

Nathalia Arruda Camara Carraio

**Caracterização Genotípica e Fenotípica de Isolados
Brasileiros do Vírus Mayaro**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas: Microbiologia
e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

JULHO / 2023

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Iranaia Assunção Miranda e coorientação de Mariana Oliveira Lopes da Silva.

CIP - Catalogação na Publicação

C312c Carraio, Nathalia Arruda Camara
Caracterização Genotípica e Fenotípica de Isolados
Brasileiros do Virus Mayaro / Nathalia Arruda Camara
Carraio. -- Rio de Janeiro, 2023.
75 f.

Orientadora: Iranaia Assunção Miranda.
Coorientadora: Mariana Oliveira Lopes da Silva.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Virus Mayaro. 2. Cepas Circulantes. 3.
Genótipos. 4. Patogênese. I. Miranda, Iranaia
Assunção, orient. II. Oliveira Lopes da Silva,
Mariana, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Nathalia Arruda Camara Carraio**
DRE: 119017536

BANCA EXAMINADORA: Profa. Luciana Jesus da Costa (Presidente)
Dr. Fábio Luís Lima Monteiro
Profa. Renata Campos Azevedo
Profa. Alessandra D'Almeira Filardy (Suplente)

Título da Monografia: **“Caracterização Fenotípica e Genotípica de Isolados
Brasileiros do Vírus Mayaro”**

Local: **Sala II da Pós Graduação (sala vermelha) / IMPG / CCS / UFRJ**
Data e hora de início: **07 de julho de 2023 às 9:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de julho de 2023.

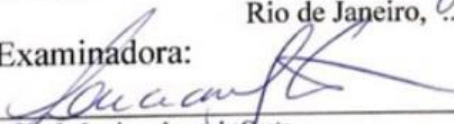
NOTA

9,5


9,5

9,5

Banca Examinadora:


Profa. Luciana Jesus da Costa


Dr. Fábio Luís Lima Monteiro

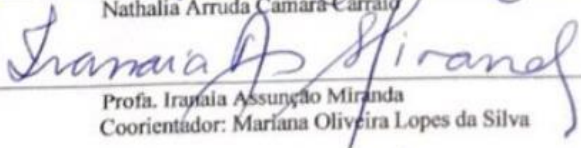

Profa. Renata Campos Azevedo

Profa. Alessandra D'Almeira Filardy

Aluno:


Nathalia Arruda Camara Carraio

Orientador:


Profa. Iranai Assunção Miranda
Coorientador: Mariana Oliveira Lopes da Silva

Coordenador
de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Dedico este trabalho a todas as pessoas
que me incentivaram e ajudaram a realizá-lo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que se faz presente em todos os meus momentos. AquEle que é digno de toda honra e é o provedor de todas as bênçãos na minha vida. Um Deus de detalhes que realiza sonhos além dos meus, me fazendo ser completamente feliz por esse processo, desde o início da graduação até o término dela. Sou grata pelo Seu infinito amor que me fez persistir e não duvidar, por nenhum instante, de que estou no caminho certo. Agradeço a Ele por me conceder a dádiva de poder testemunhar a Sua maravilhosa obra, a vida.

Agradeço aos meus pais, Jobson e Gilmar, e meu irmão Pedro, que são essenciais em todo o meu sucesso. Aqueles que são os primeiros a me apoiar e incentivar a ser sempre a minha melhor versão. Não há como agradecer à altura tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Muito além de apoio financeiro e emocional, obrigada por acreditarem nesse sonho e por confiarem em mim, mesmo precisando descrever o que eu estudava por diversas vezes rs. O amor de vocês é a chave para eu sonhar cada vez mais alto e ir atrás de realizar cada sonho, na certeza de que estarão comigo. Essa conquista não é só minha, é nossa!

Sou grata pela minha família sanguínea, meus avós, meus tios e meus primos. É muito gratificante quando vocês confiam em mim e tiram suas dúvidas científicas comigo. Agradeço por todo apoio, em especial ao período de pandemia, em que meus tios estiveram me cedendo um lar temporário para não ser infectada pelo vírus SARS-CoV-2 e não parar de estudar. Vocês me impulsionam a ir além, através dos seus exemplos. É uma honra poder pertencer a esse laço.

Ao meu parceiro da vida, Thomás, pois ele é mais que um namorado, é o meu melhor amigo. Aquele que chegou na minha vida quando eu já estava na faculdade, mas foi importantíssimo para a minha manutenção nela. Sou grata por ter você sonhando comigo, por todo carinho, por toda paciência e por todo incentivo. Com certeza, eu não teria chegado aqui sem a sua contribuição. Você tem um dos corações mais bonitos que já conheci e receber o seu amor é algo incrível. Isso aqui é só o começo da nossa história! Te amo Thoto!

Aos meus amigos da vida, dignos de serem mencionados, Camilla, Danillo, Gabriele, Isabela, Larissa, Leticia, Louise, Matheus, Tatiane e Thais. Não importa onde e nem em que momento a gente tenha se conhecido, carregarei a amizade de vocês por onde eu for, ou vocês forem. Vocês são incríveis e me ajudaram a estar aqui. Obrigada por me mostrarem na prática o que Salomão descreveu em Provérbios 18:24: “O homem que tem muitos amigos pode congratular-se, mas há amigo mais chegado do que um irmão”. Privilégio ter vocês comigo! Em especial, a minha cunhada Carolina, que além de minha melhor amiga e quase companheira

de profissão, escolheu pertencer a minha família se casando com meu irmão. Você é a pessoa mais iluminada que eu conheço e ter o seu apoio e o seu carinho é uma honra. À minha prima/irmã Bruna, nossa relação é além do sangue e ter a sua amizade, desde o dia em que nasci, mostra o quanto Deus é bondoso comigo. Eu não seria metade do que sou hoje sem você.

Às pessoas maravilhosas que conheci na UFRJ, meu grupo secreto, Bia, Carol, Isa, Jac, Lili, Raquel e Vitória, a nossa cumplicidade foi quase instantânea no primeiro dia de aula e foi se consolidando de forma única. Obrigada por todos os momentos de alegria genuína, em que voltava a rir como criança com vocês, por toda busca pelo açaí perfeito no CCS (não encontramos rs), pelas vídeos chamadas para estudar, por não odiar tanto trabalho em grupo, pelos amigos secretos de todo ano, Trentos, filas do bandeirão, filas do microondas, sonecas no CA, sonecas no bloco N, choros, picolés... Guardarei cada lembrança de maneira especial. Minha quadrilha, vocês são incríveis e me fazem sentir segurança na amizade de vocês. Estarei sempre apoiando e torcendo por todas vocês, pois sei que vão longe. Dizem que as amizades que mais duram são formadas na faculdade, tenho certeza de que levarei vocês para a vida!

Ao pessoal do LaRIV, Ana Carolina, Daniel, Iris, Leonardo, Lianna, Luiza Mendes, Luiza Limongi, Mariana, Renan e Rômulo. As pessoas mais brabas da ciência e que eu admiro demais. Obrigada por me receberem tão bem, por cada ajuda no laboratório e na vida, por cada conselho e por todas as resenhas. Vocês são sensacionais e, com toda certeza, me inspiram a continuar amando fazer ciência. Mais do que parceiros de laboratório, vocês são meus amigos e sou grata por serem vocês!

Eu não poderia deixar de destacar a participação da pessoa mais altruísta que eu conheci, aquela que, trabalho é seu sobrenome e é 100% atos de serviço na forma de demonstrar amor. Mariana, Mari, ou “Mary Jane”, sou privilegiada por te ter como minha coorientadora nesse período. Obrigada pelo seu carinho! Você me inspira e espero um dia poder ser conhecida como “a filha da Mari”, na ciência.

Agradeço à minha orientadora, Iranaia Miranda, que é uma mãe da ciência para todos nós. Obrigada pelo carinho, por sempre extrair o máximo de mim e por todo conhecimento adquirido com as nossas conversas. O seu amor pela ciência me inspira a querer trilhar o mesmo caminho e a não desistir dele. É um privilégio fazer parte dos Mirandinhas!

Agradeço a colaboração do Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, da Faculdade de Medicina São José do Rio Preto, e a Prof^ª. Dr^ª. Roberta Vieira De Moraes Bronzoni, da

Universidade Federal de Mato Grosso, por enviarem os isolados clínicos de Mayaro para a realização do presente estudo.

Ademais, agradeço ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés, a equipe que o compõe, e a Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo conhecimento e ensino. As agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ que viabilizaram a realização do trabalho. E a banca pelo carinho em aceitar o convite e a disponibilidade para compartilharmos desse momento tão especial para mim, juntos.

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração[...].”

-Colossenses 3:23

RESUMO

NATHALIA ARRUDA CAMARA CARRAIO

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS MAYARO

Orientador: Iranaia Assunção Miranda

Coorientador: Mariana Oliveira Lopes da Silva

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Mayaro (MAYV) é classificado como Alfavírus Artrítogênico devido à indução de mialgia e artralgia incapacitante. Circula em ciclo silvestre, sendo endêmico em regiões florestais da América do Sul e Central. No entanto, mesmo com a subnotificação de casos de MAYV, surtos em áreas urbanas têm sido relatados, envolvendo dois genótipos distintos: o de circulação disseminada (D) e o de circulação limitada (L). Este estudo visou comparar genotipicamente e fenotipicamente diferentes cepas de MAYV isoladas de surtos urbanos no Brasil: MAYV SINOP (L) e MAYV ACRE (D). Como referência à circulação original do MAYV, usamos a cepa MAYV ATCC (D) isolada em Trinidad e Tobago, 1954. Todos foram propagados em células de artrópode (C636) e células de mamífero (Vero). O alinhamento das sequências genômicas demonstrou que isolados do mesmo genótipo apresentaram cerca de 97% de identidade nucleotídica e 87% entre genótipos diferentes, refletindo em diferenças de aminoácidos, principalmente nas proteínas de envelope E1 e E2, além de regiões de inserção e deleção nucleotídica no gene correspondente a proteína NsP3. No ensaio de formação de placa em células Vero, ACRE induziu uma área de placa menor em relação a placa formada pelos isolados ATCC e SINOP, indicando que possui menor capacidade de disseminação. Na replicação viral em células C2C12 (mioblastos murinos), por isolados propagados em células C636, ATCC e SINOP apresentam replicação semelhante em mioblastos e miotubos, enquanto ACRE apresentou menor amplificação viral nestes modelos celulares em relação aos demais isolados. A infecção de miotubos C2C12, por isolados propagados em células Vero, apresentou maior replicação viral para ATCC e semelhante para ACRE e SINOP. No entanto, em todas as condições, apesar de apresentar carga viral semelhante em 48 hpi, a viabilidade celular dos mioblastos e miotubos infectados se manteve acima de 90% para o ACRE propagado em ambas as células. Estes achados sugerem que a cepa do ACRE apresenta um fenótipo atenuado. A infecção subcutânea de ATCC e SINOP (C636) na pata traseira esquerda de camundongos SV129 de 12 dias de idade demonstrou: maior inchaço da pata; redução do ganho de peso; morte precoce; e maior replicação viral em tecidos musculares, patas, joelhos e cérebro em

camundongos infectados com SINOP em comparação a camundongos infectados com o ATCC. Isso pode indicar que o SINOP (L) apresenta um fenótipo mais virulento, determinado pelas diferenças genóticas entre os MAYVs. Nossos achados contribuem para a compreensão da doença induzida por diferentes linhagens de MAYV e demonstram diferenças entre o modelo de pesquisa desse vírus em relação às cepas circulantes no Brasil.

Palavras-chave: Vírus Mayaro; Genótipo; Patogênese.

ABSTRACT**NATHALIA ARRUDA CAMARA CARRAIO****CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE ISOLADOS
BRASILEIROS DO VÍRUS MAYARO****Orientador: Iranaia Assunção Miranda****Coorientador: Mariana Oliveira Lopes da Silva**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Mayaro virus (MAYV) is classified as an Arthritogenic Alphavirus due to the induction of myalgia and disabling arthralgia. It circulates in a wild cycle, being endemic in forest regions of South and Central America. However, even with the underreporting of MAYV cases, outbreaks in urban areas have been reported, involving two distinct genotypes: disseminated circulation (D) and limited circulation (L). This study aimed to compare genotypically and phenotypically different strains of MAYV isolated from urban outbreaks in Brazil: MAYV SINOP (L) and MAYV ACRE (D). As a reference to the original circulation of MAYV, we use the MAYV ATCC strain (D) isolated in Trinidad and Tobago, 1954. All were propagated in arthropod cells (C636) and mammalian cells (Vero). The alignment of genomic sequences showed that isolates of the same genotype had about 97% of nucleotide identity and 87% between different genotypes, reflecting on differences in amino acids, mainly in the E1 and E2 envelope proteins, in addition to nucleotide insertion and deletion regions in the gene corresponding to Nsp3 protein. In the plaque formation assay in Vero cells, ACRE induced a smaller plaque area compared to the plaque formed by the ATCC and SINOP isolates, indicating that it has a lower dissemination capacity. In viral replication in C2C12 cells (murine myoblasts), by isolates propagated in C636 cells, ATCC and SINOP showed similar replication in myoblasts and myotubes, while ACRE showed lower viral amplification in these cell models compared to the other isolates. Infection of C2C12 myotubes, by isolates propagated in Vero cells, showed greater viral replication for ATCC and similar for ACRE and SINOP. However, in all conditions, despite having a similar viral load at 48 hpi, the cell viability of infected myoblasts and myotubes remained above 90% for ACRE propagated in both cells. These findings suggest that the ACRE strain has an attenuated phenotype. Subcutaneous infection of ATCC and SINOP (C636) in the left hind paw of 12-day-old SV129 mice demonstrated: increased paw swelling; reduced weight gain; early death; and greater viral replication in muscle tissues, paws, knees and brain in mice infected with SINOP compared to mice infected with ATCC. This may indicate that SINOP(L) has a more virulent phenotype, determined by genotypic differences between MAYVs. Our findings contribute to the understanding of the disease induced by different MAYV strains and demonstrate differences between the research model of this virus in relation to the strains circulating in Brazil.

Key-words: Mayaro Virus; Genotype; Pathogenesis.

RESUMO PARA LEIGOS

NATHALIA ARRUDA CAMARA CARRAIO

CARACTERIZAÇÃO DAS DIFERENÇAS GENÔMICAS E DE VIRULÊNCIA DO VÍRUS MAYARO ENCONTRADO EM PACIENTES BRASILEIROS

Orientador: Iranaia Assunção Miranda

Coorientador: Mariana Oliveira Lopes da Silva

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Mayaro (MAYV) é um vírus transmitido por mosquitos (arbovírus) que induz uma doença marcada por fortes dores musculares e nas articulações, dificultando a rotina dos pacientes. Este vírus circula em áreas de florestas das Américas do Sul e Central, sendo encontrado em regiões do Norte e Centro-Oeste do Brasil. A falta de testes de diagnósticos rápidos, os sintomas semelhantes a outras doenças conhecidas, como Dengue, e o acesso limitado à saúde pública pela população dessas regiões, dificultam a notificação de novos casos de MAYV. No entanto, mesmo com a subnotificação de casos, MAYV tem sido encontrado com mais frequência nos últimos anos devido ao aumento de estudos de monitoramento de outros arbovírus. Esse trabalho visou caracterizar diferenças no genoma e a capacidade de causar doença entre os MAYVs encontrados em um paciente do ACRE e outro de SINOP (Mato Grosso), comparando com o MAYV encontrado pela primeira vez no mundo, ATCC. Através da análise da sequência genômica desses MAYVs encontramos diferenças entre eles nos genes das proteínas virais responsáveis pelo processo de entrada do vírus nas células hospedeiras e de replicação viral. Quando avaliamos a capacidade desses vírus de infectar células vizinhas, percebemos que o MAYV do ACRE infectava menos células que os outros MAYVs. Comparado a isso, na infecção de células do músculo de camundongos (C2C12), o vírus ATCC e SINOP demonstraram maior replicação viral induzindo mais morte das células infectadas que o vírus do ACRE, demonstrando que este é um vírus mais brando. Posteriormente, avaliamos a doença causada pelos vírus ATCC e SINOP em camundongos de 12 dias de vida. Curiosamente, o vírus SINOP provocou maior debilidade nos animais e maior carga viral em tecidos musculares e articulares comparado ao vírus ATCC. Com isso, demonstramos previamente que o vírus SINOP apresenta grande capacidade de se replicar em células musculares e causar uma doença severa em animais. Juntos, nossos achados contribuem para a compreensão da doença induzida por MAYV e demonstram diferenças entre o modelo de pesquisa desse vírus (ATCC) em relação às cepas circulantes no Brasil.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
RESUMO PARA LEIGOS.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Vírus Mayaro.....	1
1.2 Estrutura e replicação do MAYV	6
1.3 Filogenia.....	9
1.4 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo MAYV	11
1.5 Patogênese do MAYV	12
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVO	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Linhagens Celulares	21
4.2 Vírus	21
4.2.1 Isolados Clínicos	21
4.2.2 Propagação dos Estoques de MAYV	22
4.3 Quantificação Viral	22
4.4 Alinhamento de Sequências Nucleotídicas	23
4.5 Ensaio de Placa de Lise	23
4.6 Replicação em Mioblastos murinos C2C12	24
4.7 Replicação em Miotubos murinas C2C12.....	24
4.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular das células C2C12 infectadas.....	24
4.8 Comitê de ética para análise experimental in vivo.....	25
4.9 Modelo animal.....	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Os isolados de MAYV apresentam diferenças entre as sequências nucleotídicas e nas sequências de aminoácidos nas regiões correspondentes as proteínas E1 e E2	26
5.2 A região correspondente a uma proteína do complexo replicativo viral apresenta alterações entre as três sequências de isolados	32

5.3 O isolado ACRE induz menor área de placa de lise indicando menor capacidade de disseminação.....	34
5.4 Os MAYV ATCC e SINOP apresentam replicação viral semelhante em mioblastos C2C12.....	34
5.5 A viabilidade celular dos mioblastos C2C12 se mantém acima de 80% em todas as condições de infecção com os isolados de MAYV propagadas em células C636	35
5.6 Os apresentam diferenças na capacidade de replicação em miotubos C2C12	36
5.7 A infecção por isolados recentes de MAYV induz menor redução da viabilidade dos miotubos C2C12 em relação ao ATCC	38
5.8 O isolado SINOP, do genótipo L, apresenta maior virulência em modelo experimental de camundongos	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
8 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus pertencente à família *Togaviridae*, do gênero *Alphavirus*, e induz uma doença debilitante determinada pela persistência dos sintomas de artralgia e mialgia. Por essa causa, é classificado como alfavírus artritogênico (Mendes e Kuhn, 2018). Sua transmissão ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos vetores culicídeos silvestres, restrito às regiões de florestas (Esposito e Fonseca, 2017). Com isso, o MAYV é encontrado em áreas rurais nas Américas do Sul e Central e em regiões da Bacia Amazônica, com a maior número de casos registrados no Brasil (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Caicedo *et al.*, 2021).

Os alfavírus são divididos em três clados principais, devido à proximidade filogenética encontrada na sequência da proteína E1 e no genoma completo desses vírus, sendo eles: O complexo *Semliki Forest*; O da encefalite equina/Sindbis; e dos vírus aquáticos. O MAYV e outros alfavírus artritogênicos, como o vírus Chikungunya (CHIKV), vírus Una (UNAV), vírus O'nyong nyong (O'NNV) e vírus Ross River (RRV), fazem parte do Clado *Semliki Forest* (Figura 1) (Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015).

