo mosquito *Ae. albopictus* iniciou após uma adaptação na genética viral, com a ocorrência da substituição de Alanina por Valina na posição 226 da E1 (Schuffenecker et al., 2006). Essa adaptação aumentou o potencial epidêmico do CHIKV pois permitiu que o CHIKV chegasse em regiões mais frias, pois o *Ae. albopictus* suporta altitudes maiores e resiste a temperaturas abaixo de 0°C (Gratz, 2004).

A disseminação se dá por meio de um humano infectado que, ao ser picado, transmite o vírus para a fêmea do mosquito, que consegue infectar outros humanos ao se alimentar novamente de sangue, propagando assim o vírus numa determinada população.

2.4 Epidemiologia

O CHIKV foi descrito pela primeira vez por volta de 1952, durante um surto de dengue ocorrido na atual Tanzânia (Lumsden, 1955). Após esse surto, o CHIKV se espalhou por diferentes regiões na África e na Ásia, causando surtos no sudeste asiático e na Índia.

Até 2004, o CHIKV permaneceu endêmico nos territórios da África e da Ásia, porém, após um surto epidêmico ocorrido no Quênia, o CHIKV emergiu para as ilhas do Oceano Índico, causando milhares de casos na população entre 2005 e 2006 (Zeller; Bortel; Sudre, 2016).

Uma das ilhas mais atingidas foi a Ilha de La Reunion, onde cerca de $\frac{1}{3}$ da população positivou para CHIKV. Estudos atribuem esse grande surto a uma mutação na proteína E1, de Alanina (A) para Valina (V), que conferiu aptidão ao mosquito *Aedes albopictus*, vetor abundante na região (Tsetsarkin et al., 2007). Após o surto nas Ilhas do Oceano Índico, o CHIKV se espalhou por vários continentes, chegando nas Américas no ano de 2013, sendo detectado em um paciente na ilha de São Martinho (Saint Martin), Antilhas, propagando-se para diversos países, resultando em mais de 1 milhão de infecções após um ano de introdução do vírus (Sahadeo et al., 2017).

Atualmente, o CHIKV está presente em todos os continentes, ocasionando diversos surtos epidêmicos desde a sua descoberta. Foram identificados casos de infecção pelo Chikungunya em quase 115 países, de acordo com a Organização Panamericana da Saúde (OPAS), os quais totalizam mais de 2 milhões de casos reportados da doença desde 2005, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Figura 7).

Figura 7 - Mapa da distribuição global do vírus Chikungunya.

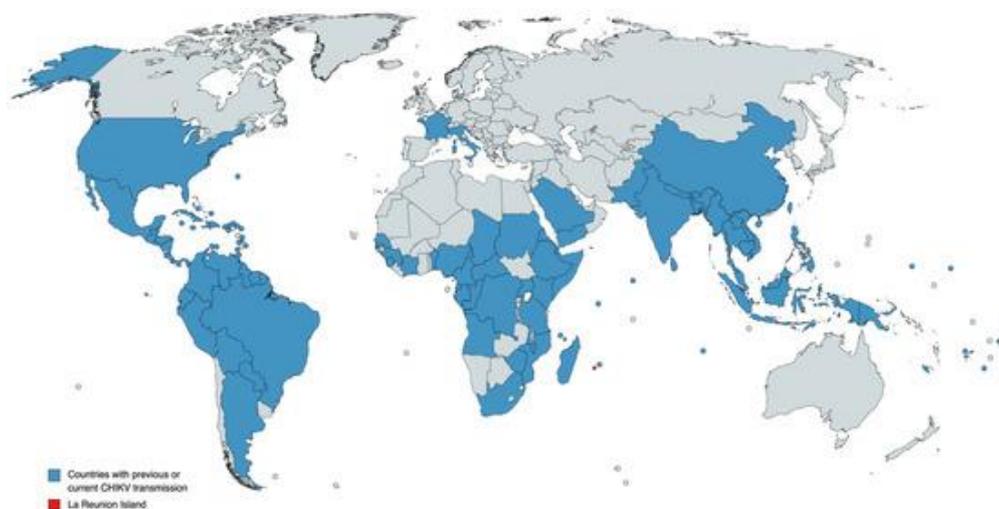


Figura 7: Os países com transmissão anterior ou atual de Chikungunya são de cor azul, de acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), conforme relatado em fevereiro de 2022. A Ilha da Reunião é de cor vermelha, dada sua importância histórica. Não inclui casos importados. Embora o território americano do Alasca seja de cor azul, nenhuma transmissão de CHIKV foi documentada nessa área. Fonte: De Lima Cavalcanti et al., 2022

Em 2014, o CHIKV foi notificado em Oiapoque-AP e Feira de Santana-BA, porém, um estudo realizado por Souza et al. (2019) aponta que a introdução do vírus da Chikungunya no Brasil ocorreu no ano de 2013 com a chegada do genótipo ECSA no estado da Bahia, aproximadamente um ano antes do que havia sido relatado pelos órgãos de vigilância epidemiológica que apontavam para os primeiros casos em 2014.

Desde então o vírus se alastrou alcançando todos os estados brasileiros, porém concentrando-se principalmente no Nordeste e Sudeste, regiões mais populosas do país. Dados do Ministério da Saúde, datando do período de 2015 a junho de 2023, constam aproximadamente 1,173 milhão casos prováveis de Chikungunya no Brasil, como também mais de 900 óbitos pela doença. O ano de maior incidência foi 2016, registrando 277.882 casos da doença e 318 óbitos, com destaque para a região Nordeste que foi responsável por quase 240 mil casos prováveis e 296 óbitos referentes aos valores citados anteriormente (Ministério da Saúde, 2023).

Ainda de acordo com dados do Ministério da Saúde, que diz respeito a Semana Epidemiológica 22 (2023), o Nordeste do Brasil registrou dois surtos da doença Chikungunya, o primeiro em 2016-2017, totalizando cerca de 380 mil casos e aproximadamente 500 óbitos e o segundo em 2022, com ~148 mil casos e 90 óbitos (Figura 8).

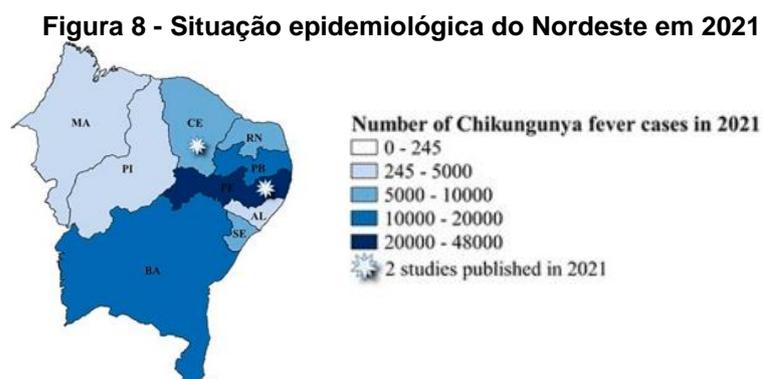


Figura 8 - Mapa da região Nordeste e seus respectivos estados federados, número de casos notificados de febre Chikungunya no ano de 2021 e o número de estudos de interesse publicados até Nov/2022 (Carmo Silva et al, 2023).

O Estado de Pernambuco, por sua vez, também apresentou duas ondas epidêmicas, sendo a primeira no ano de 2016 com mais de 50 mil casos prováveis e 94 óbitos. A outra onda epidêmica do estado ocorreu em 2021, registrando quase 28 mil casos e 4 mortes em decorrência da doença (Ministério da Saúde, 2023).

2.5 Epidemiologia molecular

O CHIKV é um vírus que apresenta um único sorotipo, diferentemente da Dengue (outra arbovirose transmitida pelos mesmos vetores) que possui quatro. Em resumo, isso implica dizer que, no caso da dengue, a reinfecção do mesmo indivíduo é possível, já que o vírus possui variantes que não são reconhecidas pelas células

resultantes da imunidade adaptativa após a primeira infecção. Na Chikungunya isto não é passível de ocorrer, pois apenas um sorotipo é responsável por desenvolver a doença (Saswat et al., 2018).

Apesar disso, diferentes genótipos do CHIKV são observados, como: Asiático, Oeste-Africano, o Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) e sua linhagem Oceano Índico (IOL) (Powers et al., 2001).

O primeiro surto de Chikungunya foi registrado, em 1952, numa região da Tanzânia, localizada no leste africano. Posteriormente o vírus se espalhou por outras regiões da África, como no Zimbábue e República Democrática do Congo e deu origem ao genótipo East-Central-South African (ECSA) (Osterrieth; Blanes-Ridaura, 1960; Powers et al., 2001; Rodger, 1961).

O genótipo Oeste-Africano (WA do inglês West African) compreende cepas provenientes da Nigéria e Senegal, que se localizam na África ocidental (Volk et al., 2010).

O genótipo asiático é uma linhagem que emergiu da África e foi descrita pela primeira vez em 1958 em um surto ocorrido em Bangcoc (Hammon; Rudnick; Sather, 1960). Cepas sequenciadas provenientes de surtos em Calcutá e Madras, bem como em outras regiões do sudeste asiático também se alocam no genótipo asiático (Powers et al., 2001).

Durante uma epidemia que ocorreu no Oceano Índico, na Ilha da Reunião em meados de 2005-2006, foi detectada uma mutação na posição 226 da proteína estrutural E1, substituindo uma alanina pela valina (E1-A226V) (Schuffenecker et al., 2006). Essa mutação resultou numa nova linhagem do ECSA, a Linhagem do Oceano Índico (IOL), que devido a essa alteração, ocorreram mudanças no padrão epidemiológico da Chikungunya, com a elevação da eficiência da transmissão do vetor (*A. albopictus*), infectividade, gravidade e morbidade, afetando diversos países (Chomposri et al., 2016)

No Brasil, há a circulação de dois genótipos do vírus Chikungunya, o asiático e o ECSA. O asiático foi descrito no país pela primeira vez em um caso do Amapá e o ECSA da Bahia, que permanece sendo detectado em diferentes estudos de epidemiologia molecular (Naveca et al., 2019; Tanabe et al., 2018; Trinta et al., 2018).

2.5.1 Mutações de importância biológica

Diferentes mutações ocorridas no CHIKV que podem trazer impacto biológico relevante já foram descritas na literatura. A mutação mais recorrentemente mencionada foi responsável pelo surgimento da Linhagem IOL, através da troca de alanina por uma valina na posição 226 da proteína E1 (E1-A226V). Essa mutação, juntamente com outras mutações epistáticas, originou um novo clado dentro do genótipo ECSA e é responsável por várias epidemias (Tsetsarkin et al., 2009).

A mutação E1-A226V proporciona ao vírus uma maior adaptação ao *A. albopictus*, fazendo com que o vírus alcance locais onde antes não era observado (Bordi et al., 2018; Tsetsarkin et al., 2011). Outra mutação de grande importância é a E1-A98T, característica do genótipo asiático. A substituição da alanina pela treonina (T) na posição 98 da glicoproteína E1 permite que o vírus apresente uma melhor adaptação ao *A. aegypti*. (Chen et al., 2016).

As mutações também podem trazer impacto no reconhecimento de antígenos, como a E2-K252Q, que apresenta uma capacidade de interferir na interação antígeno-anticorpo, no qual foi observado que peptídeos contendo a glutamina (Q) apresenta um maior reconhecimento pelo anticorpo anti-CHIKV, mediado por possíveis mudanças conformacionais ocorridas na região de ligação (Kam et al., 2012).

Em relação à patogenicidade, foi visto que a mutação E2-K200R, junto à uma deleção na 3'UTR proporcionam uma maior virulência do CHIKV em camundongos, onde foi observado que um aumento da patogenicidade e disseminação do vírus em modelos animais, intensificado esses efeitos (Hawman et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as mutações presentes nas glicoproteínas que compõem o envelope do vírus Chikungunya circulante na região metropolitana do Recife entre 20/07/2020 e 29/10/2021.

3.2 Objetivos específicos

1. Obter a sequência nucleotídica das regiões codificantes para proteínas do envelope viral (E3, E2 e E1);
2. Realizar a caracterização das amostras quanto aos seus dados sociodemográficos, epidemiológicos e fase clínica da doença;
3. Definir o(s) genótipo(s) do CHIKV circulante na RMR por análise;
4. Investigar a existência de mutações não-sinônimas presentes nos genes codificantes para as proteínas E1, E2 e E3;
5. Comparar as mutações presentes nos isolados de 2020-2021 com uma cepa de Recife do ano de 2016.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética CAAE da Universidade Federal de Pernambuco com o número 07936919.8.2010.5208.

4.2 Local de estudo

O presente estudo foi desenvolvido na Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco localizado no Nordeste do Brasil. As amostras foram coletadas durante atendimento ambulatorial no Hospital das Clínicas (UFPE – Recife – Pernambuco) e processadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT/UFPE). O sequenciamento foi realizado em parceria com o Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE - UNICAMP). As análises *in silico* foram realizadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens (LINAT/UFPE).

4.3 Obtenção das amostras da população de estudo

As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas durante um estudo de Coorte da Rede de Pesquisa Clínica e Aplicada em Chikungunya (REPLICK), que recrutou pacientes através de busca ativa e no ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE durante o ano de 2020-2021. Nesse estudo foram incluídos participantes com diagnóstico positivo para CHIKV (teste rápido, RT-qPCR ou Elisa IgM anti-CHIKV), com idade superior a 18 anos e que tenham consentido sobre a participação de estudos clínicos da REPLICK. O detalhamento do estudo pode ser encontrado em Da Silva Duarte e colaboradores (2023).