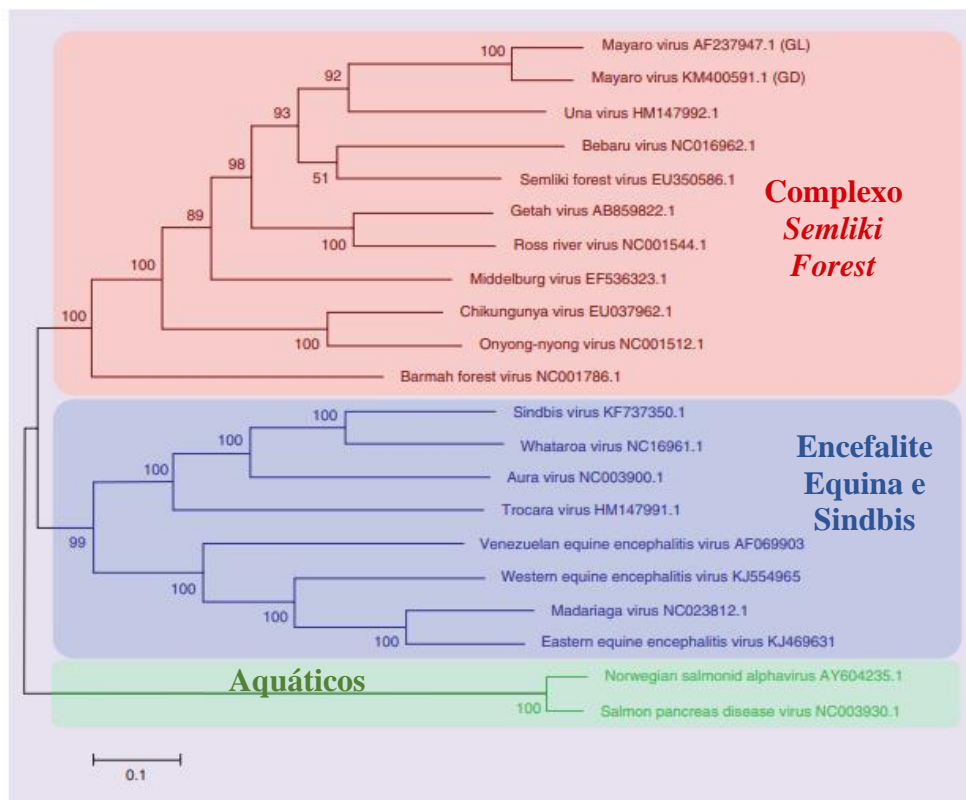


Figura 1: Árvore filogenética dos Alfavírus com base em 11 pb de genoma. O MAYV está presente dentro do clado Complexo *Semliki Forest* juntamente com os vírus CHIKV, UNAV e ONNV. A árvore filogenética foi

inferida pelo método estatístico de máxima verossimilhança. A barra de escala representa 0,02 substituições de nucleotídeos/por local/por ano. O bootstrap foi calculado com 1.000 réplicas e os valores (em porcentagem) são mostrados nos nós. Adaptado de: Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015.

A proximidade filogenética entre esses vírus permite que os conhecimentos sobre a biologia molecular possam ser compartilhados entre eles, uma vez que a falta de estudos sobre o MAYV pode ser suprida por estudos com os demais vírus desse clado (Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015). No entanto, vírus pertencentes a um mesmo clado apresentam alguns sítios antigênicos em comum, principalmente em IgG, resultando em consequente reatividade cruzada entre os soros imunes policlonais humanos, dificultando o diagnóstico preciso dessa arbovirose por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (Acosta-Ampudia, Monsalve *et al.*, 2018). Por consequência, pode ocorrer um aumento na subnotificação de casos de MAYV, dificultando o seu monitoramento em relação aos demais alfavírus. Outros motivos que podem levar a subnotificações de casos de MAYV estão relacionados com a proximidade dos sintomas apresentados com outros arbovírus, além da cocirculação nas mesmas regiões endêmicas, e circulação em regiões com dificuldades econômicas contendo acesso limitado da população a saúde pública (Esposito e Fonseca, 2017; Aguilar-Luis, Del Valle-Mendoza, *et al.*, 2020).

O MAYV foi isolado pela primeira vez em amostras sanguíneas de casos febris de cinco trabalhadores florestais em 1954, em Trinidad e Tobago (Anderson, Wattley, *et al.*, 1957) e identificado pela primeira vez no Brasil em 1955 nas proximidades do rio Guamá, em Belém do Pará (Causey e Maroja, 1962). Atualmente há registro de surtos esporádicos nas Américas, com apenas sete bem documentados que ocorreram no Brasil, Bolívia e Venezuela, entre 1954-2010 (Schaeffer, Lema, *et al.*, 1959; Azevedo, Silva, *et al.*, 2009; Auguste, Liria, *et al.*, 2015; Caicedo, Charniga, *et al.*, 2021).

Desde o primeiro isolamento do MAYV, casos esporádicos foram relatados em grande parte dos países da América do Sul e Central, como: Peru; Suriname; Guiana Francesa; Venezuela; Colômbia; Equador; Panamá; México; Bolívia; e Brasil (Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015). Embora a circulação autóctone seja na América Latina, diversos casos de infecções por MAYV na Europa e Estados Unidos foram detectados em turistas que retornaram de regiões endêmicas a partir de 1997, sendo classificados em casos importados (Receveur, Grandadam, *et al.*, 2010; Neumayr, Gabriel, *et al.*, 2012; Llagonne- Barets, *et al.*, 2016).

O principal vetor do MAYV é o mosquito selvagem *Haemagogus janthinomys*, comumente encontrado em florestas pluviais intocadas, mas este vírus pode ser transmitido por

outros gêneros de mosquitos, como *Sabethes* (Esposito e Fonseca, 2017), sendo mantido, principalmente, em ciclo silvestre, em aves e primatas não humanos (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). Estudos soroepidemiológicos identificaram a prevalência do MAYV em outros hospedeiros reservatórios, como marsupiais, preguiças, roedores, tamanduás e cutias, sugerindo a capacidade de disseminação, por vetores comuns, a diferentes potenciais hospedeiros (De Thoisy, Gardon, *et al.*, 2003; Mavian, Rife, *et al.*, 2017; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). O homem, no entanto, é considerado um hospedeiro acidental, entrando em contato com o vírus, esporadicamente, através da exploração do habitat dos hospedeiros silvestres. É possível que o estabelecimento da transmissão de MAYV em ambientes urbanos seja evidenciado, uma vez que se obtenham mutações necessárias para a disseminação em vetores urbanos, como os mosquitos do gênero *Aedes* (Mavian, Rife, *et al.*, 2017; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Migné, Moutailler, *et al.*, 2020; Torres-Ruesta, Chee, *et al.*, 2021). Um estudo experimental, de 2011, avaliou a competência vetorial do MAYV em mosquitos *Aedes aegypti*, e demonstrou que ele tem potencial de infectar mosquitos *Aedes aegypti* através de sangue artificial, porém mais eficientemente através de camundongos virêmicos. Além disso, apresenta potencial de ser transmitido por *Aedes aegypti* a camundongos lactentes, com títulos virais semelhantes a encontrados em humanos infectados, o que demonstra a capacidade dessa espécie de artrópode de manter um ciclo humano-mosquito-humano do vírus (Figura 2) (Long, Ziegler, *et al.*, 2011).

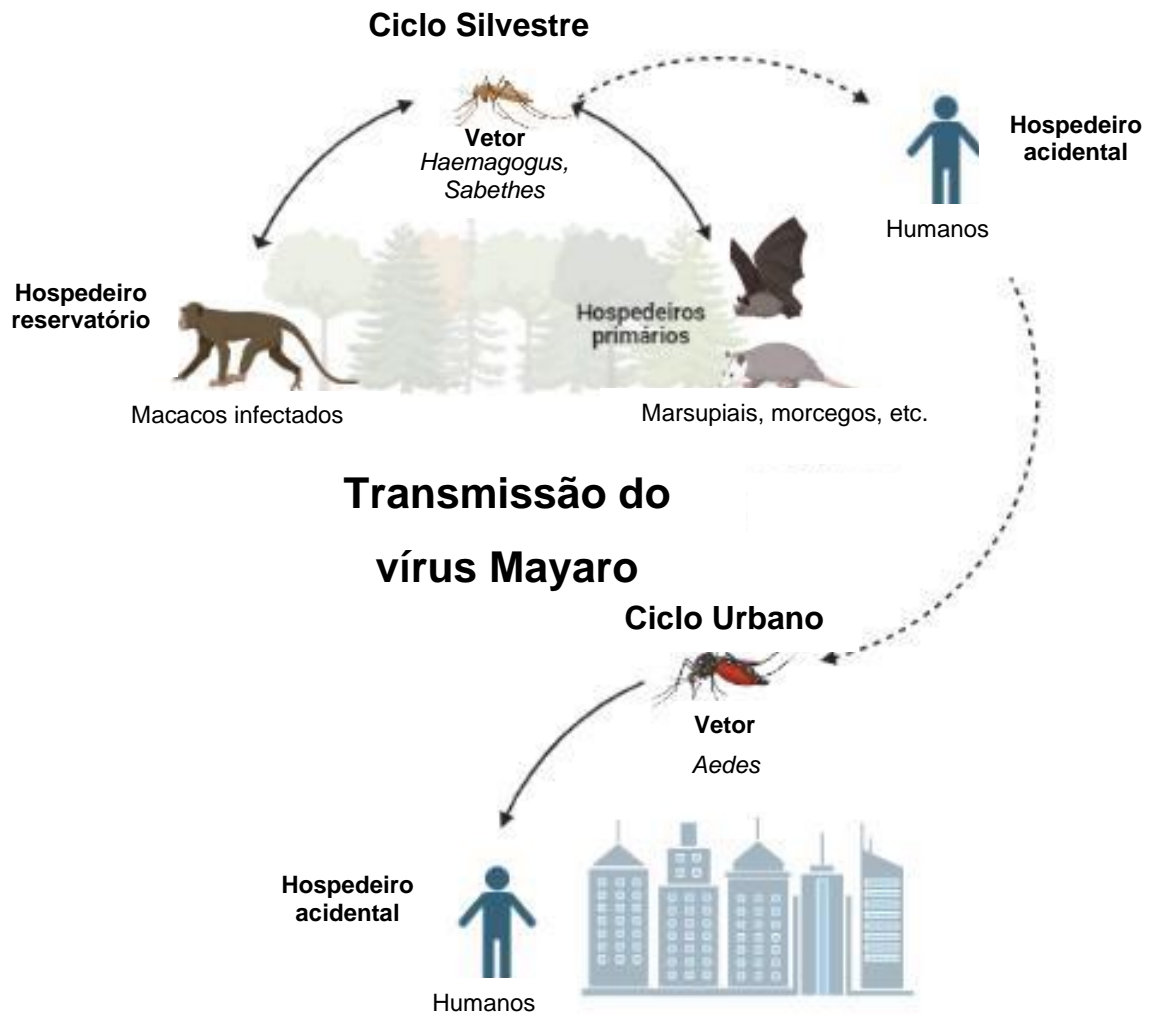


Figura 2: Ciclo de transmissão do MAYV. Ciclo silvestre apresentando macacos infectados com MAYV como principais reservatórios do vírus; mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores principais; e marsupiais, aves e outros mamíferos não humanos como hospedeiros primários em áreas florestais. Possível ciclo de infecções acidentais por humanos em contato com vetores silvestres, podendo representar reservatórios para carreamento do vírus para zonas urbanas. Ciclo urbano a partir de humanos infectados sendo picados por mosquitos urbanos, como *Aedes aegypti*, e transmitindo a outros humanos e hospedeiros acidentais em cidades. Esquema realizado no biorender. Imagem autoral baseada em: DIAGNE et al., 2020; De Thoisy, Gardon, et al., 2003; Migné, Moutailler, et al., 2020; Torres-Ruesta, Chee, et al., 2021; Santos, S.A.K., 2020.

A crescente expansão demográfica e, como consequente, aumento da exploração de áreas florestais, mudanças climáticas e o aumento de migrações humanas, possibilitam a vírus, antes de ciclos silvestres intocados, encontrar potenciais novos hospedeiros e desencadear ciclos replicativos em humanos. Tais vírus são chamados de emergentes e são, por muitas vezes, negligenciados em relação ao seu monitoramento, podendo promover ameaças globais (Llagonne- Baretts, et al., 2016; Hotez, Murray, 2017). A preocupação em torno da circulação do MAYV em ambientes urbanos é fundamentada no histórico de transmissão de outras

arboviroses de ciclo florestal que foram responsáveis por surtos recentes em grandes centros urbanos, como o vírus da Febre Amarela (YFV). Desde o século 18, YFV era responsável por epidemias devastadoras em centros urbanos nas Américas. No entanto, com a erradicação de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* entre 1940-1970, a circulação de YFV voltou a ser encontrada somente em ciclos florestais, com a infecção de humanos de forma acidental. A reintrodução do mosquito competente no território brasileiro, possibilitou a distribuição do vírus para as regiões Centro-Oeste, Sudeste, Sul e Nordeste. Mais recentemente, a epidemia de YFV em 2016, no Sudeste do Brasil, comprovou a transmissão do vírus por mosquitos do gênero *Aedes*, após mais de 70 anos, resultando em 79 mortes humanas na região da costa atlântica, altamente infestada por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (J. Erin Staples, Monath, 2008; Couto-Lima, Yoann Madec, *et al.*, 2017).

Nos últimos anos há maior frequência de detecção e registro de novo casos de infecção pelo MAYV (Mackay, Arden, 2016; Aguilar-Luis, Del Valle-Mendoza, *et al.*, 2020; Caicedo, Charniga, *et al.*, 2021). Novos surtos foram identificados, tanto em centros urbanos como em regiões florestais, dentre eles: 33 casos de MAYV diagnosticados em Manaus (AM), entre 2007 e 2008 (Mourão, Bastos *et al.*, 2012); 36 casos confirmados de Mayaro descritos em fevereiro de 2008 em Santa Bárbara, no estado do Pará (Azevedo, Silva, *et al.*, 2009); 16 casos notificados na Amazônia peruana, entre 2010 e 2013 (Halsey, Siles, *et al.*, 2013); e 15 casos diagnosticados no Mato Grosso durante a epidemia de dengue entre 2011 e 2012 (Zuchi, Heinen, *et al.*, 2014). Infecções por MAYV no Haiti, em 2015, indicam a provável circulação desse vírus no Caribe (Lednicky, Rochars, *et al.*, 2016). Mesmo com evidências do aumento da circulação de MAYV no mundo, não há dados relacionados com casos na África e nem na Ásia (Figura 3) (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020).

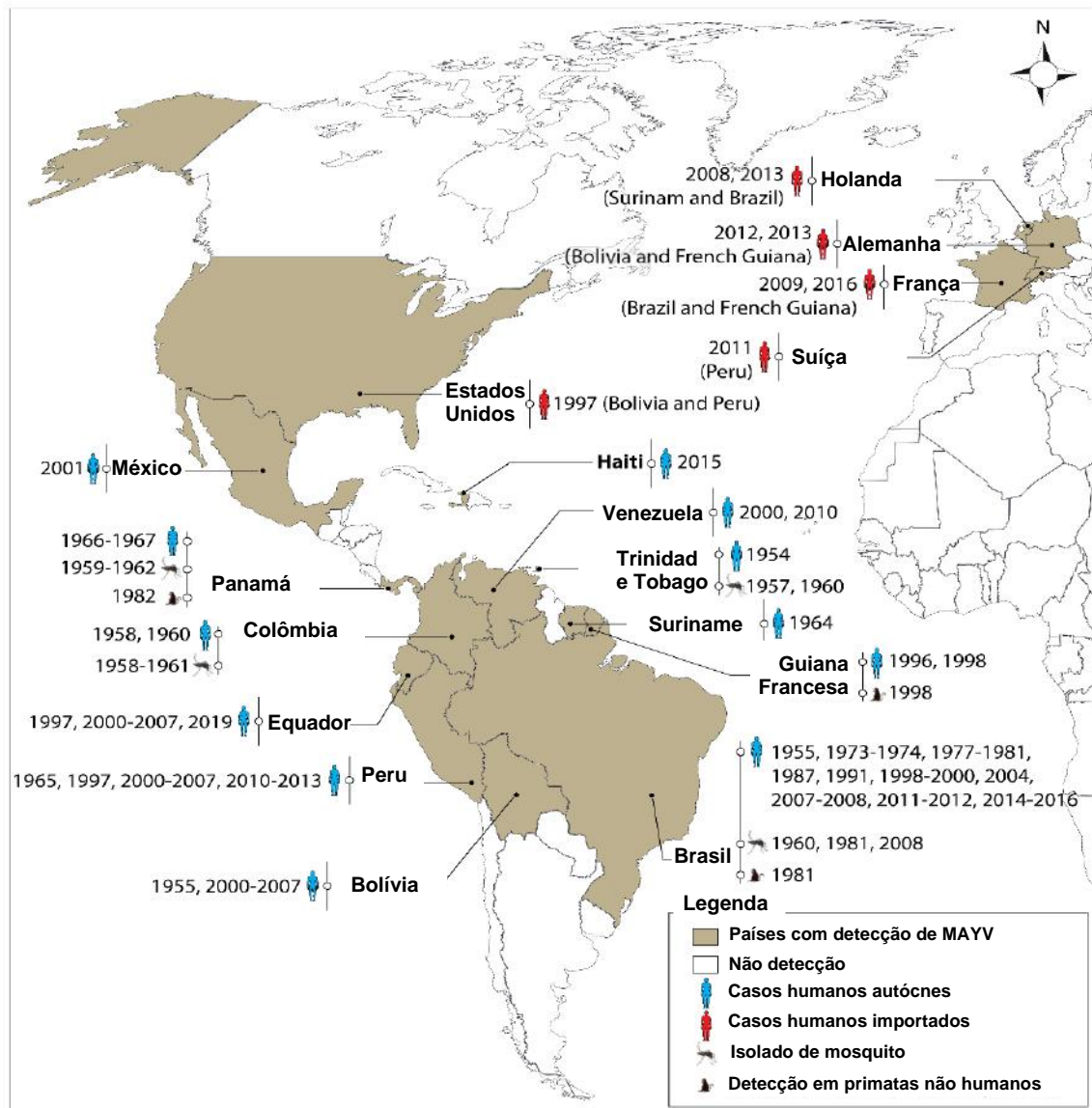


Figura 3: Distribuição global do vírus Mayaro. Países com a detecção de Mayaro são mostradas em marrom, bem como a detecção e isolamento em hospedeiros e vetores. Os casos importados evidenciados foram relatados nos Estados Unidos em 1997 e na Europa entre 2008 e 2016, com a origem dos casos mostrados entre parênteses. Fonte: Diagne, Bengue, *et al.*, 2020.

1.2 Estrutura e replicação do MAYV

O MAYV, assim como os demais membros do gênero *Alphavirus*, apresenta uma partícula viral envelopada, medindo 65-70 nanômetros de diâmetro, com simetria icosaédrica (T=4). Seu envelope é constituído por 240 heterodímeros que formam 80 trímeros das glicoproteínas transmembranares do envelope viral E1/E2, dando a partícula a representação de espinhos (Brown, Wan, Kielian, 2018). Cada uma das proteínas E2 e E1 contém um domínio transmembranar ancorada no envelope viral. A proteína E1 é dividida em três domínios I-III, onde o domínio II é responsável pela formação do heterodímeros E1/E2. A proteína E2, por sua

o processo replicativo; ORF2, responsável pela geração de proteínas estruturais através da formação de um RNA subgenômico. Adaptado de: ViralZone. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/625>.

Não há muitos estudos que caracterizem as especificidades do processo replicativo do MAYV e, por isso, a sua replicação é baseada no que já se sabe sobre outros alfavírus. Após a inoculação viral, realizada pelo vetor hematófago durante a picada do inseto, o vírus MAYV inicia a replicação a partir da sua internalização em células epiteliais, através do processo de endocitose mediado por receptor (Tesh, 1982; Carvalho, Silva, *et al.*, 2017). Mesmo não sendo completamente elucidado, a molécula de MXRA8 é o receptor celular mais bem estabelecido para o processo de entrada do MAYV em células suscetíveis. Essa proteína está presente na superfície das células epiteliais, mieloides e mesenquimais, e é utilizado por múltiplos alfavírus artritogênicos (Zhang, Earnest, *et al.*, 2018; KIM, DIAMOND, 2022). O reconhecimento do receptor celular é feito pela proteína E2, levando à endocitose da partícula através da formação de vesículas membranares na célula hospedeira (Zhang, Earnest, *et al.*, 2018; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). A acidificação do endossomo promove a dissociação das proteínas E1/E2, através do rearranjo conformacional irreversível dessas glicoproteínas. A proteína E1, no entanto, forma homodímeros que desencadeiam a fusão da membrana viral com a membrana do endossomo, resultando na liberação do genoma viral no citoplasma celular (Chen, Wang, Zhu, *et al.*, 2018).

Com a liberação do genoma no citoplasma da célula hospedeira, ocorre a tradução da primeira poliproteína que, após a clivagem, dará origem a proteínas não-estruturais NsP (“Non-Structural Protein”), que atuam no processo de replicação do genoma, formação de novas partículas e do escape do sistema imunológico do hospedeiro. Depois de sintetizadas e processadas, essas proteínas formam o complexo de replicação inicial, responsável pela síntese da fita negativa complementar do RNA genômico, chamada de intermediário de replicação que, por sua vez, servirá como molde para a síntese de novos RNA genômicos. A fita negativa também possibilita a transcrição de RNAs subgenômicos, que codifica para outra poliproteína que dará origem às proteínas estruturais, a proteína do capsídeo e três proteínas de envelope (proteína E1, proteína E2 e proteína E3), através do complexo replicativo tardio. As proteínas do envelope são processadas e são glicosiladas no retículo endoplasmático e no Golgi, para, então, serem encaminhadas à superfície celular onde brotarão novas partículas virais a serem liberadas para o meio extracelular (Figura 5) (Kendall, Khalid, *et al.*, 2019; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020; Santos, S. A. K., 2020).

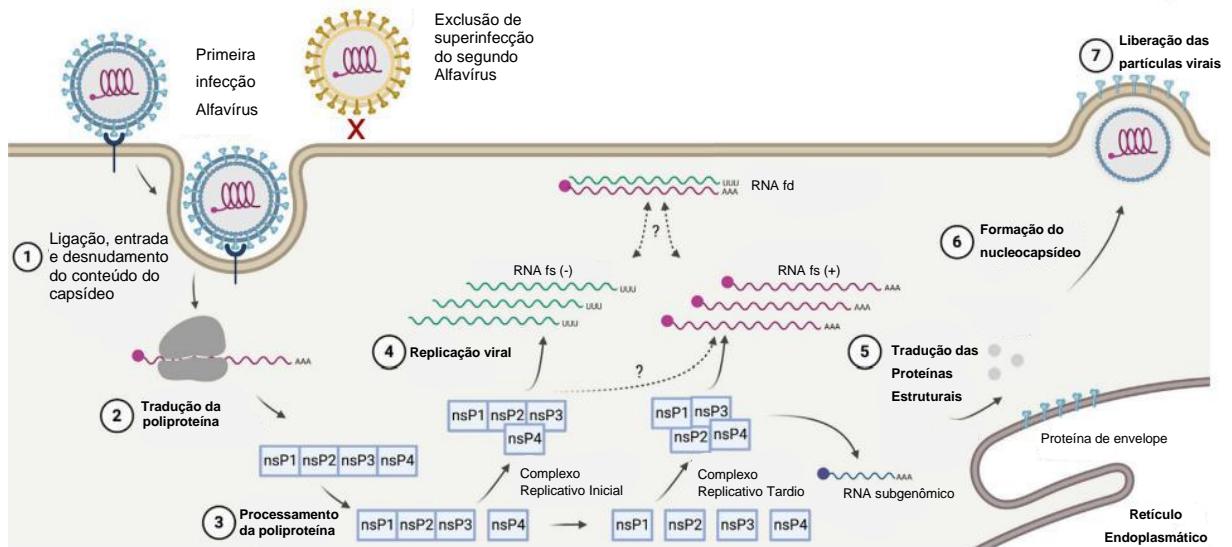


Figura 5: Ciclo replicativo Alfavírus. Processo de entrada do vírus nas células hospedeiras mediado pelo reconhecimento do receptor celular pelas proteínas de envelope. Processo de replicação do genoma viral através de proteínas virais. Processo de liberação de novos vírions ao meio extracelular por brotamento na membrana plasmática da célula hospedeira. Adaptado de: Singer, Ambrose, *et al.*, 2021.

1.3 Filogenia

Estudos filogenéticos, realizados recentemente com algumas cepas de MAYV, entre as sequências nucleotídicas correspondentes as glicoproteínas E1 e E2 evidenciam a existência de três genótipos do vírus, sendo eles: disseminado (D), limitado (L) e novo (N), dependentes da distribuição geográfica (Powers, Aguilar, *et al.*, 2006; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). No entanto, a evidência da circulação de MAYV no Haiti, em 2015, demonstrou a existência de vírus recombinados dos genótipos D e L, sendo denominado como um genótipo híbrido D/L (Mavian, Rife, *et al.*, 2017). O genótipo D é amplamente disseminado em toda a América, encontrado em Trinidad e Tobago, Peru, Guiana Francesa, Venezuela, Bolívia e Brasil, responsável pelo maior número de surtos; enquanto o genótipo L apresenta circulação limitada à região norte e centro oeste do Brasil e já foi encontrado no Haiti (MOTA, VEDOVELLO, *et al.*, 2015; Caicedo, Charniga, *et al.*, 2021). O genótipo N, por sua vez, fora isolado somente no Peru, em 2010 (Figura 6) (AUGUSTE *et al.*, 2015; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). E os genótipos híbridos encontrados no Haiti e, mais recentemente, no Brasil (Mavian, Rife, *et al.*, 2017).

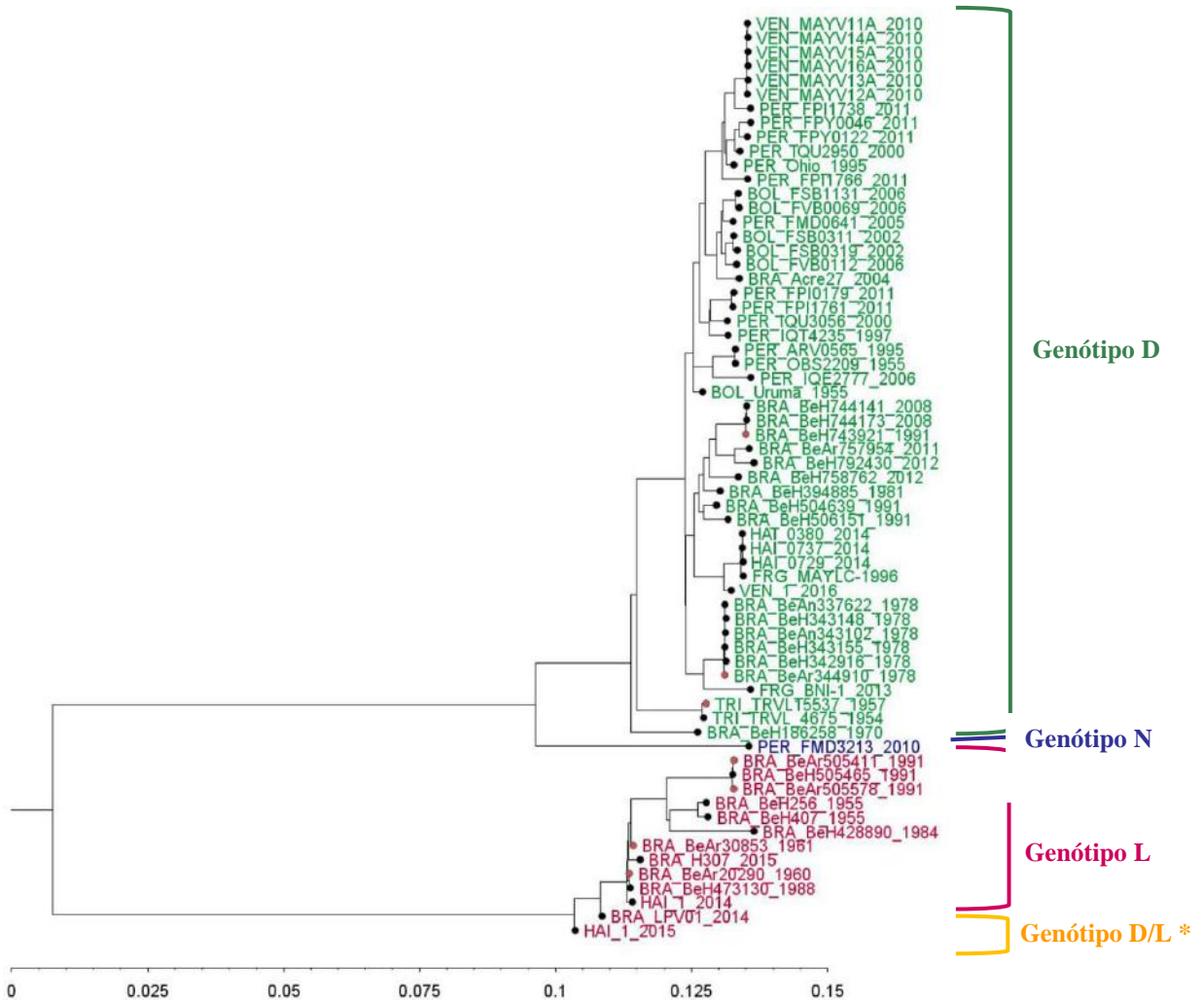


Figura 6: Filogenia das cepas de MAYV construída a partir de relações genéticas por verossimilhança das proteínas de envelope E1 e E2. Cepas do genótipo D em verde. Cepas do genótipo L em marsala. Cepa do genótipo N em roxo. Cepas do genótipo híbrido D/L em laranja. Identificação dos países de onde foram isolados no início dos nomes. Pontos rosa indicam sequências isoladas em mosquitos e pontos pretos indicam isolados em humanos. Adaptado de: Caicedo, Charniga, *et al.*, 2021.

A subdivisão do MAYV em genótipos foi realizada devido a evidência de que as cepas encontradas de MAYV, até o momento, apresentaram variação de 15-18% de divergência na sequência de nucleotídeos, mas um baixo grau de diversidade genética entre as cepas presentes em cada genótipo (0,05% a 3,0%), consideradas como cepas altamente conservadas, mesmo com diferenças temporais significativas entre os isolados. É possível que linhagens de cada genótipo sejam mantidas em ciclos enzoóticos discretamente divergentes, devido à amplitude de possíveis hospedeiros, o que os levou à evolução e manutenção ao longo do tempo (Powers, Aguilar, *et al.*, 2006).

1.4 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo MAYV

O MAYV é o agente etiológico da febre Mayaro, considerada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como uma doença tropical aguda negligenciada, que representa um risco a saúde pública devido a presença de dores musculares e articulares intensas e debilitantes, marcante em doenças induzidas por alfavírus artritogênicos (Santos, Dias, *et al.*, 2020). A febre Mayaro é uma doença autolimitada, variando de leve a severa, caracterizada por apresentar duas fases, aguda e crônica (Santos, S.A.K., 2020). Após a infecção, o vírus passa pelo período de incubação que pode durar de 7 a 14 dias, caracterizado por intensa replicação viral levando a um quadro de viremia curta, de 4 a 7 dias (Esposito e Fonseca, 2017; (Lopes Marques, Ranzolin, *et al.*, 2020). As manifestações clínicas agudas são bastante inespecíficas, com febre alta (entre 39° afra 40°C), calafrios, erupção cutânea/exantema, cefaleia, dor retro ocular e acompanhadas, principalmente, por mialgia, artralgia e artrite, presentes em 97% dos infectados, podendo persistir por meses a anos nos quadros crônicos (Esposito e Fonseca, 2017; Ganesan, Duan *et al.*, 2017; Santos, Dias, *et al.*, 2020). Geralmente, a fase febril aguda dura entre 3 e 5 dias e até 50% dos indivíduos podem apresentar exantema, estando associada a sangramentos ou não. As regiões que podem apresentar exantema são, principalmente, peito, costas, braços e pernas, sendo mais comum em crianças com menos de 5 anos de idade, surgindo, normalmente, na fase final da fase aguda da doença (Pinheiro, Freitas, *et al.*, 1981; Halsey, Siles, *et al.*, 2013; Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015). Ademais, alguns sintomas menos frequentes podem estar presentes, como: diarreia; náuseas com ou sem vômito; dor abdominal; inchaço nos gânglios linfáticos; e fenômenos hemorrágicos, como petéquias, gengivite e epistaxe (Tesh, Watts, *et al.*, 1999; Mourão, Bastos *et al.*, 2012; Slegers, Keuter *et al.*, 2014; Santos, Dias, *et al.*, 2020).

A fase de convalescência apresenta maior tempo de duração, podendo persistir por semanas, em que os principais sintomas são: fraqueza; dores articulares (artralgia e artrite); e mialgia, que começam na fase aguda e persistem em cerca de 80% dos doentes, progredindo para a fase crônica (Santos, Dias, *et al.*, 2020). A fase crônica é considerada quando os sintomas articulares perduram por mais de 3 meses após o início dos sintomas, sendo caracterizada pelo processo inflamatório crônico (Santos, Dias, *et al.*, 2020).

Comum a outros alfavírus artritogênicos, o comprometimento muscular e articular é uma característica marcante da infecção pelo MAYV. Cerca de 77% dos casos relataram a presença de mialgia aguda, demonstrando que o comprometimento muscular é predominante nesse grupo viral (Tesh, Watts, *et al.*, 1999; Dupuis-Maguiraga, Noret *et al.*, 2012). Seguindo a mialgia, já foi descrito que a poliartralgia pode estar presente em cerca de 50-89% dos casos

de infecção pelo MAYV, com comprometimento, principalmente, das articulações das mãos, pulsos, pés, tornozelos e joelhos, marcando a doença como incapacitante devido a limitação dos movimentos das áreas acometidas (Pinheiro, Freitas, *et al.*, 1981; Tesh, Watts, *et al.*, 1999; Halsey, Siles, *et al.*, 2013).

A infecção por MAYV também já foi relacionada com casos raros de miocardite, febre intermitente e complicações neurológicas (Acosta-Ampudia, Monsalve *et al.*, 2018). Além disso, durante um surto de febre MAYV entre 2007-2008, em Manaus (Brasil), cerca de 12% dos casos apresentaram fenômenos hemorrágicos associados a infecção (Mourão, Bastos *et al.*, 2012). Devido à baixa disponibilidade de dados referentes a mortalidade associada a infecções pelo MAYV, acredita-se que essa seja baixa, com apenas um óbito registrado no México em 2001 (Navarrete-Espinosa, Gómez-Dantés, 2006; Halsey, Siles, *et al.*, 2013; Ganjian, Riviere-Cinamond, 2020).

1.5 Patogênese do MAYV

Estudos que elucidam os mecanismos específicos por trás da patogênese do MAYV ainda são limitados, por isso, o conhecimento sobre outros alfavírus auxilia na compreensão do MAYV (Santos, Dias, *et al.*, 2020). Sabe-se que a infecção por MAYV ocorre através da inoculação do vírus pelo vetor artrópode, durante o repasto sanguíneo; com a infecção inicial ocorrendo em células epiteliais, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, presentes na derme (Kafai, *et al.*, 2022). Outras células presentes neste tecido também são suscetíveis ao MAYV, como macrófagos e células dendríticas (FONG, KINI, *et al.*, 2018). Essas células desempenham uma importante função na disseminação do patógeno pelo organismo, em que, através da circulação sanguínea, carregam o vírus até os sítios de replicação primária, como fígado, baço e nódulos linfáticos, contribuindo para o quadro virêmico de até 7 dias (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). Após a disseminação para os sítios de replicação primária, via sistema linfático, MAYV chega aos demais tecidos relacionados com as principais manifestações clínicas, como: músculo esquelético; articulações; tecido ósseo; e sistema nervoso central (SNC) (Figura 7) (Morrison, Whitmore, *et al.*, 2006; Labadie, Larcher, *et al.*, 2010; Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira, *et al.*, 2013; Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019).

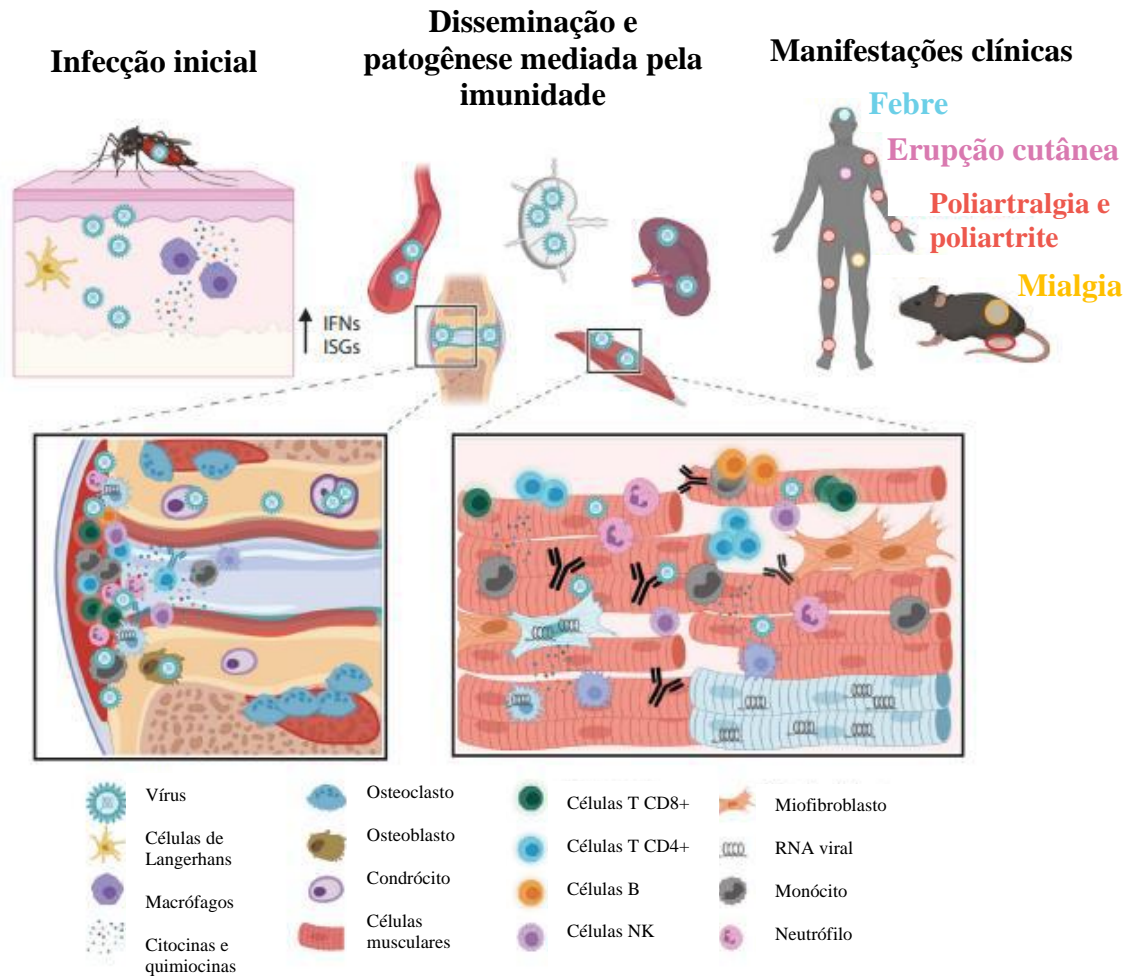


Figura 7: Representação da patogênese do MAYV. O primeiro quadro apresenta a inoculação do vírus, pelo vetor hematofago, na derme do indivíduo, em que células imunes primárias, como os macrófagos e células dendríticas residentes entraram em contato com o vírus. O segundo quadro apresenta a disseminação para os sítios de replicação primária do MAYV e as células envolvidas nesse processo, além dos tecidos envolvidos nos principais sintomas relacionados com a doença induzida, como músculos e articulações. O terceiro quadro apresenta as consequências da replicação viral, as manifestações clínicas típicas da doença induzida por MAYV, como febre, erupção cutânea, distúrbios artríticos e mialgia. Adaptado de: Kafai, et al., 2022.

Como dito anteriormente, uma característica marcante da infecção por alfavírus artritogênicos, o comprometimento muscular e articular está presente em cerca de 80% dos infectados (Tesh, Watts, *et al.*, 1999). Embora ainda não sejam bem elucidados os mecanismos moleculares e celulares associados à persistência dos sintomas articulares e musculares na infecção por alfavírus, sabe-se que estes estão mais relacionados a dois fatores: a replicação do vírus no tecido alvo; e a desregulação da resposta imune local do hospedeiro (Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira, *et al.*, 2013; Schilte, Staikowsky, *et al.*, 2013; Mostafavi, Abeyratne, *et al.*, 2019).

Já foi demonstrado que a replicação do vírus Mayaro induz um maior número de espécies reativas de Oxigênio (ROS) nas defesas oxidantes, tanto em infecções em células

hepáticas humanas (HepG2) quanto em modelos de camundongos, resultando em desequilíbrio homeostático celular e contribuindo para lesões teciduais (Diagne, Bengue, *et al.*, 2020). Esse fato, pode ser correlacionado com a resposta inflamatória induzida por macrófagos, uma vez que já é conhecido que macrófagos infectados por MAYV induzem a expressão de TNF, uma citocina relacionada com processos inflamatórios, e que, coincidentemente, no momento de pico da replicação viral há um aumento na produção de ROS e de TNF. No entanto, se essas células forem tratadas com antioxidantes, nos momentos iniciais da infecção, TNF deixa de ser secretado por macrófagos, indicando o envolvimento de ROS na indução do processo inflamatório pela infecção por MAYV (Cavalheiro, Costa, *et al.*, 2016).