Para o presente estudo, foram coletados dados sociodemográficos (**Anexo 1**) e foram incluídos participantes positivos para CHIKV por RT-qPCR com Cycle Threshold (Ct) ≤ 30 .

4.4 Ensaios biológicos

As amostras foram processadas seguindo o protocolo para processamento de amostras biológicas da REPLICK (Da Silva Duarte et al., 2023). Para extração do soro,

o material biológico foi coletado em tubos de 9mL contendo gel separador e ativador de coágulo e mantidos em uma temperatura entre 2 e 8°C por, no máximo, 4h para a preparação das alíquotas.

Para obter o soro, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos com velocidade de aceleração e freio de 6 e 4, respectivamente. As alíquotas foram armazenadas em microtubos de 1,5mL e depositadas em criocaixas e mantidas no freezer até o congelamento a -80°C.

4.5 RT-qPCR e Sequenciamento

Para a obtenção das sequências nucleotídicas das amostras, foi realizada extração de RNA viral, seguida de PCR multiplex e sequenciamento através da plataforma MinION (Oxford Nanopore Technologies, UK), conforme descrito em Souza et al, 2023. Os *primers* utilizados foram desenhados a partir de uma sequência de CHIKV do genótipo ECSA, isolada a partir de um mosquito *Ae. aegypti* coletado em Sergipe em 20/04/2016 (GenBank KY055011) (Costa-Da-Silva et al., 2017) (a localização dos primers na sequência está disponível no **Anexo 2**).

Em resumo, os produtos de PCR foram purificados usando *beads* de purificação AmpureXP (Beckman Coulter, Reino Unido) e quantificados através do ensaio de Qubit dsDNA High Sensitivity no instrumento Qubit 3-0 (Life Technologies, EUA). Os amplicons de cada amostra foram normalizados, agrupados e codificados em barras usando o kit Rapid Barcoding Kit 96 (EXP-NBD 196, Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Em seguida, as bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando o kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) e carregadas em uma célula de fluxo R9-4-1 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Após o sequenciamento, os arquivos no formato FAST5 contendo os dados brutos de sinal do nanoporo foram transformados em FASTQ, demultiplexados e trimados através do Guppy versão 4-4-1 (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Em seguida, os dados FASTQ foram organizados por *barcodes*. Foi realizada uma triagem para retirar sequências de primers e adaptadores, para finalmente montar a sequência consenso de cada amostra, conforme descrito por Quick et al, 2017. Essas etapas acima mencionadas foram realizadas em parceria com o laboratório LEVE (UNICAMP).

4.6 Análise filogenética

Para observar a relação filogenética entre as sequências das amostras dos pacientes deste estudo com sequências do CHIKV de diferentes surtos e localidades, foi utilizado o gene codificante da glicoproteína E2.

Para isso, foram obtidas 92 sequências nucleotídicas do CHIKV de outros estados brasileiros, como também de diversos países e anos variados, na base de dados GenBank do NCBI por meio dos critérios de pesquisa: Chikungunya virus, genoma completo e ano de interesse.

As sequências adquiridas no GenBank foram obtidas em formato FASTA e nomeadas seguindo um determinado padrão (número de acesso no GenBank_Local de isolamento_ano), (**Apêndice 1**). Além dessas, uma sequência do vírus O'nyong nyong foi adicionada à análise com o objetivo de estabelecer o grupo externo da árvore filogenética.

Para a construção da árvore filogenética, todas as etapas seguintes foram realizadas através do MEGA versão 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021). Inicialmente, o conjunto de sequências nucleotídicas foram alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE, seguido da triagem das sequências na região da glicoproteína E2. Logo após, foram analisados os melhores modelos de reconstrução filogenética, e assim foi selecionado o modelo Tamura-Nei (BIC: 15032,45871). O método de Bootstrap com 1000 repetições foi aplicado, visando avaliar o nível de confiança dos clados.

4.7 Identificação de mutações nas proteínas do envelope

Para identificar mutações nas regiões codificantes das proteínas do envelope, inicialmente as sequências nucleotídicas desse estudo foram alinhadas com uma cepa de referência (Ross low psg, Tanzânia, Genbank HM045811) através do Muscle, implementado no MEGA versão 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

Em seguida, o arquivo no formato FASTA foi submetido no servidor *insite* (disponível em <http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/DIVEIN/insites.html>) para a detecção das mutações nucleotídicas.

Para a detecção de mutações de aminoácidos, as sequências nucleotídicas das variantes alinhadas foi traduzida *in silico* no MEGA versão 11, e o arquivo FASTA dessa tradução foi visualizado no BioEdit versão 7.2.5.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

Foram obtidas 9 amostras de pacientes com FCHIK com o CT adequado para o sequenciamento. Todos os participantes selecionados residem na região metropolitana do Recife, com data de coleta entre julho de 2020 e outubro de 2021, e nenhum dos participantes tinham realizado viagem recente (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Características sociodemográficas e epidemiológicas das amostras de pacientes positivos com CHIKV durante o surto de 2021 na RMR, Pernambuco, Brasil.

PAC	Data de início dos sintomas	Fase	Data da coleta	Cidade	Idade	Sexo	Fez viagem recente?	Mora ou trabalha próximo a terreno baldio?
01	18/07/2020	Agudo	20/07/2020	Paulista	71	Masculino	Não	Não
02	23/05/2021	Agudo	24/05/2021	Recife	31	Masculino	Não	Sim
03	14/06/2021	Agudo	16/06/2021	Olinda	40	Masculino	Não	Não
04	06/08/2021	Agudo	09/08/2021	Recife	24	Masculino	Não	Sim
05	06/07/2021	Subagudo	19/08/2021	Recife	59	Feminino	Não	Sim
06	14/09/2021	Agudo	15/09/2021	Recife	47	Masculino	Não	Sim
07	26/09/2021	Agudo	27/09/2021	Olinda	20	Masculino	Não	Sim
08	20/06/2021	Crônico	27/09/2021	Olinda	37	Feminino	Não	Sim
09	26/10/2021	Agudo	29/10/2021	Recife	26	Masculino	Não	Não

Considera-se viagem recente as ocorridas nos últimos 30 dias que antecedem a coleta.

Dentre os 9 participantes, 33,3% residiam ou trabalhavam próximo a terreno baldio. Foram coletadas amostras entre o dia 1 e 99 após início dos sintomas, assim 77,8% tiveram sua amostra coletada na fase aguda, 11,1% na fase subaguda e 11,1% na fase crônica. 77,8% dos pacientes são do sexo masculino e 22,2% do sexo feminino, com idade média de ~39,4 anos.

As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados de anotações de sequências nucleotídicas NCBI para disponibilidade ao acesso público.

5.2 Análise filogenética

A análise filogenética sugere que as amostras do presente estudo estão incluídas no clado do genótipo ECSA. Com exceção das cepas de linhagem asiática, todas as amostras coletadas no Brasil estão incluídas no mesmo clado filogenético e

juntos a estas, estão posicionadas as cepas da Argentina (2016) e do Haiti (2016) (Figura 9).

Figura 9 - Árvore filogenética do CHIKV

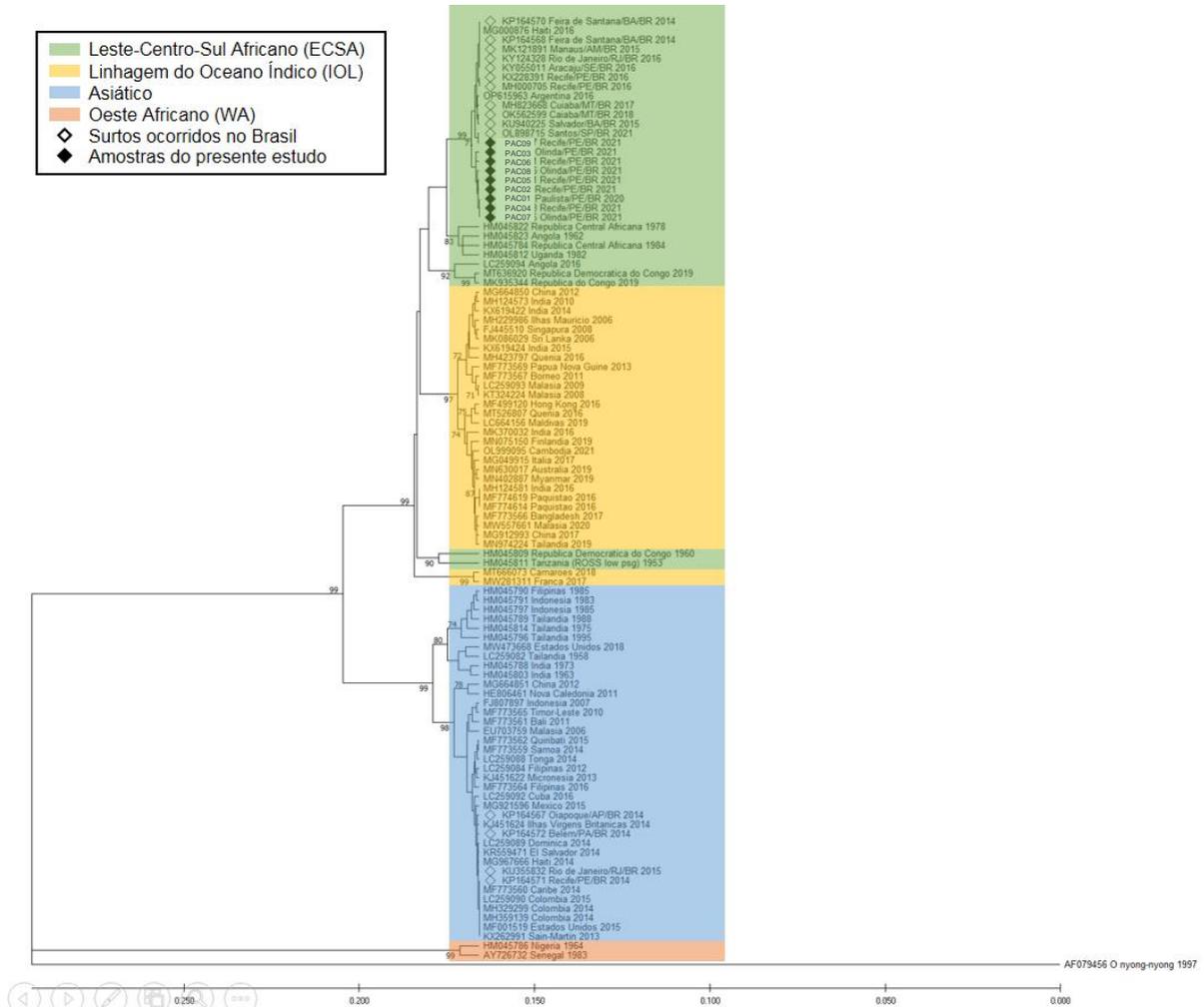


Figura 9: Árvore filogenética das cepas utilizadas no presente estudo. Na cor verde encontram-se as cepas do genótipo Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), em amarelo a Linhagem do Oceano Índico (IOL), a cor azul destaca as cepas asiáticas, enquanto em laranja são as do Oeste África (WA). Como grupo externo, encontra-se o O'nyong nyong. Destaca-se também as cepas brasileiras de outros surtos com um losango vazado, já com o losango na cor preta estão marcadas as amostras do estudo atual. As sequências utilizadas na construção da árvore filogenética foram extraídas do banco de dados genômico e a identificação no GenBank podem ser consultadas no **APÊNDICE 1**.

Nota-se também que todas as sequências deste estudo foram agrupadas em um único clado, com exceção da amostra PAC09, que está mais próxima da cepa de Santos (2021).

5.3 Mutações

Após a detecção do genótipo das variantes deste estudo, foi possível estabelecer a cepa de referência para a detecção de mutações.

Foi possível identificar 14 mutações presentes na região codificante das glicoproteínas do envelope viral (E1, E2 e E3), quando comparadas com HM045811 da Tanzânia de 1953 (**Figura 10**).

Figura 10 - Mutações de aminoácidos identificadas nas proteínas do envelope do CHIKV circulante na RMR durante os anos de 2020-2021.

	E3			E2									E1		
Posição na poliproteína	290	385	399	428	489	546	589	624	669	702	709	1020	1097	1114	
Posição na proteína	29	60	74	103	164	221	264	299	344	377	384	211	288	305	
Tanzânia (1953)	K	G	M	A	A	R	V	S	A	I	M	K	T	A	
PAC01	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC02	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC03	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC04	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC05	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC06	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC07	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC08	R	D	T	T	T	K	A	N	T	V	V	T	I	T	
PAC09	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	T	I	T	
Recife (2016) - MH000705	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	K	I	A	
Feira de Santana (2014) - KP164570	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	K	I	A	
Santos (2021)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	T	I	T	
Cuiabá (2018)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	N	I	A	
Cuiabá (2017)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	K	I	A	
Aracaju (2016)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	T	I	A	
Rio de Janeiro (2016)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	T	I	A	
Salvador (2015)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	K	I	A	
Manaus (2015)	R	D	T	T	T	K	V	N	T	V	V	-	-	-	
Oiapoque (2014)	K	D	M	A	A	K	V	N	T	I	V	E	T	A	
Recife (2014)	K	D	M	A	A	K	V	N	T	I	V	E	T	A	
Belém (2014)	K	D	M	A	A	K	V	N	T	I	V	E	T	A	
Rio de Janeiro (2015)	K	D	M	A	A	R	V	N	T	I	V	E	T	A	

Posição na poliproteína estrutural

Proteínas analisadas

E3

E2

E1

Genótipos

ECSA

Asiático

Diferenças entre 2016 e 2021 (Recife e RM)

* Variantes desse estudo

Em cinza, estão as posições na poliproteína, e logo abaixo as posições nas proteínas (E3 em roxo, E2 em laranja, E1 em magenta). A cepa de referência está destacada em preto. As variantes comparadas pertencem aos genótipos ECSA (verde) e asiático (azul). Em amarelo estão destacadas as mutações ocorridas entre as cepas de 2016 e 2020/2021.