A resposta imune induzida pela infecção por alfavírus é um dos principais fatores envolvidos na patogênese. Os níveis de diversas citocinas e quimiocinas já foram encontrados desregulados em pacientes infectados com CHIKV, RRV e MAYV (Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira, *et al.*, 2013). Citocinas como IL-6, CXCL9/MIG, IP-10 e IL-1 β são identificadas como biomarcadores de gravidade e persistência da doença, estando relacionadas com a geração de dores articulares também evidente em artrite reumatoide (Sourisseau, Schilte, *et al.*, 2007; NG, Lisa F. P., Chow, *et al.*, 2009; Chaaithanya, Muruganandam, *et al.*, 2011; Kelvin, Alyson A., Banner, *et al.*, 2011).

Um estudo longitudinal prospectivo realizado com infectados por CHIKV após surtos na Ilha da Reunião em 2006, mostrou a persistência de artralgia em cerca de 60% dos casos por 36 meses após a infecção, sendo em 90% incapacitante (Schilte, Staikovsky, *et al.*, 2013). Além disso, uma avaliação de pacientes do surto de Chikungunya na Itália, em 2007, demonstrou uma relação entre os níveis de citocinas na fase aguda da doença e o desenvolvimento da doença em 6 e 12 meses pós infecção. Foi encontrado que os níveis de citocinas como CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, e IL-6, estavam aumentados nas etapas iniciais da doença em relação aos demais tempos averiguados e citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-10, IFN- γ e IL-5, estavam com níveis menores na fase aguda aumentando significativamente nos momentos posteriores. O que indica uma associação entre a gravidade e a indução do processo inflamatório devido a infecção pelo vírus (Kelvin, Alyson A, Banner, *et al.*, 2011).

Observado também para pacientes com febre Mayaro, um estudo longitudinal por 12 meses, verificou que estes apresentavam elevados níveis de citocinas pró inflamatórias no soro, como IL-6, IL-17, IFN- γ , VEGF e TNF- α , durante a fase aguda da doença. No entanto, em

pacientes que desenvolveram artrite crônica, esses níveis ainda eram considerados altos (Santiago, Halsey, *et al.*, 2015).

A mialgia, em decorrência de infecções por alfavírus, é um dos sintomas mais marcantes nas doenças induzidas por esses vírus (Lidbury, Rulli, *et al.*, 2008; Zim *et al.*, 2013). Esse sintoma está associado à capacidade direta de replicação em células musculares (Morrison, Whitmore, *et al.*, 2006). Estudos *in vitro*, demonstraram que o vírus CHIKV é capaz de infectar mioblastos e miotubos e se replicar eficientemente nessas células (Ozden, Huerre *et al.*, 2007; Sane, Kurkela *et al.*, 2012). A replicação do CHIKV em mioblastos humanos (HSMM) altera a expressão de diversos genes envolvidos em processos celulares, como indução de apoptose e estresse oxidativo, acarretando na redução na viabilidade dessas células (Hussain, Lee, *et al.*, 2016). Sabe-se que os principais fatores associados à destruição tecidual muscular e artralgia grave de longa duração, induzidos pela infecção por alfavírus, é devido a: robusta resposta de células imunes primárias; presença de infiltrado proliferativo de células linfocitárias mononucleares na membrana sinovial; e pela resposta inflamatória marcada pela presença de citocinas como: IL-6; IL-7; IL-17; MCP-1; VEGF; TNF; INF- γ e CCL2 (NINLA-AESONG, MITARNUN, *et al.*, 2019; Santos, Dias, *et al.*, 2020).

Um estudo realizado com isolados clínicos de CHIKV durante uma epidemia na Tailândia (2009-2010), demonstrou que as recentes cepas circulantes, associadas a casos de mialgia persistente, apresentam maior capacidade de replicação em mioblastos. Além da replicação, CHIKV ainda promoveu uma maior produção de algumas citocinas inflamatórias (MCP-1, IP-10 e IL-8), progredindo para a persistência de dores musculares (Lohachanakul, Phuklia, *et al.*, 2015).

Células que compõem as articulações, como condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos, também são suscetíveis a infecção por alfavírus em modelo *in vitro* (Lim, Supramaniam, *et al.*, 2018; MATUSALI, COLAVITA, *et al.*, 2019). Ademais, MAYV também possui a capacidade de infectar células do tecido ósseo, desregulando a expressão de alguns componentes importantes para essas células, como a diminuição de colágeno e aumento da expressão de metaloproteinases, relacionado com a degradação da articulação, além da indução da produção de citocinas pró inflamatórias (IL-6 e TNF- α), contribuindo para a lesão articular (Bengue, Ferraris, *et al.*, 2019). Em conjunto, já havia sido evidenciado por Hoarau *et al.*, que pacientes infectados pelo CHIKV com artralgia crônica apresentam antígenos persistentes do vírus no

líquido sinovial e uma robusta resposta imune celular nas articulações (Hoarau, Jaffar Bandjee, *et al.*, 2010).

A caracterização de modelos de estudo *in vivo* da infecção por MAYV podem elucidar fatores virais e do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento da doença, no entanto, há poucos estudos para MAYV em modelos de animais (Santos, Dias, *et al.*, 2020; Diagne, Bengue, *et al.*, 2020).

Modelos de primatas não humanos, principalmente, macacos cynomolgus, auxiliam em estudos com CHIKV contribuindo para a descrição da patogênese desse vírus e são úteis em testes pré-clínicos de vacinas e terapias. Foi demonstrado que essa espécie, quando infectada com CHIKV, apresenta sinais clínicos semelhantes aos sintomas induzidos pela febre Chikungunya em humanos, como: febre; exantema; e edema nas articulações, além de confirmarem o tropismo desse vírus por músculos esqueléticos e articulações, através da evidência do comprometimento desses tecidos por histologia (Broeckel, Haese, *et al.*, 2015). Estudos com modelo de camundongos também demonstram sinais clínicos característicos da infecção por CHIKV, em que estes desenvolveram quadros de artrites e miosites, evidenciados através da fraqueza muscular, prejuízo motor das patas traseiras e edema nas patas (Gardner, Anraku, *et al.*, 2010; Ferreira, Silva, Recht, *et al.*, 2022). Um estudo com camundongos C57/BL/6 infectados com duas cepas asiáticas e uma do Oceano Índico (IOL) demonstrou variações de virulência entre eles, através da observação de um menor infiltrado inflamatório nas patas dos animais e menores níveis de citocinas e quimiocinas, relacionadas com lesões teciduais, nos animais infectados com o genótipo asiático (Gardner, Anraku, *et al.*, 2010).

Todavia, estudos com modelos *in vivo* para MAYV são, majoritariamente, em camundongos. Em 2019, Santos *et al.* caracterizou um modelo para estudo da doença do MAYV em camundongos BALB/c de 15 dias. Nesse estudo, eles observaram a indução de miosite e artrite aguda, devido a redução da força física dos animais e dano musculoesquelético, além da produção de mediadores pró-inflamatórios TNF- α e IL-6 (Santos, Dias, *et al.*, 2019). Recentemente, nosso grupo de laboratório caracterizou outro modelo de estudo da patogênese do MAYV em camundongos selvagens da linhagem SV129, demonstrando que a replicação viral e a indução de sinais clínicos dependem da idade do animal e da modulação da resposta imune inata e adaptativa. Os animais de 11 dias de vida apresentavam elevada carga viral nos tecidos, como cérebro e fígado, mas, principalmente, em músculos esqueléticos e articulações (Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019). Em ambos os modelos de infecção para MAYV, análises

histológicas mostraram extensas áreas de lesão tecidual e processo inflamatório intenso marcado pela expressiva presença de infiltrado inflamatório nas patas e nos músculos associados. Com isso, modelos experimentais são fundamentais na compreensão da fisiopatologia dos alfavírus artrítogênicos, pois eles dependem também de fatores do hospedeiro para causar a doença.

2 JUSTIFICATIVA

O MAYV é um vírus negligenciado, em que, poucos estudos investigam a sua evolução genética e, principalmente, a patogênese envolvida na doença debilitante, marcada pela cronicidade de sintomas artríticos e musculares (Camini, Da Silva Caetano, *et al.*, 2017; Kafai, *et al.*, 2022). No entanto, o aumento de registros de casos de MAYV no Brasil nos últimos anos, leva a preocupação da circulação desse vírus em contextos urbanos, sendo um vírus com potencial de causar uma epidemia em nosso país (Terzian, Suzuki, *et al.*, 2015; Vieira, Silva, *et al.*, 2015; Lednicky, Rochars, *et al.*, 2016).

O MAYV apresenta circulação de três genótipos pela América em que, estes são divididos de acordo com análises de verossimilhança entre as sequências das proteínas E1 e E2 (Mavian, Rife, *et al.*, 2017). Apesar de tal fato, há uma escassez de evidências relacionando a virulência e aptidão a diferentes vetores por genótipos de MAYV. Já foi observado que algumas cepas MAYV induzem variações entre áreas de placas e se relacionam com a indução de lesões mais intensas no tecido conjuntivo de camundongos recém-nascidos, além da variação na patogenicidade em camundongos adultos, levando à especulação de que possam existir diferenças de virulência entre as cepas de MAYV (Powers, Aguilar, *et al.*, 2006).

Assim como o MAYV, o CHIKV também detém de diversos genótipos e estes apresentam variações de virulência, contendo os genótipos asiáticos e do Oceano Índico (IOL), com maior importância clínica em todo o mundo (Langsjoen, Haller *et al.*, 2018). Um estudo comparando a patogênese e virulência de dois isolados, um asiático e outro IOL, em modelo de camundongos C57/BL/6, encontrou menor infiltrado inflamatório nas patas dos animais, bem como menores níveis de citocinas e quimiocinas, relacionadas com lesões teciduais induzidas pela infecção, nos animais infectados com o genótipo asiático (Gardner, Anraku, *et al.*, 2010). Estudos filogenéticos com genótipos de CHIKV demonstraram que as recentes epidemias causadas por esse vírus, apresentam genótipos com mutações nas proteínas de envelope E1 e E2, além da proteína Nsp4 em que, foi evidenciado que essas mutações possibilitam maior adaptabilidade a mosquitos vetores do gênero *Aedes* (Tsetsarkin, Weaver, 2011; Agarwal, Sharma, *et al.*, 2016; Cunha, Cruz, Schnellrath, *et al.*, 2017).

A recombinação e a adaptação do genoma dos vírus de RNA, pode contribuir de tal forma para mudanças no perfil infeccioso dos vírus que, já foi visto que uma mutação específica de um aminoácido em E1 (A226V) no CHIKV de isolados clínicos indianos durante a epidemia de 2007, na Índia, contribuiu para a infectividade em diferentes linhagens de mosquitos,

apresentando maior virulência na infecção de humanos, em relação às demais cepas que circularam no país anteriormente (Charrel, de Lamballerie, *et al.*, 2007). Essa mutação já havia sido relatada em outro surto de CHIKV, na ilha de Reunion (território francês), em 2005, e associada a maior taxa de transmissão e aumento na gravidade de sintomas não clássicos, como sinais neurológicos e hepatite fulminante (Borgherini, Poubeau, *et al.*, 2007; Staikowsky, Le Roux, *et al.*, 2007; Tsetsarkin, Vanlandingham, *et al.*, 2007; Economopoulou, Dominguez, *et al.*, 2008; Soumahoro, Boelle, *et al.*, 2011).

Atualmente, os estudos de MAYV em modelos *in vitro* e *in vivo* são realizados com um vírus adaptado, referente ao primeiro vírus encontrado no mundo em 1954, que foi propagado no cérebro de camundongos lactentes e é comercializado pela *American Type Culture Collection* (ATCC) (Anderson, Wattlely, *et al.*, 1957; Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019). A utilização dessa cepa com mais de 70 anos pode não corresponder genotipicamente e fenotipicamente ao isolado de Trinidad e Tobago que o originou, devido a diversas passagens em células que acumulam mutações, como já evidenciado para MAYV, CHIKV, vírus Sindbis (SINV) e vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEE) (Carl Th. Pedersen, Robinson, *et al.*, 1972; Kinney, Chang, *et al.*, 1993; Arrigo, Watts, *et al.*, 2008; Gorchakov, Wang, *et al.*, 2012; Langsjoen, Muruato, *et al.*, 2020). Além disso, com a evidência da evolução genômica desse vírus, a circulação de MAYV, atualmente, pode ter se distanciado da patogenicidade da cepa original, o que comprometeria a utilização desse modelo em pesquisas sobre o MAYV (Powers, Aguilar, *et al.*, 2006).

A possível circulação do MAYV em um contexto urbano, leva a necessidade de estudos de monitoramento epidemiológico e genético, uma vez que pequenas alterações, já demonstradas em CHIKV e em análises de índice de adaptação de códons para MAYV, evidenciaram maior aptidão por vetores urbanos e maior gravidade da doença por cepas de circulação recente (Weaver, Reisen, 2010; Mavian, Rife, *et al.*, 2017).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Comparação genotípica e fenotípica entre isolados recentes do vírus Mayaro, de soro de pacientes de surtos brasileiros, em relação ao vírus ATCC, protótipo do isolado em Trinidad e Tobago.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar genotipicamente as sequências nucleotídicas dos isolados de MAYV (ATCC, SINOP e ACRE) depositadas no banco de dados, GenBank:
 - Determinar a semelhança genômica entre os isolados dos genótipos D e L do vírus Mayaro;
 - Avaliar as diferenças nucleotídicas entre os isolados e determinar as regiões com predomínio delas.
 - Avaliar se as mudanças nucleotídicas conferem possíveis mudanças de aminoácidos.

- b) Avaliar a capacidade de dispersão viral para as células vizinhas através da infecção de células Vero e análise da medição de áreas de placas de lise;

- c) Avaliar a infecção viral dos isolados, propagados em células de mamíferos (VERO) e células de vetor artrópode (C636), em miotubos e mioblastos murinos (C2C12) (*in vitro*):
 - Comparar a cinética de replicação pela quantificação de partículas infecciosas liberadas através do ensaio de placa de lise nos tempos de 0, 24 e 48 horas pós infecção;
 - Avaliar a viabilidade celular após 48 horas de infecção em miotubos e mioblastos C2C12 dos MAYV através do ensaio de MTT.

- d) Analisar a infecção de cada isolado viral de MAYV em modelo de camundongo selvagem de 12 dias:
 - Comparar a severidade da doença induzida pelos vírus de diferentes genótipos, nos animais, através do acompanhamento diário de parâmetros (sobrevivência, edema de pata e peso);
 - Avaliar a disseminação viral dos isolados clínicos por ensaio de plaque dos tecidos musculares (quadríceps e gastrocnêmio), cérebro, baço, coração, patas e joelhos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens Celulares

Para avaliar diferenças de replicação e de formação de novas partículas, utilizamos duas linhagens celulares para propagação dos isolados, células de mamíferos (Vero) e células de vetor artrópode (C636).

Células de tecido larval de *Aedes albopictus* (C636), cultivadas em monocamadas com meio de cultura Leibovit's L-15 (L15; Life Technologies Inc.), suplementado com 10% SFB, 1% aminoácidos essenciais e L-Glutamina e mantidas em frascos de cultura médios (75 cm²) em incubadora a 28°C. Células de rim de macaco verde (VERO) (CCL-81™; linhagem celular, celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC) e mioblastos murinos (C2C12) (CRL-1772™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC), cultivadas em monocamadas com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco®) com alta concentração de glicose (4,5g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®) e mantidas em frascos de cultura de 75 cm² em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Para a diferenciação celular de mioblastos para miotubos (C2C12), as células foram plaqueadas utilizando 1,2x10⁶ células/placa, suplementadas com 10% de soro de cavalo, por placa de 24 poços e, após 24 horas do plaqueamento, a cultura celular foi mantida em DMEM com suplementação de soro de cavalo à 2%, trocado a cada 2 dias até a observação de uma cultura confluenta diferenciada.

4.2 Vírus

4.2.1 Isolados Clínicos

Para os experimentos foram utilizados três isolados do vírus Mayaro (MAYV). A cepa ATCC (ATCC VR 66, linhagem TR4675) (ATCC), utilizado como referência, isolado de soro de paciente com sintoma febril em Trinidad e Tobago, em 1954, pertencente ao genótipo D (Anderson, Wattley, *et al.*, 1957). O vírus SINOP (BR/Sinop/H307/2015) (SINOP), isolado de soro de paciente em um estudo epidemiológico durante um surto de Dengue na cidade de Sinop - Mato Grosso (MT), Brasil, em 2011, do genótipo L. No qual, esse paciente apresentou sintomas típicos de infecção por dengue clássica com queixa de dores musculares, no entanto, fora detectado o vírus MAYV por RT-PCR (Vieira, Silva, *et al.*, 2015). O vírus ACRE (ACRE), foi isolado de soro de paciente em junho de 2004, durante um levantamento epidemiológico em Acrelândia, Estado do Acre - Brasil, localizado na Bacia Amazônica Ocidental, do genótipo D.

Em que, este apresentou quadro clínico com febre, calafrios e sudorese, com ausência de artralgia e mialgia (Terzian, Suzuki, *et al.*, 2015).

4.2.2 Propagação dos Estoques de MAYV

Todos os isolados clínicos foram propagados em células VERO ou C636 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1, até a passagem 3 posteriores ao isolamento. Para a produção de estoques em VERO, as células com confluência de 80-90% foram infectadas com cada isolado em meio de cultura DMEM sem SFB e incubadas por 1 hora em estufa a 37°C. Após o período de adsorção, meio DMEM com 2% SFB são adicionados ao volume final, e coletados 30 horas após a infecção (hpi). Para a produção de estoques em C636, as células com confluência de 70-80% são infectadas com os respectivos isolados clínicos em meio de cultura L-15 por 1 hora a 28°C. Após o período de infecção, o meio foi descartado e as células mantidas em meio L-15 com 5% SFB, sendo coletado 3 dias após a infecção (dpi). Após a coleta do sobrenadante, em cada período atribuído, esse foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos para remover *debris* celulares e o sobrenadante clarificado foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C. Os títulos virais dos estoques foram determinados por ensaio de formação de placas de lise.

4.3 Quantificação Viral

Os títulos virais dos isolados de MAYV e a carga viral de amostras de tecido animal, foram determinados por ensaio de formação de placas de lise em células VERO. As amostras de tecidos foram homogeneizadas em DMEM usando uma relação fixa de massa/volume e uma diluição seriada foi preparada em DMEM (6 diluições). Em seguida, cada diluição foi utilizada para infectar células VERO confluentes, semeadas em monocamada em placas de 24 poços. Após 1h e 30 min de adsorção, 1 mL de carboximetilcelulose a 1,5% (Sigma-Aldrich) com DMEM (concentrado 2x) com 1% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen) e 1% de antibiótico (Penicilina-Streptomicina), foram adicionados às células e incubadas a 37°C. Após 48 horas, as células foram fixadas com formaldeído a 10% e as placas de lise visualizadas por coloração com cristal violeta a 1% em etanol a 20%. O título foi calculado manualmente como unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL), para amostras de tecido, a unidade é convertida em PFU/g.

4.4 Alinhamento de Sequências Nucleotídicas

As sequências genômicas dos isolados de MAYV utilizadas no estudo, foram obtidas pelos respectivos números de acesso no banco de dados do GenBank NCBI: MK070492.1 (ATCC VR 66, cepa TR4675) (ATCC); MH513597.1 (BR/Sinop/H307/2015) (SINOP); KM400591.1 (ACRE27). Para fins comparativos entre os genótipos avaliados neste estudo, utilizamos sequências genômicas de outros isolados de MAYV com proximidade filogenética aos isolados de interesse. Os isolados com maior proximidade ao ATCC utilizados foram: MK573240.1 (cepa TRVL15537) (MAYV TRVL), isolado de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* em 1957, em Trinidad e Tobago; e MK573244.1 (cepa BeH343155) (MAYV BR 1978), isolado humano em 1978, no Brasil. Os isolados com proximidade filogenética ao ACRE utilizados foram: MK573245.1 (cepa FSB0311) (MAYV BOLÍVIA 2002), isolado humano em 2002, na Bolívia; e KP842814.1 (cepa FVB0112) (MAYV BOLÍVIA 2006), isolado humano em 2006, na Bolívia. Por fim, os isolados com proximidade ao SINOP utilizados foram: KY618133.1 (cepa BeH473130) (MAYV BR 1988), isolado humano em 1988, no Brasil; KY618127.1 (cepa BeAr20290) (MAYV BR 1960), isolado de mosquitos *Haemagogus janthinomys* em 1960, no Brasil; e KY985361.1 (cepa Homo sapiens/Haiti-1/2014) (MAYV HAITI), isolado humano em 2014, no Haiti.