5.3.1 Glicoproteína E3

Dentre as mutações, apenas uma mutação foi localizada na glicoproteína E3, localizada na posição 29, onde uma Lisina (K) é substituída por uma arginina (R), compondo assim a mutação E3-K29R. Esta mutação foi observada em todas as cepas brasileiras pertencentes ao genótipo ECSA. Essa substituição também está presente

nas sequências do Haiti de 2016 (GenBank: MG000876) e Argentina (GenBank: OP615963).

5.3.2 Glicoproteína E2

Das 14 mutações observadas, cerca de 70% (n = 10) estão localizadas em regiões da glicoproteína E2, sendo elas: E2-G60D, M74T, A103T, A164T, R221K, V264A, S299N, A244T, I377V, M384V.

As substituições dos aminoácidos nas posições E2-S299N e E2-A344T foram observadas em todas as cepas (com exceção da HM045811) do CHIKV que compõem a árvore filogenética, sinalizando que ocorreu. As mutações E2-G60D e E2-M384V foram detectadas em todas as cepas brasileiras, de ambos os genótipos, estando presente também em diversas cepas analisadas na árvore filogenética. Semelhantemente, a substituição E2-R221K também é observada nas cepas brasileiras, com exceção da variante do Rio de Janeiro (GenBank: KU355832), como também na maioria das cepas utilizadas na árvore filogenética.

A mutação E2-I377V foi observada em diversas cepas de vários países, assim como está presente em todas as cepas brasileiras do genótipo ECSA analisadas. E paralelo a essa, a E2-V264A, identificada nas amostras (com exceção do REC767) também ocorre em outros países. Vale destacar que, de acordo com nossas análises, essas mutações não co-ocorrem em outras cepas, apenas nas variantes do presente estudo. A substituição na posição 264 de uma valina (V) por uma alanina (A) não foi encontrada na REC767.

Outras 3 mutações (E1-M74T, E1-A103T e E1-A164T) foram observadas em todas as cepas do Brasil pertencentes ao genótipo ECSA analisadas nesse estudo, e também constam nas cepas da Argentina e Haiti (2016).

5.3.3 Glicoproteína E1

Na proteína do envelope E1 foram identificadas 3 substituições de aminoácidos: K211T, T288I e A305T. A substituição detectada na posição 288, de treonina (T) para isoleucina (I), também ocorre em todas as cepas brasileiras analisadas pertencentes ao genótipo ECSA, como também nas cepas do Haiti (2016) e da Argentina (2016). A mutação E1-K211T também foi constatada nas cepas do presente estudo e é compartilhada apenas com as cepas de Aracaju (KY055011), Rio

de Janeiro (KY124328) e de Santos (OL898715). Já a E1-A305T é compartilhada apenas com a cepa de Santos/SP, cuja coleta foi realizada no mesmo ano do surto desse estudo (2021).

Uma limitação do estudo foi a ocorrência de um erro no processo de anelamento dos primers, a proteína E1 não foi completamente sequenciada, portanto apenas 3 mutações foram identificadas. Especula-se que essa falha tenha sido em decorrência de alguma mutação presente exatamente no local em que os primers se anelariam, o que resultou no não anelamento e, conseqüentemente, o gene não foi devidamente sequenciado, parando na posição 335 da proteína E1 de todas as amostras utilizadas no presente estudo. Em vista disso, faz-se necessário o desenvolvimento de um estudo complementar com o objetivo de identificar mutações na região não sequenciada do gene da proteína E1 do CHIKV em circulação na RMR.

5.3.4 Diferenças entre as cepas de Recife (2016) e a do presente estudo (2021)

Ao comparar as variantes do presente estudo com uma cepa coletada em Recife durante onda epidêmica ocorrida em 2016, observa-se que as mutações E2-V264A, E1-K211T e E1-A305T só ocorreram na segunda onda epidêmica (2021). No vírus isolado durante o primeiro surto de casos no estado, o vírus circulante apresentava os aminoácidos selvagens nas posições E2-264, 211 e 305 da E1.

Vale destacar que nos isolados de 2020 e 2021 (presente estudo), as mutações E2-V264A e E1-K211T ocorrem simultaneamente em 8 variantes e que a E2-V264A foi relatada recentemente em isolados de 2020 do Brasil, também do ECSA.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou a identificação das mutações presentes nas proteínas do envelope (E1, E2 e E3) do vírus Chikungunya circulante na região metropolitana de Recife, no estado de Pernambuco, durante os anos de 2020 e 2021. As proteínas do envelope estão mais suscetíveis a sofrerem mutações de importância biológica, visto que interagem com receptores do organismo vetor e do hospedeiro, podendo assim beneficiar o vírus.

Dentre as mutações identificadas, 10 estão localizadas no comprimento da proteína E2, o que pode ser explicado pela elevada pressão seletiva sofrida nessa região, uma vez que está diretamente ligada às relações com o organismo vetor e com o hospedeiro humano por meio da interação com os receptores de superfície celular (Smith et al., 1995; Zhang et al., 2018). Três das mutações observadas despertam curiosidade dentro das análises realizadas por não ser observadas também no isolado do Recife de 2016, sendo elas: a E1-A305T identificadas apenas nas cepas deste estudo e na de Santos/SP, como também a E2-V264A presente apenas em 8 cepas do estudo (não registrada no PAC09).

A proteína E3 é responsável pelo direcionamento das proteínas estruturais para o retículo endoplasmático durante o processo de replicação e atua também proporcionando proteção à proteína E1, evitando a fusão prematura durante o processo de formação do vírus (Lum; NG, 2015; Sjoberg; Garoff, 2003; Wu et al., 2008). A mutação E3-K29R identificadas em todas as cepas brasileiras do ECSA, no Haiti (MG000876) e Argentina (OP615963), de acordo com as pesquisas realizadas, não teve sua função relatada em estudos anteriores. O efeito resultante dessa substituição é desconhecido, sendo necessários estudos para determinar os possíveis impactos representados por ela.

Uma substituição de uma glicina (G) por uma aspartato (D) na posição 60 da proteína E2 também foi observada. Essa mutação é de grande importância dado o impacto biológico já descrito em estudos anteriores. Segundo a literatura, a mutação E2-G60D resulta num aumento da infectividade do CHIKV em células intestinais do *A. aegypti* (Tsetsarkin et al., 2009). A co-ocorrência da E2-G60D e E2-I211T leva ao aumento da infectividade do vírus Chikungunya em *A. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2009). A mutação E2-I211T não foi observada nas variantes deste estudo, apesar

disso a disseminação do CHIKV é bastante eficiente em todo o país, tendo em vista que o principal vetor do vírus no Brasil é o mosquito *A. aegypti*.