Os arquivos FASTA contendo as sequências genômicas foram utilizados para o alinhamento genético usando a ferramenta *Multiple Sequence Alignment* no Geneious Prime 2023.1, através do algoritmo MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*). Porcentagens de identidade do genoma e das regiões correspondentes às proteínas E1 e E2, foram calculadas pelo software. Porcentagem de diferenças de aminoácidos calculados manualmente através da sequência de aminoácidos totais.

4.5 Ensaio de Placa de Lise

Ensaio de placa em células VERO cultivadas em placas de 6 poços, em que, cada poço foi infectado com 100 PFU de cada isolado viral (ATCC, SINOP e ACRE) propagados em células C636. Após 1h e 30 min de adsorção, 3 mL de agarose low-melting à 0,4% (Sigma-Aldrich) em DMEM (concentrado 2x) com 1% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen) e 1% de antibiótico (Penicilina-Streptomomicina) foram adicionadas às células e incubadas a 37°C. Após 48 horas, as células foram fixadas com formaldeído a 10% e retirada a camada de ágar. As

placas foram visualizadas por coloração com cristal violeta a 1% em etanol a 20%. O diâmetro dos plaques foi comparado entre os isolados clínicos e medido pelo software ImageJ.

4.6 Replicação em Mioblastos murinos C2C12

Cultura de mioblastos murino C2C12 (CRL-1772™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC), foram plaqueadas em placas de 24 poços cultivadas em meio DMEM high. Após confluência atingida em 24 horas, esta foi infectada com uma (MOI) de 1 e 0,1 de cada isolado de MAYV. Após 1h e 30 min de adsorção viral, o meio foi removido, adicionando DMEM, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), e retirada uma alíquota armazenada a -80°C para a quantificação viral posterior. Nos tempos 0, 24 e 48 horas, alíquotas de 25 uL foram coletadas e armazenadas a freezer -80°C para avaliação da replicação viral por ensaio de placa, posteriormente.

4.7 Replicação em Miotubos murinas C2C12

Cultura de mioblastos murino C2C12 (CRL-1772™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC), foram plaqueadas em placas de 24 poços e diferenciadas em miotubos, através da adição de 2% soro de cavalo (SC) no meio de cultura DMEM, trocados a cada 2 dias até a 6 dias de diferenciação ou até a visualização de uma cultura confluenta diferenciada. Após o período de diferenciação, estas células foram infectadas em uma (MOI) de 1 e 0,1 de cada cepa de MAYV. Após 1h e 30 min de adsorção viral, o meio foi removido, adicionando DMEM, suplementado com 2% soro de cavalo (SC), e retirada uma alíquota armazenada a -80°C para a quantificação viral posterior. A cultura foi monitorada a cada 24 horas e interrompida em 48 horas devido à baixa viabilidade celular evidenciada por microscópio óptico para as infecções por ATCC e SINOP. Alíquotas de 25 uL foram coletadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas após infecção e armazenadas em freezer -80°C.

4.7.1 Ensaio de Viabilidade Celular das células C2C12 infectadas

A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico para atividade metabólica celular (Ensaio de MTT). Após 48 horas de infecção dos mioblastos ou miotubos, foram adicionados 500 uL de MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio; Life Technologies) diluído em meio de cultura na concentração de 0,5 mg/mL por poço. A solução foi mantida nos poços por 1 hora, em estufa ao abrigo de luz, e em seguida

descartada. Posteriormente, 200uL de álcool isopropílico acidificado com 0,04M de ácido clorídrico (HCL, da Sigma Co.) foram adicionados. A densidade óptica de cada amostra foi lida no comprimento de onda de 570nm no espectrofotômetro. Os dados foram normalizados pelo MOCK.

4.8 Comitê de ética para análise experimental in vivo

Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho estão de acordo com as regulações vigentes sobre ética e experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, protocolo n° 036/18.

4.9 Modelo animal

A comparação das infecções em modelo experimental foi conduzida em camundongos selvagem (WT) SV129 jovens, com aproximadamente 12 dias de vida e peso médio de 6g, de acordo com os achados pelo grupo de laboratório, em que esses animais apresentam eficiente replicação viral e sinais clínicos referentes a infecção por alfavírus em camundongos, como: edema de pata; perda de peso; pelo arrepiado; irritação dos olhos; letargia e possível diarreia (Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019). Os animais foram inoculados subcutaneamente na almofada da pata esquerda com 10^5 PFU de cada isolado clínico de MAYV, utilizando um volume total de 20 μ L. O mesmo volume de meio de cultura de células não infectadas (Mock) é utilizado como controle. Cada grupo experimental foi alojado com a mãe, não infectada, em gaiolas de polipropileno com livre acesso a ração e água, mantidos sob condições de controle de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais foram acompanhados diariamente recebendo pontuação para os sintomas aparentes, pesagem e áreas das patas, determinada a partir das medidas largura-altura da região do metatarso, com auxílio de paquímetro digital. Nos dias 3 e 6 após a infecção, os animais foram eutanasiados com o anestésico inalatório Isoflurano e as amostras de tecidos (músculos gastrocnêmio e quadríceps; joelhos; patas e cérebro) foram coletados e armazenados a -80°C até serem processadas.

5 RESULTADOS

5.1 Os isolados de MAYV apresentam diferenças entre as sequências nucleotídicas e nas sequências de aminoácidos nas regiões correspondentes as proteínas E1 e E2

Através do alinhamento genômico das sequências dos isolados de MAYV de interesse e dos isolados mais próximos filogeneticamente deles (Figura 8), pode-se verificar que os vírus pertencentes ao genótipo D apresentavam dois perfis de similaridade de bases quando comparados entre eles, sendo um com proximidade de quase 100% de identidade entre ATCC e TRVL (mosquito) e outro de quase 100% de identidade entre BR 1978, ACRE, BOLÍVIA 2006 e BOLÍVIA 2002. O genótipo L também apresentou um perfil de identidade bem próximo de 100% entre os seus isolados, mas divergiu em comparação ao genótipo D, apresentando menos de 90% de similaridade entre os isolados de genótipos distintos. A comparação entre os isolados alvos do estudo demonstrou 96,98% de similaridade entre as sequências genômicas de ATCC e ACRE, 86,75% entre ATCC e SINOP e 86,53% entre ACRE e SINOP (Figura 9).

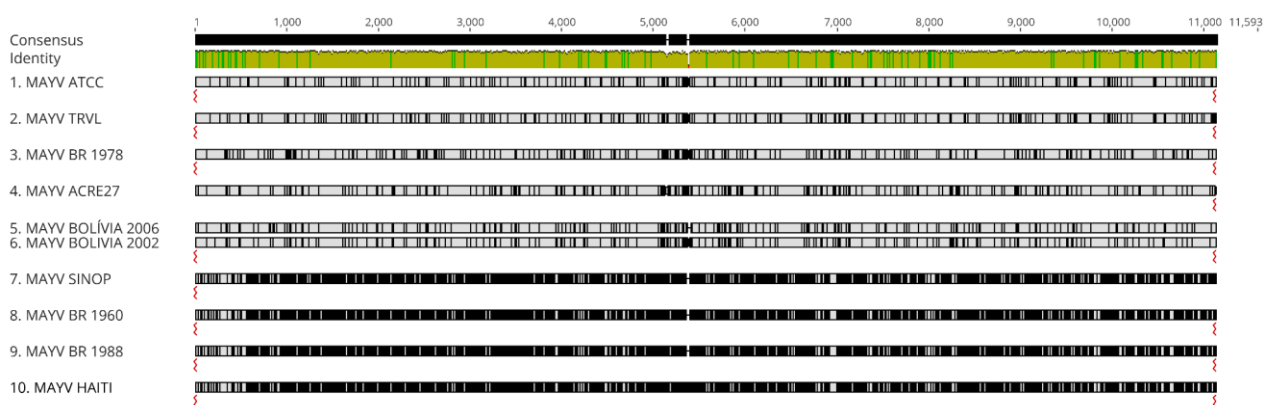


Figura 8: Alinhamento nucleotídico do genoma dos isolados de MAYV. Na parte superior em preto, a sequência consenso gerada a partir do alinhamento pelo algoritmo MAFFT. Em verde e amarelo a comparação entre as sequências demonstrando a identidade entre elas. O preto em cada sequência demonstra zonas de divergência entre elas.

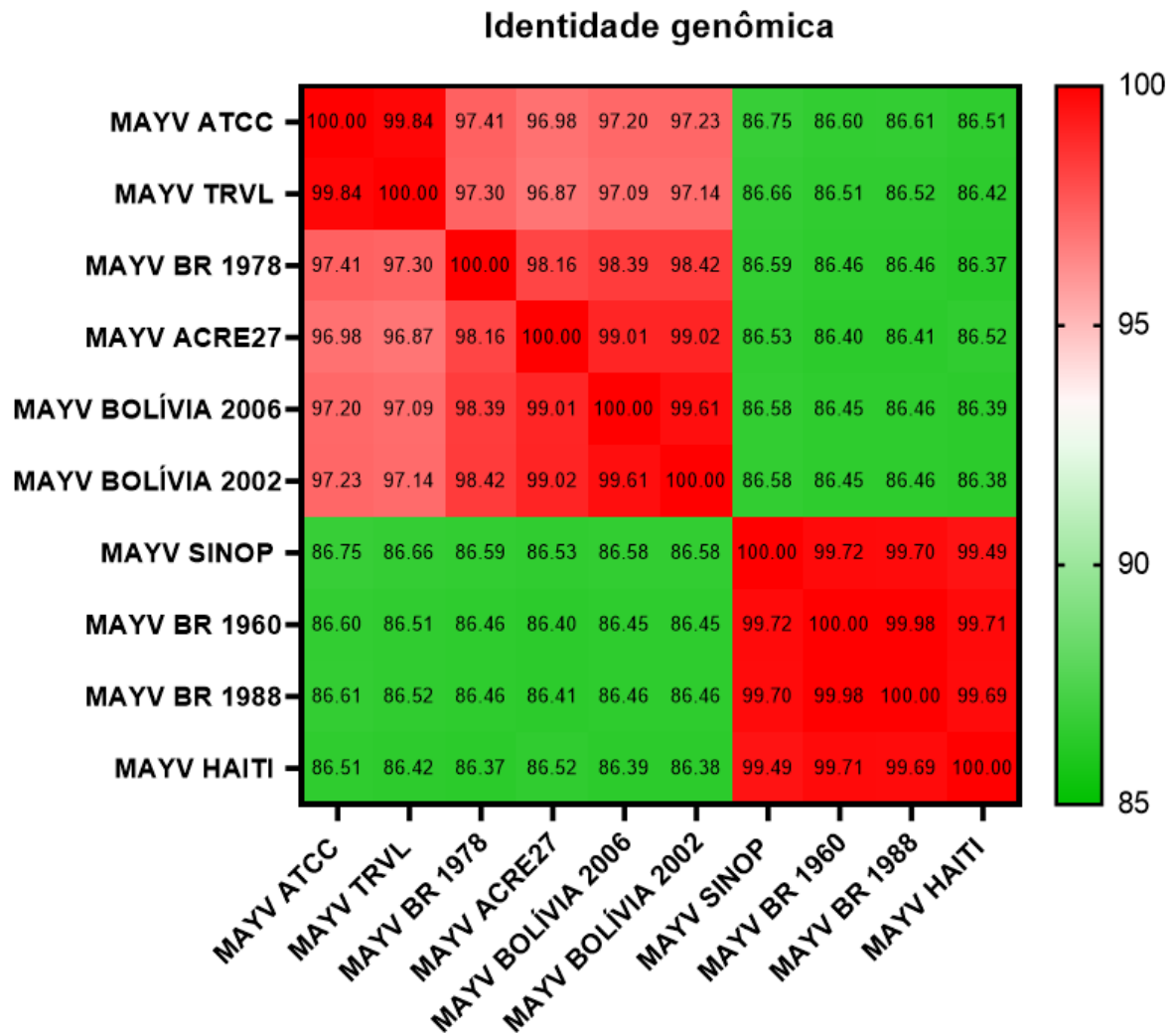


Figura 9: Porcentagem de identidade genômica entre os isolados de MAYV por Heat Map. Segundo a escala, quanto mais forte o tom de verde mais próximo à 80% de identidade genômica, demonstrando menor interação, e quanto mais forte o tom de vermelho mais próximo à 100% de identidade genômica, demonstrando maior interação. Gráfico gerado por GraphPad Prism 9.5.1 a partir dos dados gerados pelo software Geneious prime 2023 pelo alinhamento por *paiwase*.

A análise das sequências alinhadas correspondentes a proteína E1 (Figura 10) e a proteína E2 (Figura 12), localizadas na segunda ORF de leitura do genoma viral (9821-11128 pb e 8375-9640 pb, respectivamente), demonstrou em E1: isolados pertencentes ao genótipo D apresentavam de 97,23% a 99,88% de similaridade; isolados do genótipo L apresentavam de 99,67% a 100% de similaridade nucleotídica; enquanto entre isolados de diferentes genótipos a similaridade nucleotídica foi de 87,71% a 88,74% (Figura 11). Em E2, a similaridade nucleotídica encontrada foi de: entre isolados do genótipo D, 96,28% a 99,68%; entre as isolados do genótipo L, 99,68% a 100%; enquanto entre isolados de genótipos distintos, 85,05% a 86,52% (Figura 13). A comparação entre as sequências de genótipos diferentes demonstrou

perda de 10% de similaridade entre as sequências em relação a comparação entre sequências do mesmo genótipo.

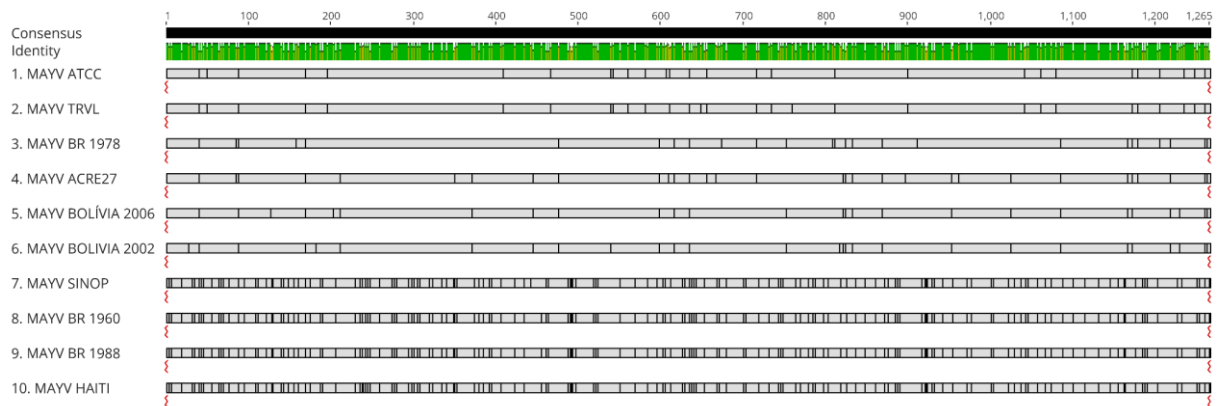


Figura 10: Localização correspondente a sequências correspondentes a proteína E1. Presente na ORF 2, segunda poliproteína. A sequência ATCC foi utilizada como referência para a localização da região.

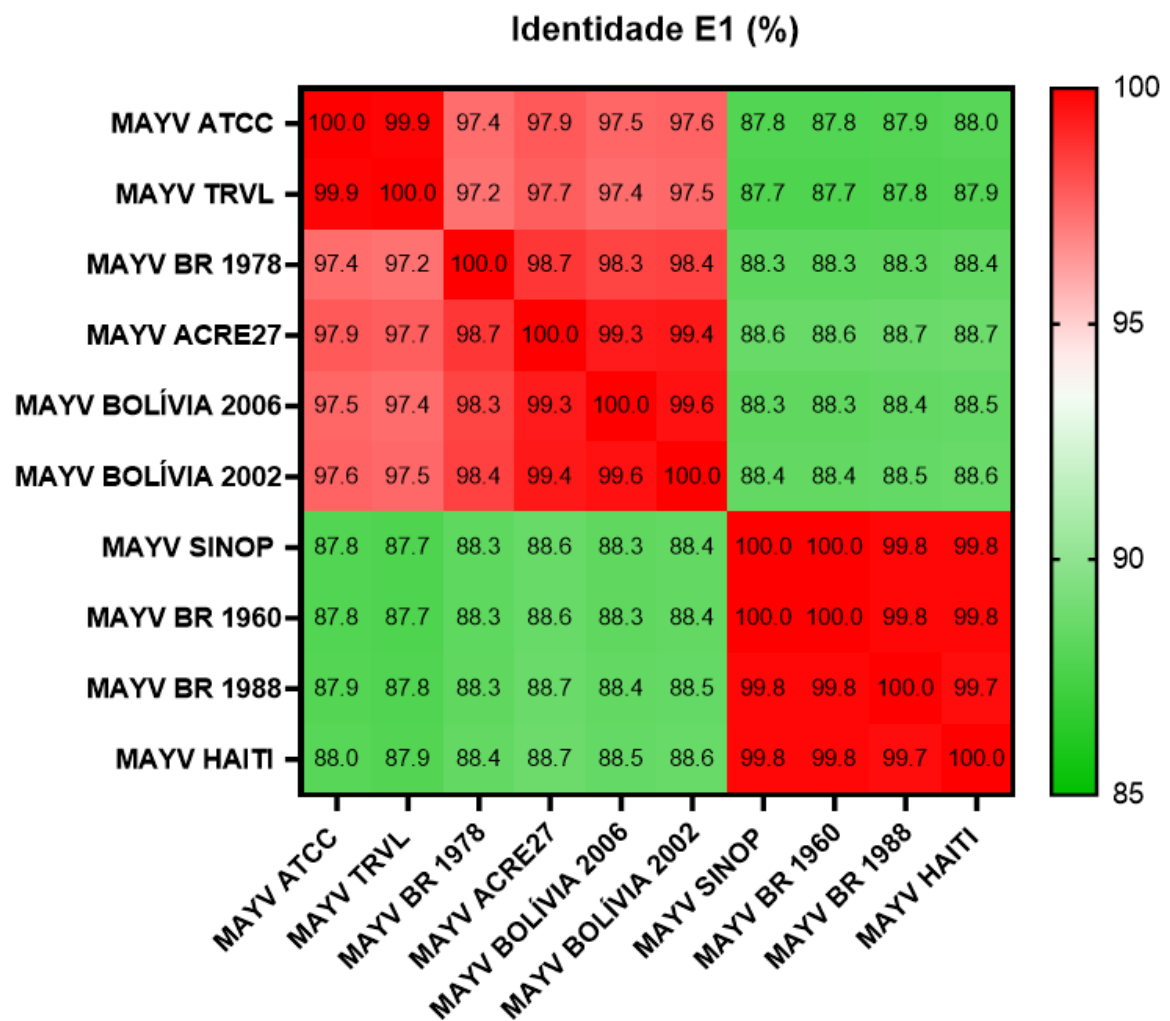


Figura 11: Porcentagem de similaridade entre as sequências correspondentes a proteína E1 das cepas de MAYV. Gerada por alinhamento em pares (*pairwise*) pelo MAFFT no Geneious Prime 2023.

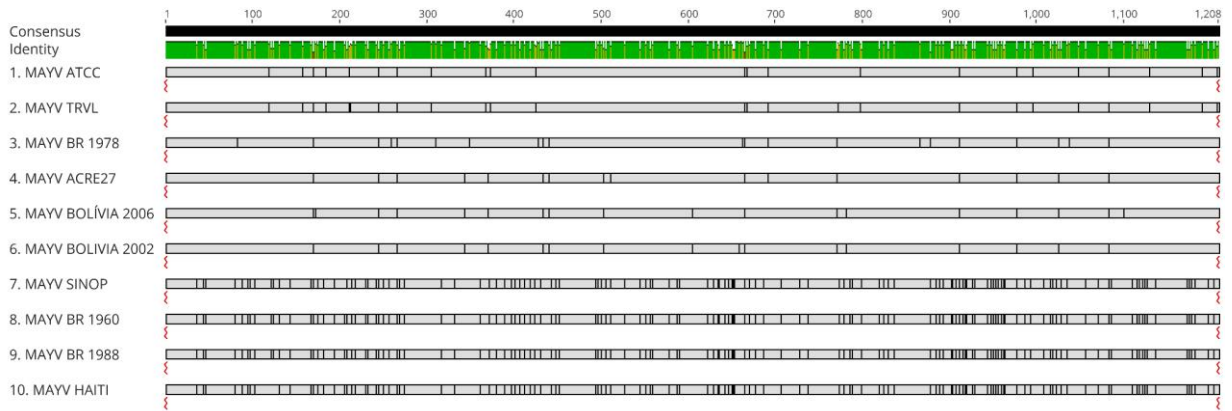


Figura 12: Localização correspondente a sequência correspondente a proteína E2. Presente na ORF 2, segunda poliproteína. A sequência ATCC foi utilizada como referência para a localização da região.