A mutação E2-M74T também não teve sua função descrita, porém já teve ocorrência relatada por Taniele-Silva (2021) (dados não publicados) em cepas de Alagoas/BR, ocorrendo também nas demais cepas do ECSA do Brasil e em alguns outros países analisados nesse estudo. Semelhantemente, a mutação E2-R221K foi relatada nas cepas de Alagoas e está presente também em outras cepas do Brasil, incluindo as do genótipo asiático. Estudos para determinar as consequências dessas substituições podem ser desenvolvidos. O mesmo ocorre com as mutações E2-S299N e E2-A344T, que já foram relatadas e estão presentes em todas as cepas utilizadas neste estudo, com exceção da Tanzânia 1953 (HM045811) e, apesar disso, não teve seu efeito detalhado.

No que diz respeito às mutações E2-A103T e E2-A164T, também há relatos de ocorrência tanto em nas cepas da linhagem ECSA do Brasil, como em surtos de outros países. A mutação E2-A103T, observada nas cepas brasileiras, foi descrita por (Cunha et al., 2017), como sendo exclusiva do Brasil. Porém, de acordo com as análises feitas, as cepas do Haiti (2016) e da Argentina também apresentam essa mutação, porém o impacto continua desconhecido. Já a E2-A164T é considerada uma assinatura molecular das cepas indianas (Arankalle et al., 2007), associada à E1-M269V. A E1-M269V não foi observada neste estudo, porém a E2-164 ocorre simultaneamente com E2-S299N e E2-A344T e está presente também em cepas indianas do genótipo ECSA.

A ocorrência da mutação E2-M384V foi observada em todas as cepas do Brasil e só foi relatada em um estudo com ocorrência simultânea com E2-S375T em cepas do genótipo asiático (Arankalle et al., 2007). Porém, nas análises foi verificado que cepas do ECSA apresentam a mutação na 384 sem a co-ocorrência da 375. Assim como a substituição E2-M384V, a E2-I377V também é observada em cepas asiáticas e ECSA, porém a recombinação genética entre as linhagens não foi evidenciada (Arankalle et al., 2007).

A substituição E1-T288I observada em todas as cepas do Brasil pertencentes ao genótipo ECSA já foi reportada em estudos anteriores, entretanto nenhum detalha seus efeitos (Pouriayevali et al., 2019). As cepas da Argentina e Haiti (2016) compartilham as mutações E3-K29R, E2-A103T e E1-T288I com cepas brasileiras,

incluindo todas utilizadas nesse estudo, isso pode sugerir uma origem comum entre as cepas.

Na proteína E1 foi observada uma mutação, a E1-A305T, que é compartilhada apenas com a cepa de Santos/SP (2021). Entretanto, já foi relatada em estudos anteriores, com ocorrência no Tocantins e no Rio de Janeiro (Fabri et al., 2020; Souza et al., 2022). O estudo com as cepas do Rio de Janeiro sugere que a mutação seja característica da epidemia de 2019 (Fabri et al., 2020), logo nossos resultados corroboram com essa hipótese.

Uma mutação na posição 211 da proteína E1 foi observada, E1-K211T, e foi reportada pela primeira vez em 2016, numa onda epidêmica ocorrida no Rio de Janeiro (Cunha et al., 2017) e destaca-se por ter sido detectada apenas nas variantes do estudo e nas cepas de Aracaju/SE, Santos/SP e Rio de Janeiro (2016), entretanto sua função não foi descrita até o momento. Por outro lado, outras substituições nessa mesma posição já foram caracterizadas, como a E1-K211N com efeito desconhecido (Arankalle et al., 2007; Hapuarachchi et al., 2010). Em contrapartida, a mutação E1-K211E foi responsável por proporcionar uma maior adaptabilidade do vírus Chikungunya aumentando a infecção, disseminação e transmissão em mosquito *A. aegypti* e quando acompanhada da mutação E2-V264A (que foi detectada nesse estudo) o impacto biológico é ainda maior, indicando um efeito sinérgico dessas mutações (Agarwal et al., 2016). Com isso, sugere-se que a posição 211 da proteína E1 é um sítio hiper variável.

Em 8 dos 9 isolados analisados neste estudo exibem a co-ocorrência da E2-V264A e E1-K211T. Assim, é fundamental que sejam realizadas pesquisas para elucidar os impactos dessas mutações e analisar se a ocorrência simultânea delas impactam as relações entre vírus, organismo vetor e hospedeiro humano, uma vez que não foram observados estudos que relatem a ocorrência dessas mutações em conjunto. Além disso, registros apontam a ocorrência dessa mutação em cepas do ECSA e IOL, em outros países, entretanto apenas um estudo foi encontrado com registro da substituição na E2-264 no país, com isolados que datam de janeiro a dezembro de 2020 (Xavier et al., 2023). Isso sugere que essa mutação (E2-V264A) tenha sido introduzida ao país em meados de 2019-2020.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o vírus circulante na Região Metropolitana do Recife – PE nos anos de 2020 e 2021 pertence ao genótipo ECSA e apresenta 14 mutações nas glicoproteínas do envelope (E1, E2 e E3) quando comparado ao genótipo do isolado da Tanzânia de 1953, a cepa ancestral de referência.

Foram identificadas mutações com impacto na competência vetorial já descrito na literatura. Além disso, é possível constatar também que o CHIKV circulante nos anos de 2020-2021 apresentou três novas mutações ao confrontar com isolados do surto de 2016 ocorrido em Pernambuco, o que pode explicar a segunda onda epidêmica ocorrida no estado.

Muitas das mutações observadas têm seu mecanismo de ação desconhecido, o que faz necessário o desenvolvimento de pesquisas, visando elucidar os efeitos dessas substituições na competência vetorial, bem como a necessidade de uma maior amostragem e análises genômicas, com o objetivo de avaliar o potencial epidêmico dessa variante do vírus Chikungunya.

Os dados obtidos nesse estudo reforçam a importância das pesquisas de epidemiologia molecular para a vigilância do surgimento de novas variantes do CHIKV em áreas endêmicas de arboviroses.