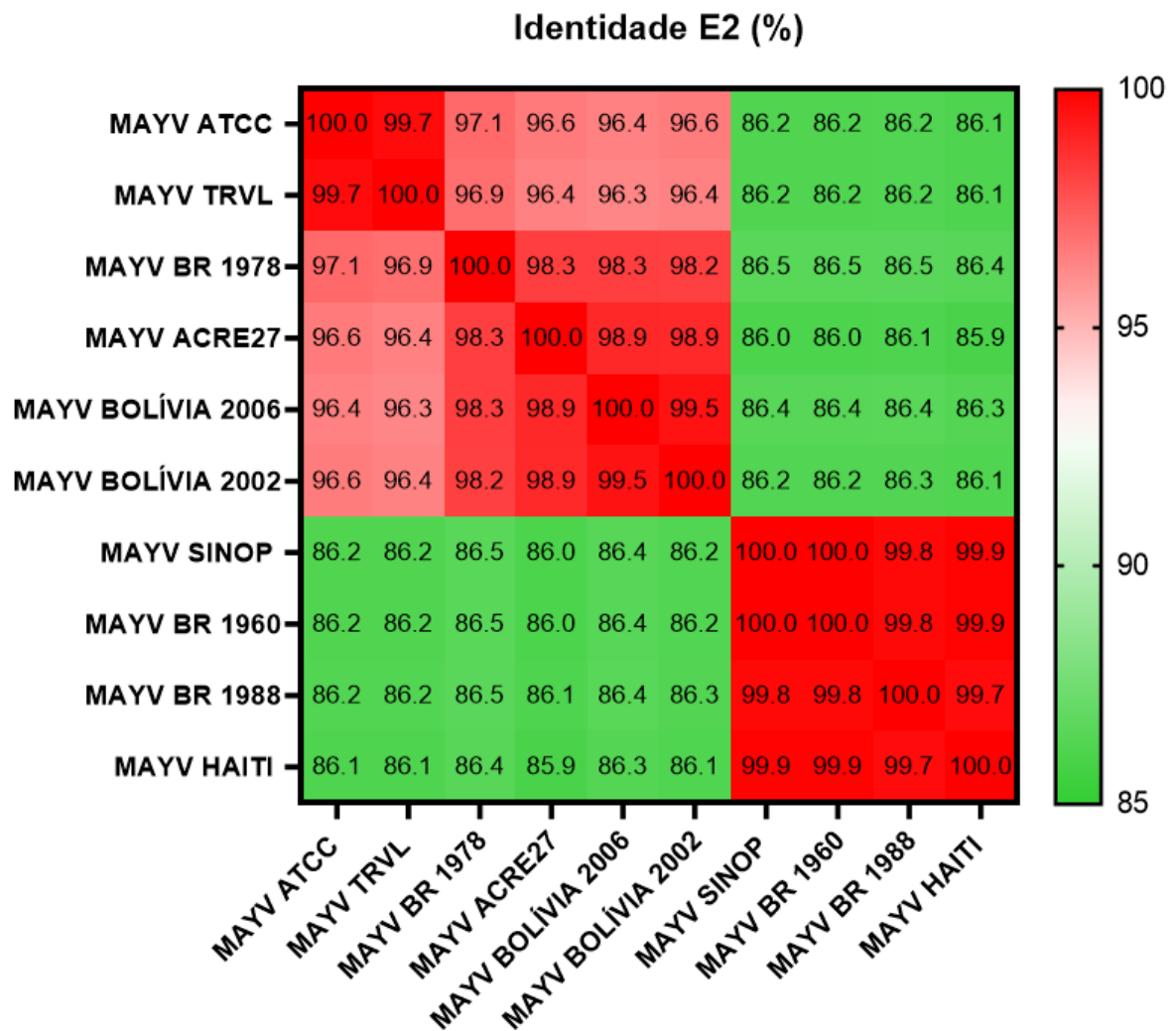


Figura 13: Porcentagem de similaridade entre as sequências correspondentes a proteína E2 dos isolados de MAYV. Gerada por alinhamento em pares (pairwise) pelo MAFFT no Geneious Prime 2023.

Traduzindo as sequências nucleotídicas para sequências de aminoácidos, foi possível encontrar regiões com maiores alterações nucleotídicas que se transformaram em aminoácidos distintos. As regiões que apresentaram mais aminoácidos alterados entre as sequências, principalmente para os isolados do genótipo L, estão localizadas na ORF que codifica para a segunda poliproteína, responsável pela síntese de proteínas estruturais. Analisando a sequência correspondente a proteína E1 (Figura 14), foi possível encontrar 31% de diferenças de aminoácidos entre os isolados do genótipo L e os isolados ATCC e TRVL, do genótipo D. Entre os isolados do genótipo L e os demais isolados do genótipo D, essa diferença aumentou para 32% e entre os isolados do genótipo D, a diferença foi de cerca de 9% (Tabela 1).

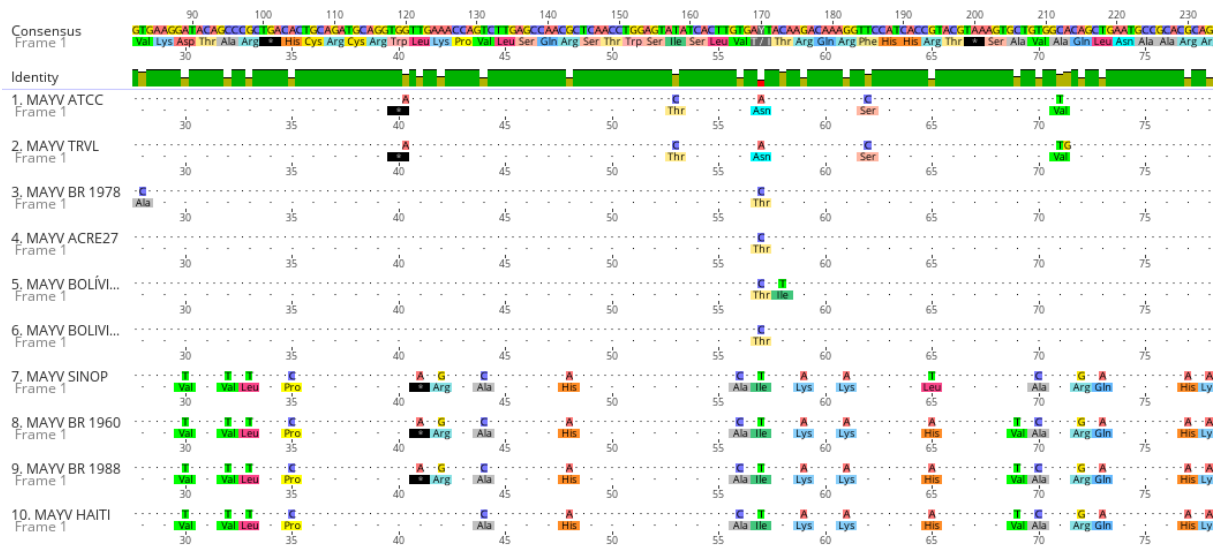


Figura 14: Tradução da sequência de nucleotídeos para aminoácidos da região correspondente a proteína E1 de cada isolado de MAYV. A primeira linha de cada isolado refere-se à sequência de nucleotídeos e a segunda a sequência de aminoácidos gerada por ela.

Tabela 1 - % diferenças de Aminoácidos E1

	<i>Genótipo L^a</i>	<i>Genótipo D^b</i>	<i>Genótipo D^c</i>
<i>Genótipo L^a</i>	0	31	32
<i>Genótipo D^b</i>	31	0	9
<i>Genótipo D^c</i>	32	9	0

a Genótipo L - SINOP

b Genótipo D - ATCC e TRVL

c Genótipo D - ACRE, BR 1978, BOLÍVIA 2006 e BOLÍVIA 2002

Tabela 1: Porcentagem de diferenças de aminoácidos entre os isolados de MAYV na região da proteína E1. Dados gerados por contagem manual de aminoácidos distintos entre os isolados, através da tradução das sequências nucleotídicas para sequências de aminoácidos.

Já para a região codificante para a proteína E2 (Figura 15), foi possível encontrar cerca de 12% de diferenças de aminoácidos entre os isolados do genótipo D, enquanto para isolados do genótipo L em relação a ATCC e TRVL foi de 36%. Entre os isolados do genótipo L e os demais isolados do genótipo D (ACRE, BR 1978, BOLIVIA 2006 e BOLÍVIA 2002) foi encontrado cerca de 39% de diferenças entre os aminoácidos da proteína E2 (Tabela 2).

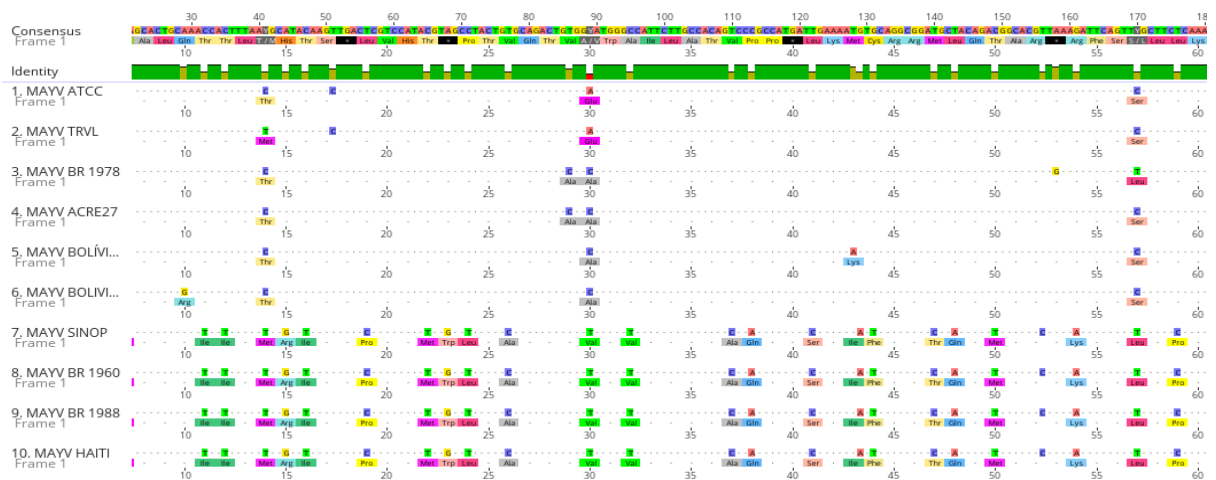


Figura 15: Tradução da sequência de nucleotídeos para aminoácidos da região correspondente a proteína E2 de cada isolado de MAYV. A primeira linha de cada isolado refere-se à sequência de nucleotídeos e a segunda a sequência de aminoácidos gerada por ela.

Tabela 1 - % diferenças de Aminoácidos E2

	<i>Genótipo L^a</i>	<i>Genótipo D^b</i>	<i>Genótipo D^c</i>
<i>Genótipo L^a</i>	0	36	39
<i>Genótipo D^b</i>	36	0	12
<i>Genótipo D^c</i>	39	12	0

a Genótipo L - SINOP

b Genótipo D - ATCC e TRVL

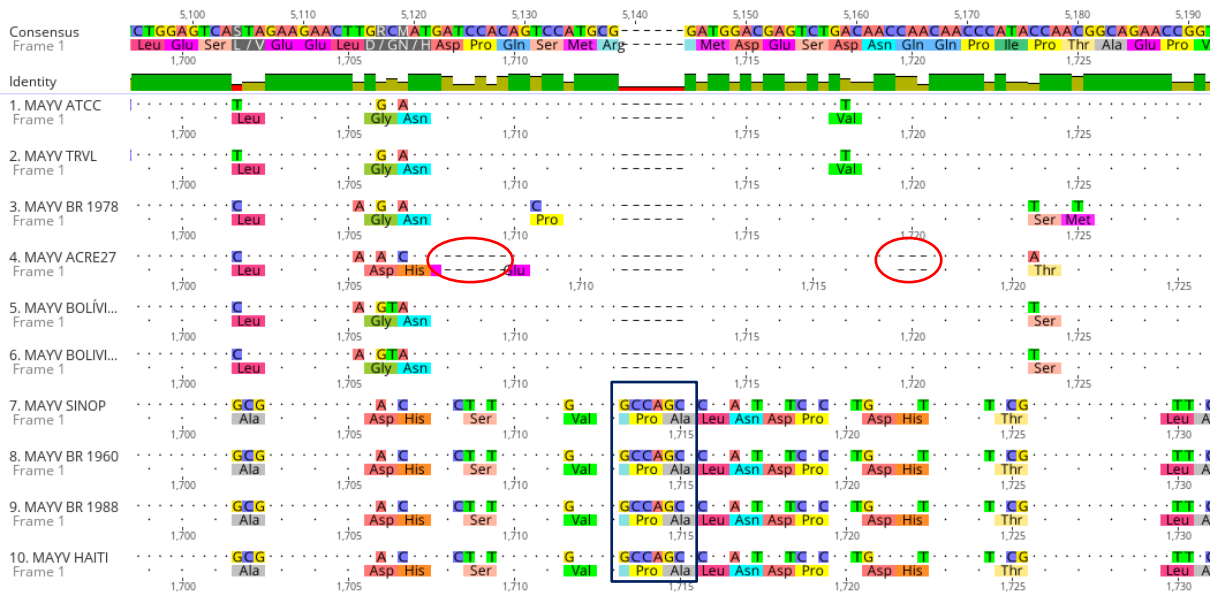
c Genótipo D - ACRE, BR 1978, BOLÍVIA 2006 e BOLÍVIA 2002

Tabela 2: Porcentagem de diferenças de aminoácidos entre os isolados de MAYV na região da proteína E2. Dados gerados por contagem manual de aminoácidos distintos entre os isolados, através da tradução das sequências nucleotídicas para sequências de aminoácidos.

5.2 A região correspondente a uma proteína do complexo replicativo viral apresenta alterações entre as três sequências de isolados

Através do alinhamento foi possível identificar regiões com alterações nucleotídicas, incluindo regiões de deleção e inserção na sequência nucleotídica, que divergiam entre os isolados, principalmente, o isolado do ACRE e os isolados do genótipo L, que apresentavam as mesmas alterações. A região mais alterada está relacionada com a tradução para a proteína NSP3, referente a uma proteína pertencente ao complexo replicase viral. Por consequência, as regiões alteradas geraram divergências na composição de aminoácidos da proteína possivelmente gerada (Figura 16a-b).

a)



b)

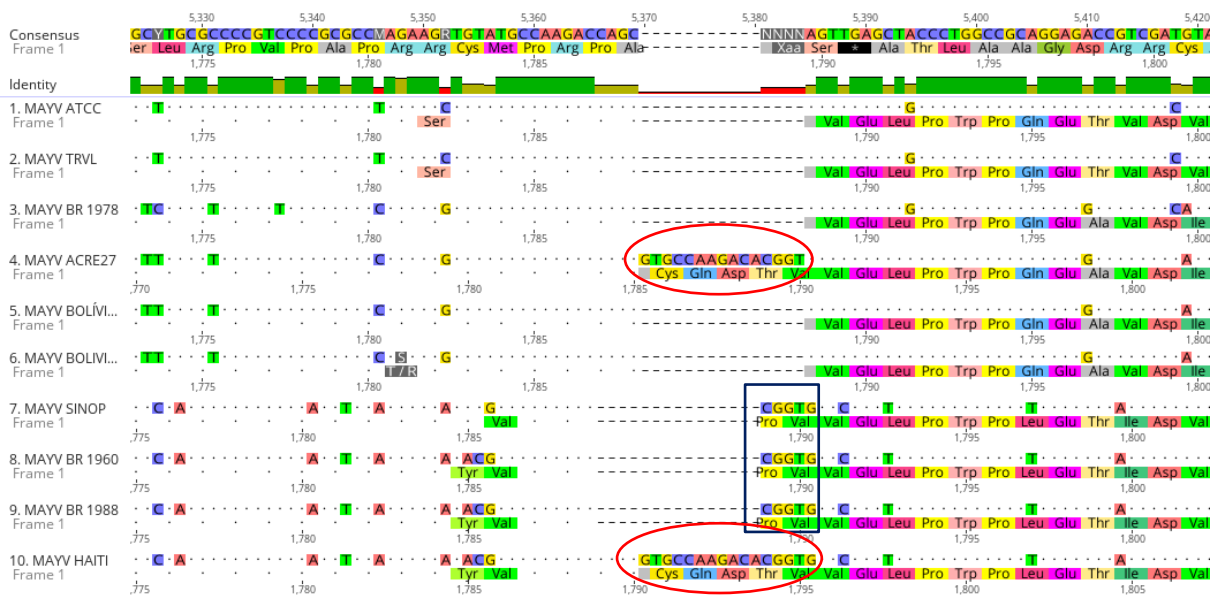


Figura 16: Regiões com alterações nas seqüências nucleotídicas e as conseqüentes alterações na seqüência de aminoácidos codificados. a) Alinhamento das seqüências nucleotídicas e tradução para aminoácidos dos isolados clínicos demonstrando as regiões alteradas, sinalizadas pelos círculos vermelhos na seqüência do isolado ACRE (deleções), e retângulo azul nas seqüências dos isolados do genótipo L (inserção). b) Alinhamento das seqüências nucleotídicas e tradução para aminoácidos dos isolados clínicos demonstrando as regiões alteradas, sinalizadas pelos círculos vermelhos nas seqüências dos isolados ACRE e HAITI (inserção), e retângulo azul nas seqüências dos isolados do genótipo L. Imagens obtidas através do programa Geneious Prime 2023.1.

5.3 O isolado ACRE induz menor área de placa de lise indicando menor capacidade de disseminação

Além da análise genotípica, realizamos uma análise fenotípica comparando o tamanho de placas de lise, em células VERO, formadas por cada estoque propagados em células C636. Nós verificamos diferentes perfis de plaques, com variações no tamanho e morfologia, onde as cepas SINOP e ATCC apresentaram plaque com maior diâmetro (2,681mm e 2,562mm, respectivamente), em comparação ao ACRE (0,817mm). A área média das placas foi para o SINOP = $0,473 \pm 0,096 \text{ mm}^2$; ATCC = $0,312 \pm 0,034 \text{ mm}^2$; e ACRE = $0,110 \pm 0,018 \text{ mm}^2$. Indicando assim uma capacidade menor de disseminação do ACRE em comparação aos demais (Figura 17).

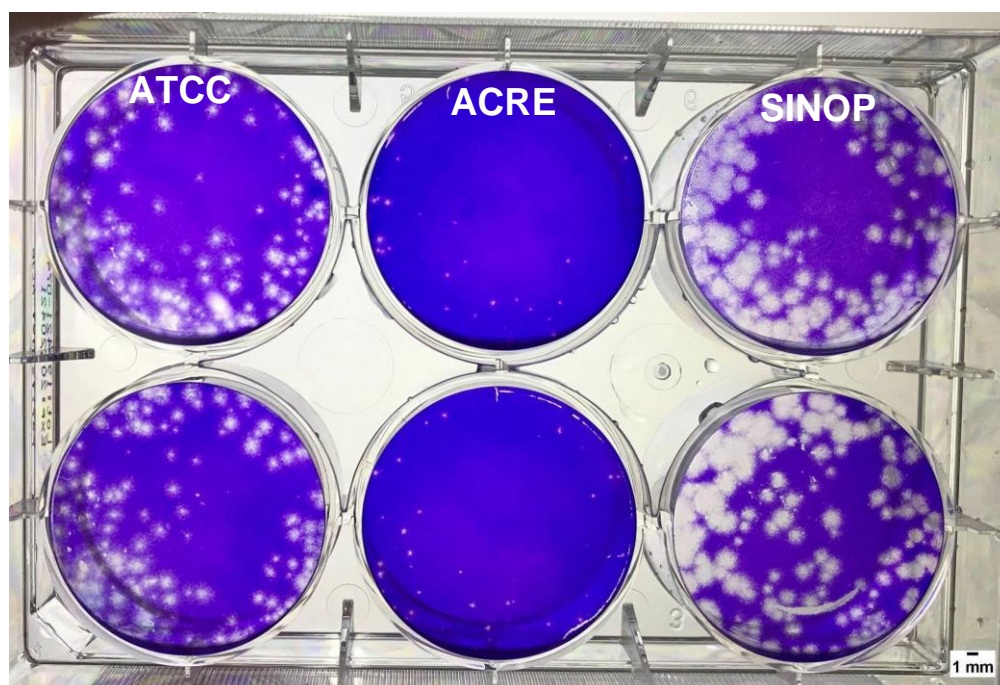


Figura 17: O SINOP apresenta maior capacidade de disseminação em relação aos isolados ATCC e ACRE. Comparação de placas de lise pela infecção em células VERO com isolados propagados em células C636, com infecção de 100 PFU de cada isolado por poço, em meio sólido de ágar. Medição da área das placas realizada pelo software ImageJ Java 1.6.0_20, através da média entre as placas demonstrou: SINOP = $0,473 \pm 0,096 \text{ mm}^2$; ATCC = $0,312 \pm 0,034 \text{ mm}^2$; e ACRE = $0,110 \pm 0,018 \text{ mm}^2$.