REFERÊNCIAS

- Agarwal, A. *et al.* Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. **Virology**, v. 497, n. 2, p. 59–68, out. 2016.
- Arankalle, V. A. *et al.* Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967–1976, 1 jul. 2007.
- Bala Murugan, S.; Sathishkumar, R. **Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* Elsevier (Singapore) Pte Ltd, , 1 out. 2016.
- Bordi, L. *et al.* Molecular Characterization of Autochthonous Chikungunya Cluster in Latium Region, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 178–180, jan. 2018.
- Brasil, M. Da S. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Brasília: [s.n.]. v. 2^a edição
- Carmo Silva, A. *et al.* Prevalence and epidemiological aspects of Chikungunya fever in states of the Northeast region of Brazil: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 241, mai. 2023.
- Chen, M. W. *et al.* Chikungunya virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase core domain displays detergent-sensitive primer extension and terminal adenylyltransferase activities. **Antiviral Research**, v. 143, p. 38–47, 1 jul. 2017.
- Chen, R. *et al.* Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 90, n. 23, p. 10600–10611, dez. 2016.
- Chhabra, M. *et al.* Chikungunya fever: A re-emerging viral infection *Indian Journal of Medical Microbiology*. **Medknow Publications and Media Pvt. Ltd**, , 1 jan. 2008.
- Chomposri, J. *et al.* Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9,

n. 1, p. 227, 2016.

Costa-da-Silva, A. L. *et al.* First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2017.

Cunha, M. S. *et al.* Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1737–1739, 1 out. 2017.

Da Silva Duarte, G. *et al.* Multicenter study of the natural history and therapeutic responses of patients with chikungunya, focusing on acute and chronic musculoskeletal manifestations – a study protocol from the clinical and applied research in Chikungunya (REPLICK network). **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 499, 28 jul. 2023.

De Figueiredo, M. L. G.; Figueiredo, L. T. M. Emerging alphaviruses in the americas: Chikungunya and mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

De Lima Cavalcanti, T. Y. V. *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses 2022, Vol. 14, Page 969**, v. 14, n. 5, p. 969, 5 maio 2022.

Delang, L. *et al.* The viral capping enzyme nsP1: A novel target for the inhibition of chikungunya virus infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–10, 2016.

Diallo, D. *et al.* Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern senegal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1–14, 2012.

Fabri, A. A. *et al.* Co-Circulation of Two Independent Clades and Persistence of CHIKV-ECSA Genotype during Epidemic Waves in Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 984, 26 nov. 2020.

Gao, Y. *et al.* Multiple roles of the non-structural protein 3 (nsP3) alphavirus unique domain (AUD) during Chikungunya virus genome replication and transcription. **PLoS**

Pathogens, v. 15, n. 1, 2019.

Gould, E. *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017.

Gratz, N. G. Critical review of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, p. 215–227, 2004.

Guthid, S. *et al.* Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008338, 1 ago. 2020.

Hahn, Y. S.; Strauss, E. G.; Strauss, J. H. Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 63, n. 7, p. 3142–50, 1 jul. 1989.

Hammon, W. M.; Rudnick, A.; Sather, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science (New York, N.Y.)**, v. 131, n. 3407, p. 1102–3, 15 abr. 1960.

Hapuarachchi, H. C. *et al.* Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: virological evidence from Sri Lanka and Singapore. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 4, p. 1067–1076, abr. 2010.

Hawman, D. W. *et al.* Mutations in the E2 Glycoprotein and the 3' Untranslated Region Enhance Chikungunya Virus Virulence in Mice. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, p. JVI.00816-17, 2017.

Holland Cheng, R. *et al.* Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. **Cell**, v. 80, n. 4, p. 621–630, 24 fev. 1995.

Kam, Y.-W. *et al.* Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. **Journal of Virology**, v. 86, n. 23, p. 13005–13015, 1 dez. 2012.

Karpe, Y. A.; Aher, P. P.; Lole, K. S. NTPase and 5'-RNA triphosphatase activities of chikungunya virus nsP2 protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

Khan, A. H. *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 1 dez. 2002.

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

Kuo, S. C. *et al.* Cell-based analysis of Chikungunya virus E1 protein in membrane fusion. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2012.

Lopes Marques, C. D. *et al.* Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 4, p. 101502, 1 ago. 2020.

Lum, F. M.; Ng, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–174, 2015.

Lumsden, W. H. R. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

Manzoor, K.N. *et al.* The global emergence of Chikungunya infection: An integrated view. **Medical Virology**, v. 32, n. 3, mai. 2022.

Mapalagamage, M. *et al.* Current Understanding of the Role of T Cells in Chikungunya, Dengue and Zika Infections. **Viruses 2022, Vol. 14, Page 242**, v. 14, n. 2, p. 242, 25 jan. 2022.

Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017**. [s.l.: s.n.].

Naveca, F. G. *et al.* Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007065, 2019.

Organização Mundial da Saúde. **Chikungunya**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chikungunya#tab=tab_1>

Organização Pan-Americana da Saúde. **Com o aumento de casos, especialistas analisam a propagação da Chikungunya nas Américas**. Mai. 2023.

Osterrieth, P.; Blanes-ridaura, G. [Research on the Chikungunya virus in the Belgian Congo. I. Isolation of the virus in upper Uele]. **Annales de la Societe belge de medecine tropicale (1920)**, v. 40, p. 199–203, 29 fev. 1960.

Pouriyaveali, M. H. *et al.* Imported cases of Chikungunya virus in Iran. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 27 nov. 2019.

Powers, A. M. N. N. M. *et al.* Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.

Quick, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature protocols** **12**, 1261–1276 (2017).

Rodger, L. M. An outbreak of suspected Chikungunya fever in Northern Rhodesia. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 35, p. 126–8, 18 fev. 1961.

Ross, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 02, p. 177–191, 15 jun. 1956.

Rougeron, V. *et al.* Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 64, p. 144–52, 2015.

Sahadeo, N. S. D. *et al.* Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017.

Saswat, T. *et al.* Epidemiological trends and molecular dynamics of dengue, chikungunya virus infection, coinfection, and other undifferentiated fever during 2015-2016 in Odisha, India. **Journal of Medical Virology**, n. August 2018, 2018.

Schnierle, B. S. **Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus***Viruses*, 2019.

Schuffenecker, I. *et al.* Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 23 maio 2006.

Schwartz, O.; Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causadas por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020**. Brasília-DF: [s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf>. Acesso em: 31 out. 2021.

Silva, L. A.; Dermody, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.

Silva, M. M. O. *et al.* Risk of chronic arthralgia and impact of pain on daily activities in a cohort of patients with chikungunya virus infection from Brazil. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 105, p. 608–616, 1 abr. 2021.

Simizu, B. *et al.* Structural proteins of Chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 51, n. 1, p. 254–8, 1984.

Simon, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, jul. 2015.

Singh, A. *et al.* Deciphering the dark proteome of Chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5822, 11 dez. 2018.

Singh, S. K.; Unni, S. K. Chikungunya virus: Host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, 2011.

Sjoberg, M.; Garoff, H. Interactions between the Transmembrane Segments of the Alphavirus E1 and E2 Proteins Play a Role in Virus Budding and Fusion. **Journal of Virology**, v. 77, n. 6, p. 3441–3450, 2003.

Smith, T. J. *et al.* Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10648–52, 7 nov. 1995.