5.4 Os MAYV ATCC e SINOP apresentam replicação viral semelhante em mioblastos C2C12

Nosso próximo passo foi avaliar a replicação dos diferentes MAYVs em células miogênicas indiferenciadas (mioblastos). Para isso, mioblastos de linhagem C2C12 foram infectados com as MOIs de 1 e 0,1, de isolados propagados em C636, e a formação de partículas infecciosas foi analisada em 48 hpi por titulação. Foi possível observar que a infecção dos

MAYVs, ATCC e SINOP, apresentaram uma carga viral no sobrenadante semelhante em 48hpi, independente das MOI utilizadas (1 e 0,1), com uma amplificação do título viral de 10^3 (0 hpi) a 10^8 (48hpi) partículas infecciosas (PFU/ml). Enquanto a replicação viral do isolado do ACRE, apresentou uma amplificação do título viral de 10^3 (0 hpi) a 10^5 (48hpi) (PFU/ml), em MOI=1, e se manteve em 10^3 (48 hpi) para a MOI=0,1. Apresentando diferenças significativas em comparação aos demais isolados tanto em MOI=1 quanto em MOI=0,1, em 48 hpi, (Figura 18).

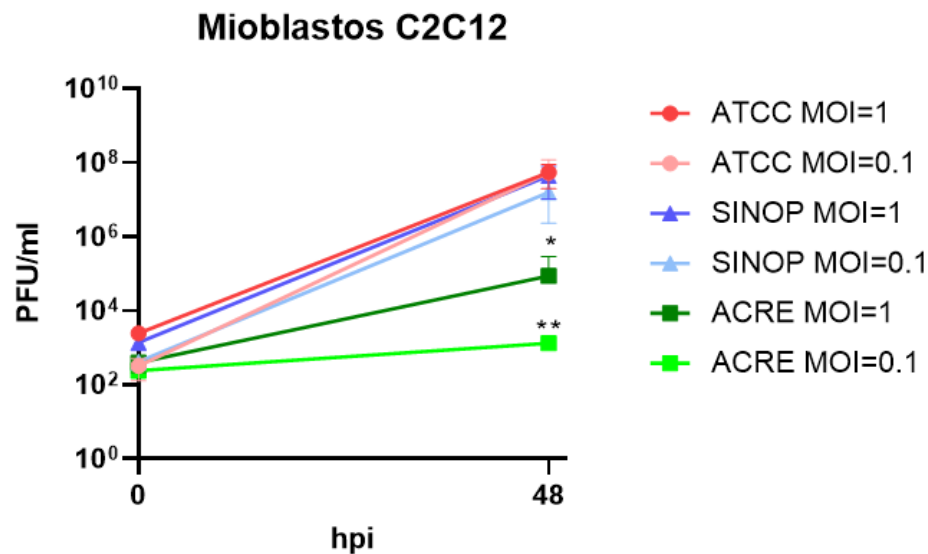


Figura 18: Curva de replicação dos MAYVs em mioblastos C2C12. Mioblastos foram infectados com MAYVs propagados em células C636 com multiplicidade de infecção de 1 e 0,1. A produção de partículas infecciosas foi determinada por ensaio de placa de lise nos tempos de 0 e 48 hpi. N experimental =2. Replicatas experimentais n=7. Análises estatísticas realizadas por Teste ANOVA de duas vias seguido por comparação múltipla pelo método de Turkey. * $p < 0,05$ para comparação entre ATCC MOI=1 e 0,1 e ACRE MOI=1. ** $p < 0,005$ para comparação entre ATCC MOI=1 e 0,1 e ACRE MOI=0,1.

5.5 A viabilidade celular dos mioblastos C2C12 se mantém acima de 80% em todas as condições de infecção com os isolados de MAYV propagadas em células C636

A viabilidade celular dos mioblastos C2C12 infectados foi determinada por ensaio de MTT no tempo de 48 hpi. A infecção por isolados propagados em células de artrópodes C636, apresentou viabilidade celular acima de 80% por todos os MAYVs, em todas as condições, em relação ao MOCK (Figura 19).

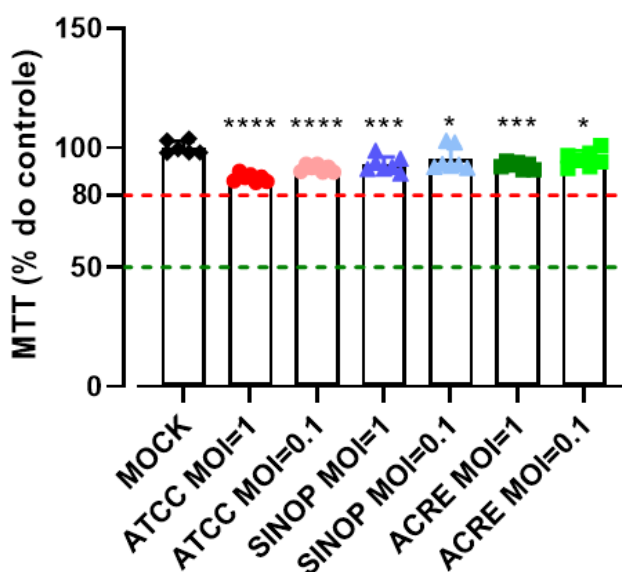


Figura 19: Viabilidade Celular dos mioblastos C2C12 infectadas com os isolados propagados em células C636. Viabilidade celular medida por ensaio colorimétrico por MTT. N experimental =2. Replicatas experimentais n=7. Análises estatísticas realizadas por Teste ANOVA de uma via seguido por comparação múltipla pelo método de Dunnett. *p<0,05, ***p<0,0005, ****p<0,0001.

5.6 Os apresentam diferenças na capacidade de replicação em miotubos C2C12

Mioblastos C2C12 foram diferenciadas em miotubos e, posteriormente, infectadas com cada isolado clínico, propagado em células C636 e VERO, em uma (MOI) de 1 e 0,1. O experimento foi acompanhado diariamente e analisado nos tempos 0, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Foi possível observar que todos os isolados replicaram eficientemente nos miotubos murinos (Figura 20).

Coerente com o observado na formação de placa de lise, o isolado ACRE, propagado em C636, apresentou menor amplificação em miotubos até 48 hpi, principalmente, na infecção com a MOI de 0.1. Enquanto os isolados ATCC e SINOP obtiveram amplificação semelhante entre si, com o pico de replicação alcançado 24 hpi para infecção pelo o MAYV ATCC e 48 hpi para o isolado de SINOP (Figura 20a). O isolado ATCC apresentou, em seu pico de replicação viral, um título de cerca de 10^8 partículas infecciosas mantendo essa grandeza até 48 hpi. A replicação viral do isolado SINOP demonstra, nas primeiras 24 horas, um aumento significativo de 10^3 para 10^6 partículas virais geradas em ambas as multiplicidades de infecção.

Nós também comparamos a infecção de miotubos utilizando os MAYVs propagados em VERO. O pico de replicação para os MAYVs ATCC e SINOP foi atingido em 24 hpi, enquanto

ACRE, somente em 48 hpi. O isolado ATCC apresenta maior amplificação viral, distanciando dos demais isolados em todos os tempos e se aproximando, somente, em 48 hpi (Figura 20b). A replicação por ACRE e SINOP demonstrou similaridade em todos os momentos verificados, atingindo o platô após 24 hpi.

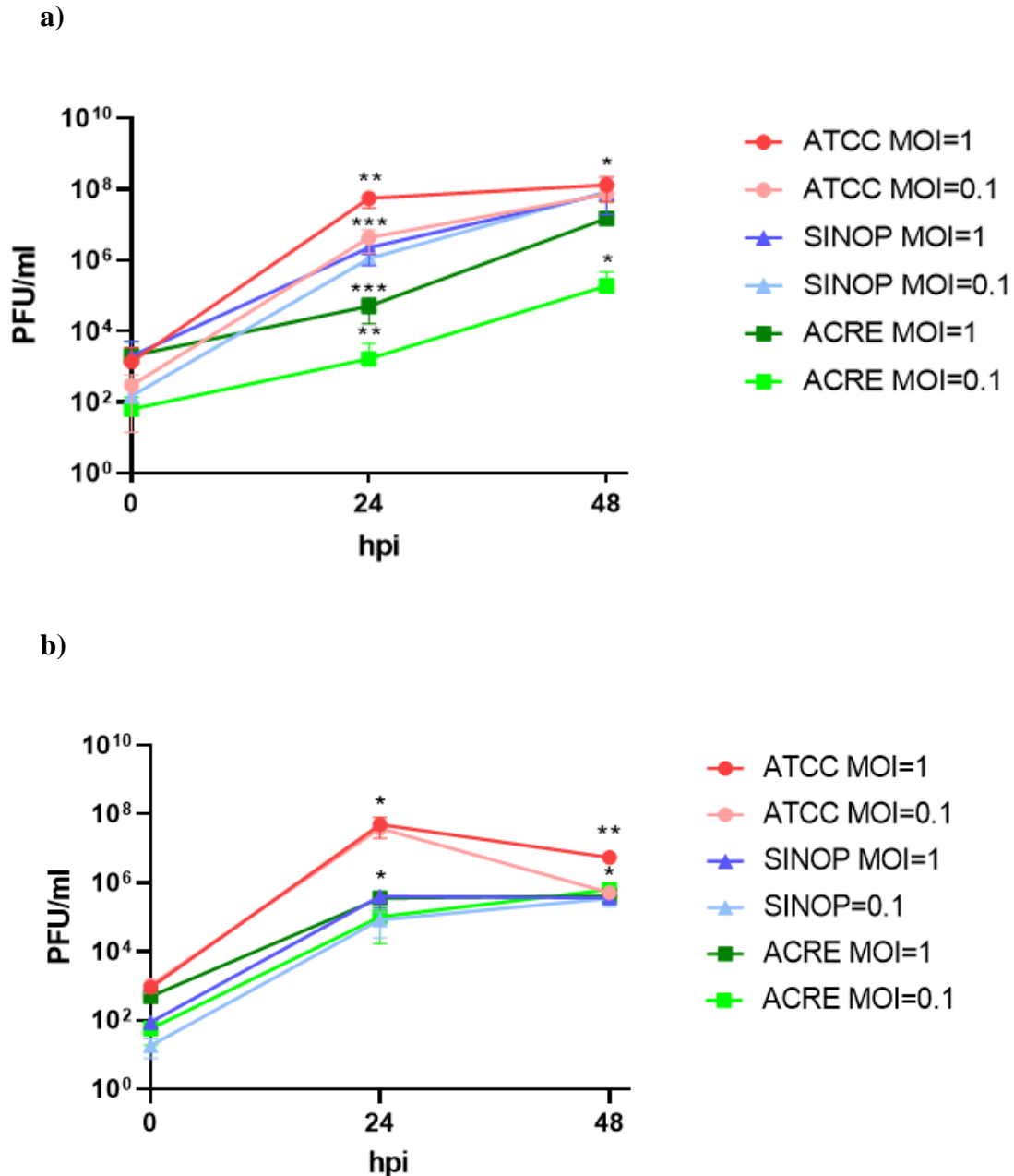
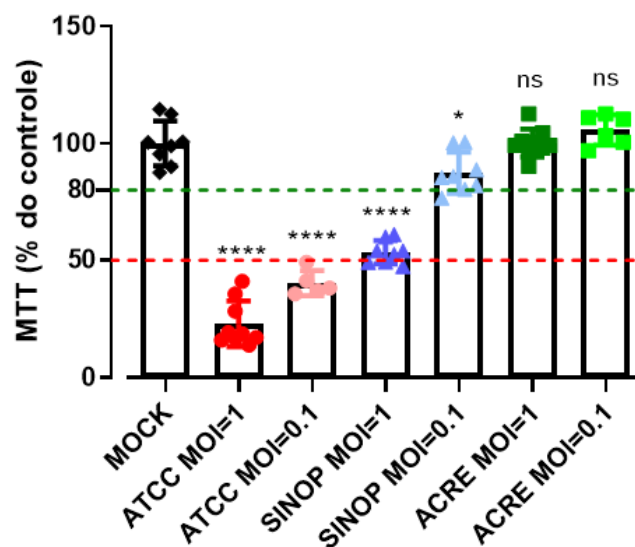


Figura 20: Curva de replicação dos isolados propagados em células de artrópodes e de mamíferos na infecção de miotubos C2C12. Análise do título viral gerado por isolados de MAYV em células C2C12 diferenciadas. As partículas infecciosas foram quantificadas no sobrenadante por ensaio de placa de lise nos tempos de 0, 24 e 48 hpi. Análises estatísticas realizadas por Teste ANOVA de duas vias seguido por comparação múltipla pelo método de Turkey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$, ns= não significativo.

5.7 A infecção por isolados recentes de MAYV induz menor redução da viabilidade dos miotubos C2C12 em relação ao ATCC

A viabilidade celular das miotubos C2C12 infectadas foi medida por ensaio de MTT no tempo de 48 hpi, devido a indução rápida de morte celular por ATCC e SINOP em comparação com ACRE, principalmente, ATCC MOI=1. A infecção por isolados de MAYV, propagados em células C636, demonstrou 95% de viabilidade celular na infecção pelo isolado ACRE, em ambas MOIs testadas e 35% e 60% na infecção por ATCC e SINOP, respectivamente, em MOI=1 (Figura 21a). O mesmo perfil foi observado na infecção dos miotubos com MAYVs propagados em células VERO, em que a viabilidade celular em 48 hpi foi maior que 90% na infecção pelo isolado ACRE, entretanto, a infecção por SINOP demonstrou 30% de viabilidade celular em MOI=1 e 60% de viabilidade celular em MOI=0,1. A infecção pelo isolado ATCC reduz significativamente a viabilidade celular em 48 hpi, ficando abaixo de 20% em ambas MOI (Figura 21b). Apesar de manter a capacidade de infecção em miotubos, o isolado ACRE aparenta uma replicação menos eficiente nesse modelo *in vitro* em relação aos demais isolados, evidenciado pela menor indução de morte celular (Figura 21b).

a)



b)

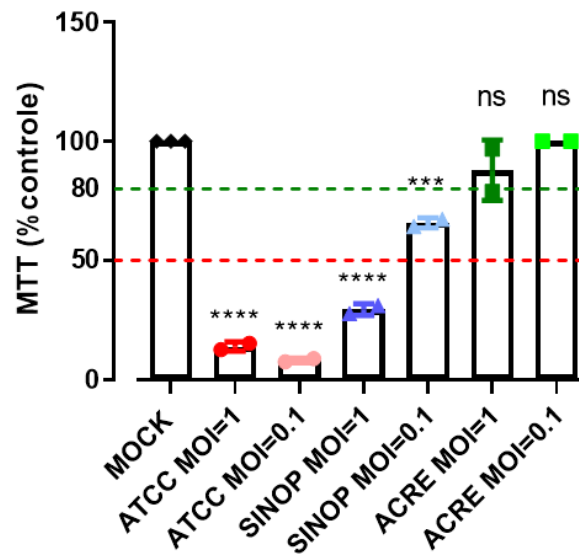


Figura 21: Viabilidade Celular das miotubos C2C12 infectadas com os MAYVs propagados em células C636 e VERO. Miotubos C2C12 foram infectados com a) MAYVS propagados em células C636 e b) MAYVs propagados em células VERO. Após 48 h de infecção a viabilidade celular foi estimada por ensaio de MTT, em % da metabolização do grupo controle (Mock). N experimental =4 em C636, e 1 em VERO. Replicatas experimentais de C636: n=8 para MOCK, n=9 para ATCC MOI=1; n=5 para ATCC MOI=0.1; n=8 para SINOP MOI=1 e 0,1; n=9 ACRE MOI=1 e n=6 para MOI=0,1. Replicatas experimentais de VERO: n=3 para MOCK; n=2 para as demais condições. Análises estatísticas realizadas por Teste ANOVA de uma via seguido por comparação múltipla pelo método de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$, ns= não significativo.

5.8 O isolado SINOP, do genótipo L, apresenta maior virulência em modelo experimental de camundongos

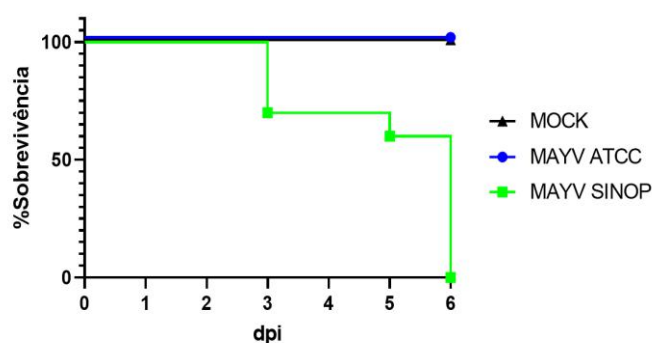
Nosso próximo passo foi comparar a infecção por vírus de genótipos distintos e que apresentaram replicação e redução da viabilidade celular semelhantes. Neste primeiro momento, infectamos animais com os isolados ATCC e SINOP, não infectando com o isolado ACRE que demonstrou um perfil atenuado nos experimentos anteriores. Utilizamos o modelo de infecção em camundongos SV129 WT jovens já estabelecidos pelo grupo de laboratório (Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019), porém com uma dose de infecção subletal. Comparamos inicialmente as diferenças entre a doença induzida pelos isolados virais ATCC e SINOP somente oriundos de células de artrópode (C636), na qual foi possível observar que a infecção com o MAYV SINOP promoveu sinais clínicos de doenças mais severas do que o MAYV ATCC quando avaliamos: a sobrevivência; o percentual de ganho de peso e o edema da pata (Figura 22). Na infecção pelo SINOP, alguns animais morreram a partir do segundo dia após infecção, e este apresentou uma letalidade de 100% no sexto dia de infecção. Diferentemente,

não foi observado morte dos camundongos inoculados com Mock e MAYV ATCC (22a) O ganho de peso pelos animais infectados com SINOP apresentou uma baixa em 2 dpi, comum a outros modelos de infecção de MAYV, no entanto, esse ganho de peso foi se reestabelecendo até o 4º dia e, após isso, diminuiu gradativamente até o 6 dia, precisando ser interrompido o experimento devido à baixa nutrição deles. Enquanto o ganho de peso de animais infectados com ATCC demonstrou uma estabilidade desde o dia 1 até o dia 6, sem o aumento do peso corporal natural do crescimento evidenciado no MOCK (Figura 22b).

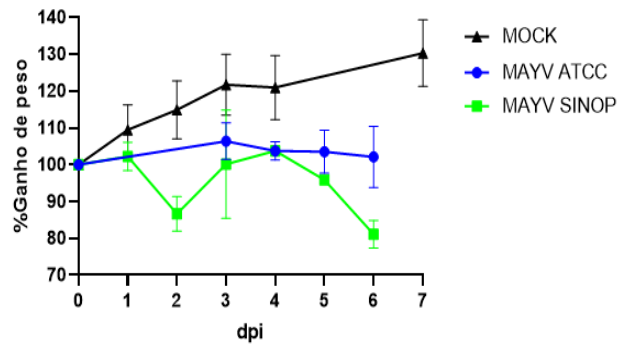
O edema da pata infectada, o qual é característico do processo inflamatório neste modelo, medido diariamente por paquímetro digital, foi maior na infecção por SINOP em relação ao ATCC, demonstrando maior indução de edema por esse isolado desde o dia 1 de infecção e, curiosamente, demonstrou um novo aumento a partir do dia 5, no qual seria evidenciado a resolução da inflamação local (Figura 22c).