Souza, U. J. B. De *et al.* Genomic Epidemiology Reveals the Circulation of the Chikungunya Virus East/Central/South African Lineage in Tocantins State, North Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2311, 21 out. 2022.

Souza, T. M. L. *et al.* Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 26 fev. 2019.

Strauss, J. H.; Strauss, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

Tanabe, E. L. De L. *et al.* Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. 0, p. 2016–2019, 2018.

Tharmarajah, K., Mahalingam, S., Zaid, A. Chikungunya: vaccines and therapeutics. **F1000Res**, v. 6, dez. 2017.

Trinta, K. S. *et al.* Detection of East/Central/South African genotype Chikungunya virus during an outbreak in a southeastern state of Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 16, p. 2056–2058, 2018.

Tsetsarkin, K. A. *et al.* A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

Tsetsarkin, K. A. *et al.* Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of Chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. Aegypti* mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6835, 31 ago. 2009.

Tsetsarkin, K. A. *et al.* Chikungunya virus: Evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 310–317, 2011.

Van Aalst, M. *et al.* Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8–22, jan. 2017.

Volk, S. M. *et al.* Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 1 jul. 2010.

Weaver, S. C.; Forrester, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, 2015.

Weaver, S. C.; Lecuit, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

Wu, S. R. *et al.* The dynamic envelope of a fusion class II virus: E3 domain of glycoprotein E2 precursor in semliki forest virus provides a unique contact with the fusion protein E1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26452–26460, 26 set. 2008.

Xavier, J. *et al.* Increased interregional virus exchange and nucleotide diversity outline the expansion of chikungunya virus in Brazil. **Nature Communications** 2023 14:1, v. 14, n. 1, p. 1–12, 21 jul. 2023.

Zeller, H., Bortel, W. V., Sudre, B. Chikungunya: sua história na África e na Ásia e sua disseminação para novas regiões em 2013–2014. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, p. 436-440, 15 dez. 2016.

Zhang, R. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.

ANEXO 2

Localização dos pares de *primers* utilizados no sequenciamento, desenhados a partir da sequência GenBank KY055011.

	Início	Final	Nome	Sentido
1	8041	8063	CHIKV_new_27_LEFT	+
	8435	8457	CHIKV_new_27_RIGHT	-
2	8360	8382	CHIKV_new_28_LEFT	+
	8759	8780	CHIKV_new_28_RIGHT	-
3	8695	8717	CHIKV_new_29_LEFT	+
	9073	9095	CHIKV_new_29_RIGHT	-
4	9015	9037	CHIKV_new_30_LEFT	+
	9395	9417	CHIKV_new_30_RIGHT	-
5	9324	9344	CHIKV_new_31_LEFT	+
	9718	9740	CHIKV_new_31_RIGHT	-
6	9645	9667	CHIKV_new_32_LEFT	+
	10039	10061	CHIKV_new_32_RIGHT	-
7	9980	10002	CHIKV_new_33_LEFT	+
	10346	10368	CHIKV_new_33_RIGHT	-
8	10285	10306	CHIKV_new_34_LEFT	+
	10667	10689	CHIKV_new_34_RIGHT	-
9	10606	10631	CHIKV_new_35_LEFT	+
	10980	11001	CHIKV_new_35_RIGHT	-
10	10886	10908	CHIKV_new_36_LEFT	+
	11319	11341	CHIKV_new_36_RIGHT	-

APÊNDICE 1

Código Genbank, ano e localidade das cepas utilizadas para análise filogenética

GenBank	Ano	Local
LC259094	2016	Angola
HM045823	1962	Angola
OP615963	2016	Argentina
MN630017	2019	Austrália
MF773561	2011	Bali
MF773566	2017	Bangladesh
MF773567	2011	Borneo
OL898715	2021	Santos/SP/BR
OK562599	2018	Cuiabá/MT/BR
MH823668	2017	Cuiabá/MT/BR
KX228391	2016	Recife/PE/BR
KY055011	2016	Aracaju/SE/BR
KY124328	2016	Rio de Janeiro/RJ/BR
MH000705	2016	Recife/PE/BR
KU355832	2015	Rio de Janeiro/RJ/BR
KU940225	2015	Salvador/BA/BR
MK121891	2015	Manaus/AM/BR
KP164567	2014	Oiapoque/AP/BR
KP164568	2014	Feira de Santana/BA/BR
KP164570	2014	Feira de Santana/BA/BR
KP164571	2014	Recife/PE/BR
KP164572	2014	Belém/PA/BR
MT666073	2018	Camarões
OL999095	2021	Cambodja
MF773560	2014	Caribe
MG912993	2017	China
MG664850	2012	China
MG664851	2012	China
LC259090	2015	Colômbia
MH329299	2014	Colômbia
MH359139	2014	Colômbia
LC259092	2016	Cuba
LC259089	2014	Dominica
KR559471	2014	El Salvador
MW473668	2018	EUA
MF001519	2015	EUA
MF773564	2016	Filipinas
LC259084	2012	Filipinas
HM045790	1985	Filipinas

MN075150	2019	Finlândia
MW281311	2017	França
MG000876	2016	Haiti
MG967666	2014	Haiti
MF499120	2016	Hong Kong
MH229986	2006	Ilhas Maurício
KJ451624	2014	Ilhas Virgens Britânicas
FJ807897	2007	Indonésia
HM045797	1985	Indonésia
HM045791	1983	Indonésia
MH124581	2016	Índia
MK370032	2016	Índia
KX619424	2015	Índia
KX619422	2014	Índia
MH124573	2010	Índia
HM045788	1973	Índia
HM045803	1963	Índia
MG049915	2017	Itália
MW557661	2020	Malásia
LC259093	2009	Malásia
KT324224	2008	Malásia
EU703759	2006	Malásia
LC664156	2019	Maldivas
MG921596	2015	México
KJ451622	2013	Micronésia
MN402887	2019	Myanmar
HM045786	1964	Nigéria
HE806461	2011	Nova Caledônia
MF773569	2013	Papua Nova Guiné
MF774614	2016	Paquistão
MF774619	2016	Paquistão
MH423797	2016	Quênia
MT526807	2016	Quênia
MF773562	2015	Quiribati
HM045784	1984	República Central Africana
HM045822	1978	República Central Africana
MT636920	2019	República Democrática do Congo
HM045809	1960	República Democrática do Congo
MK935344	2019	República do Congo
KX262991	2013	Sain-Martin
MF773559	2014	Samoa
AY726732	1983	Senegal
FJ445510	2008	Singapura
MK086029	2006	Sri Lanka

MN974224	2019	Tailândia
HM045796	1995	Tailândia
HM045789	1988	Tailândia
HM045814	1975	Tailândia
LC259082	1958	Tailândia
HM045811	1953	Tanzânia (ROSS low psg)
MF773565	2010	Timor-Leste
LC259088	2014	Tonga
HM045812	1982	Uganda
AF079456	2004	O'nyong nyong