A análise da carga viral nos tecidos dos animais infectados demonstrou que a carga viral do isolado SINOP foi maior nos músculos gastrocnêmio e quadríceps direito (contralateral) e esquerdo (ipsilateral), em 6 dpi (Figura 22d-e, respectivamente). Ambos os MAYVs demonstraram alta carga viral nos joelhos, mas não apresentou diferenças significativas entre os isolados no joelho esquerdo, entretanto, demonstrou carga maior, para o isolado SINOP, em 6 dpi no joelho direito, demonstrando maior disseminação viral por esse isolado pelo organismo (Figura 22f). De igual forma, apresentou alta carga viral nas patas dos animais, porém não refletiu em diferenças significativas na pata esquerda traseira, sendo significativo na pata direita em 3 e 6 dpi para o isolado SINOP (Figura 22g). Analisando outro sítio de infecção para alfavírus, o cérebro dos animais infectados com o isolado SINOP e com o isolado ATCC, não demonstrou diferenças significantes da carga viral entre eles em nenhum tempo analisado (Figura 22h).

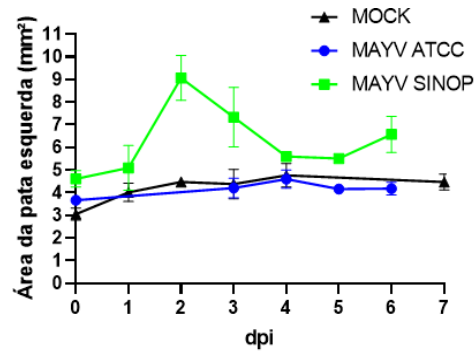
a)



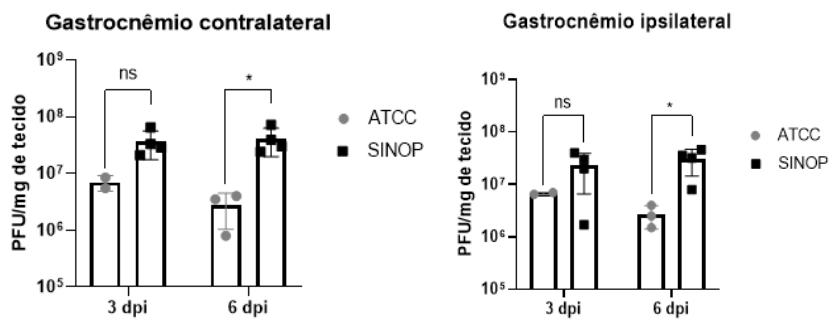
b)



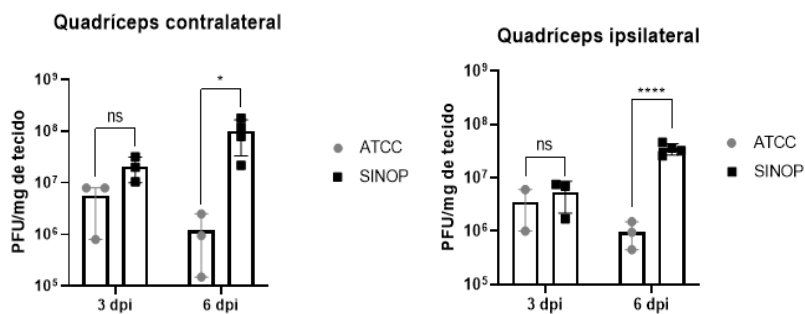
c)



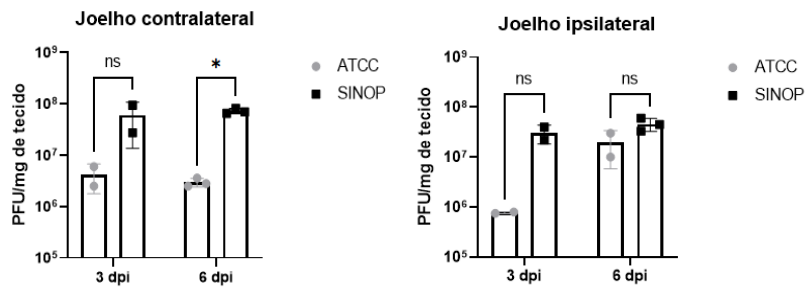
d)



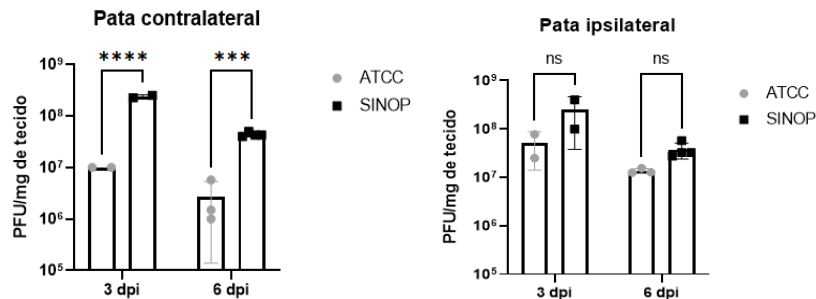
e)



f)



g)



h)

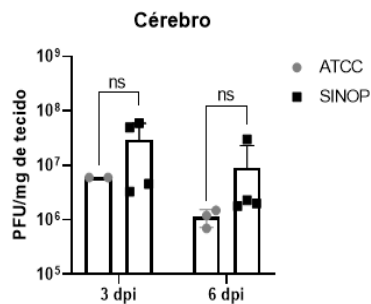


Figura 22: O MAYV SINOP apresenta maior virulência *in vivo* comparado ao MAYV referência ATCC. Animais infectados subcutaneamente na pata esquerda traseira com 10⁵PFU dos ATCC e SINOP propagados em células C636. Acompanhados diariamente até 6 dpi, com pesagem e medição de patas, por paquímetro digital. A quantificação da carga viral nos tecidos foi determinada pelo ensaio de plaque em células VERO. a) Taxa de sobrevivência dos animais durante os dias de infecção. b) Percentual de ganho de peso diário, obtido pela razão entre o peso (g) vezes 100 e o peso apresentado no dia de infecção. c) Área da pata dos animais medido diariamente, obtido pelo cálculo da área entre as medidas horizontal e vertical do metatarso. Carga viral dos animais infectados por ATCC e SINOP em 3 e 6 dpi nos tecidos: d) Músculos gastrocnêmio; e) Músculos quadríceps; f) Joelhos; g) Patas; e h) Cérebro. N experimental=2, n animal: MOCK n=4; ATCC n=5; SINOP n=10. *p<0,05, ***p<0,0005, ****p<0,0001, ns= não significativo.

6 DISCUSSÃO

O MAYV é um vírus endêmico nas Américas do Sul e Central e no Caribe, com maior incidência de casos reportados no Brasil desde a sua descoberta, a cerca de 70 anos atrás. Apesar disso, ainda apresenta muitas limitações em relação ao conhecimento da sua evolução e, principalmente, epidemiologia. Um estudo de 2006, sequenciou os genes das proteínas de envelope E1 e E2 e a região não codificante 3' completa de 63 isolados de MAYV, que correspondiam às áreas geográficas e temporais onde ele já havia sido encontrado. Através de análises filogenéticas, eles identificaram a existência de 2 genótipos distintos de MAYV. O genótipo D (disseminado), amplamente encontrado nas Américas, apresentava alta conservação do genoma, com menos de 6% de divergências nucleotídicas entre os seus isolados. O genótipo L (limitado), que só apresentava circulação no Brasil durante o estudo, mas recentemente foi encontrado no Haiti (Lednicky, Rochars, *et al.*, 2016), apresentando menos de 4% de divergência entre os seus isolados, porém divergiam em, aproximadamente, 19% dos isolados do genótipo D (Powers, Aguilar, *et al.*, 2006). Estudos filogenéticos mais recentes indicaram a existência de um terceiro genótipo de MAYV, denominado de N (novo), de um isolado do Peru em 2010, onde esse divergia dos isolados D e L já sequenciados (Auguste, Liria, *et al.*, 2015). Em 2017, um estudo evolutivo espaço-temporal com as sequências completas do genoma do MAYV dos últimos setenta anos, demonstrou um evento comum a vírus de genoma de RNA, as recombinações entre sequências virais de genótipos diferentes, relatando pela primeira vez a detecção de cepas híbridas D/L, nos isolados do Brasil (2014) e Haiti (2015). A cepa híbrida do Brasil (2BR14) foi identificada como sendo recombinante entre as cepas 3BR61 (genótipo L), isolada de carrapato, mas intimamente relacionada com a cepa 1BR60 (MAYV BR 1960) derivada de mosquito, e a cepa 30BR04 (ACRE27), do genótipo D. A cepa híbrida do Haiti, por sua vez, é resultado da recombinação gênica entre a cepa recombinante 2BR14 com a sua parental 30BR04 (ACRE27) (Mavian, Rife, *et al.*, 2017). Tais evidências demonstram a evolução recente de MAYV apresentando pouco monitoramento epidemiológico, o que pode subestimar a verdadeira circulação e expansão demográfica desse vírus. Nosso estudo demonstrou que as cepas de MAYV do genótipo D apresentam dois perfis de evolução, possivelmente referentes a ordem cronológica e região de circulação, mas que permanecem dentro dos valores de conservação genômica do clado, com mais de 96% de identidade de sequência nucleotídica e 90% de identidade de sequência de aminoácidos. Já as cepas do genótipo L, apresentam seu genoma extremamente conservado, com quase 100% de identidade na sequência nucleotídica e de aminoácidos. Em concordância com as evidências filogenéticas

entre as cepas de MAYV, os genótipos D e L apresentam similaridade nas sequências nucleotídicas por volta de 80%, em todo o genoma. A comparação filogenética entre sequências de MAYV alocadas no clado L, demonstrou um equívoco em relação a um isolado do HAITI, em que este apresentou modificações no genoma compatível com isolados do genótipo D e L, sendo, possivelmente, um vírus recombinante entre genótipos, assim como outro isolado do mesmo país detectado um ano depois.

Algumas famílias de vírus de genoma RNA de cadeia positiva, como *Coronaviridae*, *Togaviridae* e *Hepeviridae*, codificam para proteínas ADP ribosil hidrolase, que são enzimas importantes na montagem do complexo replicativo viral, recrutando um conjunto de cofatores codificados pela célula hospedeira. É uma modificação pós traducional relacionado com o metabolismo básico celular, através da transferência de unidades ADP-ribose (ADPr) do cofator redox β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NAD⁺) para uma variedade de resíduos na proteína alvo, podendo controlar diversos processos celulares e virais, como transcrição, degradação de proteínas e resposta ao estresse (Johannes, Palazzo, *et al.*, 2020). Em alfavírus, essa proteína é a nsp3, que apresenta três domínios em sua sequência: um macrodomínio N-terminal (MD) altamente conservado, conhecido como domínio X; um domínio de oligomerização de ligação ao zinco, denominado domínio Zn; e um domínio hipervariável C-terminal (HVD), desordenado e altamente fosforilado por Ser/Thr. Este último apresenta pouca conservação entre as espécies, mas está intimamente relacionado com a interação com os cofatores do hospedeiro (Aymeric Neyret, Bernard, *et al.*, 2022). Apesar de não ser totalmente compreendido o mecanismo dos domínios MD, estes são conhecidos pela importância na replicação viral, pois apresentam capacidade de neutralizar a resposta protetora do hospedeiro, através da ação contrária a PARPs (poli ADP-ribosil polimerases) antivirais do hospedeiro, induzidas por interferon do tipo I (Welsby, D. Hutin, *et al.*, 2014). As PARPs são importantes proteínas reguladoras de mecanismos de estresse celular mediado por proteínas G3BPs, que regulam o metabolismo de RNA celular através da formação de grânulos citoplasmáticos (SGs), sequestrando mRNAs e proteínas em situações de estresse, como hipóxia e infecções virais. Como as G3BPs podem interferir na replicação viral, os alfavírus desenvolveram mecanismos em resposta a ação delas, apresentando uma região de ligação a G3BPs em seu domínio HVD, onde impedem a formação de grânulos de estresse citoplasmáticos e, conseqüentemente, desligam mecanismos de resposta imune e de parada de transcrição celular (Abraham, Hauer, *et al.*, 2018; Aymeric Neyret, Bernard, *et al.*, 2022). O domínio hipervariável de nsp3 suporta diversas modificações no seu gene em modelos de cultura de tecido, mas pode resultar em

atenuação da virulência em modelos in vivo de camundongos (Rupp, Sokoloski, *et al.*, 2015; Mcpherson, Abraham, *et al.*, 2017). HVD de nsp3 de alfavírus, também demonstra uma interação com a especificidade do mosquito vetor, em que determina a taxa de infecção em mosquitos *Aedes albopictus* (Fros, Geertsema, *et al.*, 2015) e *Aedes aegypti* (Göertz, Marit Lingemann, *et al.*, 2018). Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, diferenças apresentadas na região correspondente à proteína nsp3 do MAYV, em diferentes genótipos. Os isolados do genótipo L apresentaram uma conservação das mudanças encontradas nessa região, com duas regiões de inserção nucleotídica (6 nucleotídeos de 5139-5145 e 5 nucleotídeos de 5381-5386) que resultaram no acréscimo de quatro novos aminoácidos (Prolina e Alanina e Prolina e Valina, respectivamente). A presença do vírus ACRE27 no nosso estudo, demonstrou que este apresenta duas regiões de deleção na sequência nucleotídica da nsp3 (5123-5129 e 5164-5167) e uma inserção de 15 nucleotídeos (5370-5385), que resultaram em 5 novos aminoácidos (Cisteína, Glutamina, Aspartato, Treonina e Valina). Este último demonstrou uma conservação entre isolados híbridos como o isolado HAITI e que, possivelmente, ACRE27 é também uma cepa parental a esse híbrido, assim como o outro isolado, já relacionado, do mesmo país. As modificações na nsp3 de isolados brasileiros do MAYV, levantam a hipótese de competência a outros mosquitos vetores do vírus, devido ao aumento da incidência do número de casos de Febre Mayaro nos últimos anos no país, além de aumentar o alerta para um aumento da virulência desses vírus em um contexto de melhoria do escape da resposta imune e celular a infecção viral, uma vez que alterações no domínio HVD podem configurar a inibição da ação de PARPs e maior sequestro de G3BPs.

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares associados a replicação viral e a patogênese do MAYV, seguem sendo escassos, tão pouco em relação às diferenças apresentadas entre os genótipos ou entre a evolução temporal do vírus. A inoculação de diferentes cepas de MAYV, com baixas passagens celulares, em culturas de células de embrião de galinha, em 1967, demonstrou que estes produziam placas com diâmetros diferentes, estando relacionadas com alterações antigênicas e, conseqüentemente a alterações nas lesões induzidas pelo vírus em camundongos recém-nascidos (Pinheiro, F. P.; Dias, L. B., 1967). Nosso estudo demonstrou que cepas diferentes de MAYV e, principalmente, de genótipos diferentes, induzem morfologia distinta de placas em culturas de células de mamíferos. A relação com a sinalização celular de um processo infeccioso mediado por IFN, pode contribuir para a diminuição da área de placa evidenciada pelo isolado do ACRE, uma vez que alterações na nsp3 estão relacionadas diretamente às defesas celulares contra a replicação viral. Tal fato, pode

elucidar o mecanismo de indução de placa com maior área pelo isolado SINOP, em que, possivelmente, este adquiriu a capacidade de modular a sinalização de IFN. Mais estudos são necessários para determinar o envolvimento da sinalização por IFN e a modulação desse processo por cepas de diferentes genótipos de MAYV.

Semelhante a outras arboviroses, MAYV é um vírus negligenciado que provoca uma doença conhecida como Febre Mayaro, relacionada com a persistência de sintomas musculares e articulares, fortemente associado à resposta imune do hospedeiro (Mota, Ribeiro, *et al.*, 2015). Apesar de induzir a produção de anticorpos altamente neutralizantes, estes não previnem contra a persistência dos sintomas, presente em cerca de 50% dos infectados com MAYV. A indução de uma resposta inflamatória robusta pela replicação de MAYV parece estar mais relacionada com a cronicidade da doença, uma vez que os altos níveis de citocinas pró inflamatórias são detectados mesmo em fases mais avançadas da doença (Santiago, Halsey, *et al.*, 2015). Juntamente com a desregulação da resposta imune do hospedeiro, a intensa replicação viral em tecidos musculares está relacionada com a mialgia debilitante, encontrada em pacientes infectados por MAYV e outros alfavírus (Morrison, Whitmore, *et al.*, 2006). Já foi demonstrado a eficiente capacidade de replicação, *in vitro*, de SINV e CHIKV em mioblastos e miotubos humanos primários (Ozden, Huerre *et al.*, 2007; Sane, Kurkela *et al.*, 2012). Em CHIKV, a replicação nessas células desencadeou um severo aumento de apoptose celular e estresse oxidativo, levando a perda rápida da viabilidade celular (Hussain, Lee, *et al.*, 2016). A infecção por diferentes genótipos e por cepas mais recentes de CHIKV, também demonstrou que estes apresentam maior capacidade de replicação nesse tecido e indução de citocinas, culminando na progressão da doença devido a persistência das dores musculares (Lohachanakul, Phuklia, *et al.*, 2015). Demonstramos aqui um evento semelhante a infecções de mioblastos e miotubos humanos por CHIKV, em que mioblastos e miofibrilas murinas foram capazes de replicar eficientemente o MAYV e, não obstante, demonstrar diferenças na replicação por cepas de genótipos distintos e mais recentes. Pode-se observar que a infecção de mioblastos C2C12 resulta em título viral semelhante, em 48 hpi, a infecção de miotubos, tanto por propagados em células de mamíferos quanto de artrópodes. No entanto, a viabilidade celular dos mioblastos foi preservada mesmo em 48 hpi, divergindo da viabilidade de miotubos que demonstraram morte celular dependente do isolado viral. Curiosamente, o isolado do ACRE, propagado em células VERO, apresentou replicação em miotubos com título viral semelhante aos demais isolados em 48 hpi, apesar do retardo do pico viral, mas quase não interferiu na viabilidade celular neste tempo. Porém, o isolado propagado em células C636, demonstrou menor replicação viral, que

os demais isolados, em miotubos e mioblastos, mantendo a viabilidade celular acima de 90%. Demonstrando que o isolado do ACRE pode apresentar menor virulência entre as cepas ou, até mesmo, uma atenuação em relação ao isolado do mesmo genótipo (ATCC).

A patogênese associada ao MAYV é ainda alvo de muitos estudos devido ao pouco conhecimento do mesmo. Por isso, estudos já realizados com outros alfavírus auxiliam na elucidação dos mecanismos que podem estar relacionados à indução da doença debilitante por MAYV. A utilização de um modelo *in vivo*, mostra-se eficiente nesse processo. Um estudo do nosso laboratório, já demonstrou a relação entre a idade dos animais e a resposta imune induzida à infecção. Foi encontrado que a idade dos animais está relacionada com a sinalização por IFN do tipo I, onde este restringe a replicação viral de MAYV em modelo de camundongos selvagens adultos. Em contrapartida, animais deficientes de IFN I, restabelecem a capacidade de replicação viral, apresentando sinais clínicos típicos da infecção por alfavírus, como edema de pata, caracterizado pelo intenso processo inflamatório no tecido. A resposta imune também apresenta relevância no estudo da patogênese do MAYV, em que demonstrou uma relação direta com a indução de lesão tecidual e o controle da infecção por MAYV (Figueiredo, Neris, *et al.*, 2019). A relação da patogênese viral com as diferenças entre os genótipos de MAYV, ainda não está elucidada. No entanto, sabe-se que, diferentes genótipos do vírus Chikungunya conferem variações nos níveis de virulência e de aptidão a novos hospedeiros devido a mutações pontuais nas sequências correspondentes as glicoproteínas de envelope viral (E1 e E2) (Jupille, Medina-Rivera *et al.*, 2013; Tsetsarkin, Chen, *et al.*, 2011; Langsjoen, Haller *et al.*, 2018). Consequentemente, a infecção de camundongos por genótipos derivadas das cepas do Oceano Índico, mais relacionadas com os surtos de CHIKV recentes, demonstrou maior indução de infiltrado de células, com aumento do edema na pata, e de mediadores pró inflamatórios, levando a piora na lesão tecidual induzida pela replicação viral, do que as primeiras cepas documentadas do vírus em 1960 (Gardner, Anraku, *et al.*, 2010). O presente estudo, demonstrou, preliminarmente, uma relação entre os genótipos de MAYV e a patogênese em modelos de camundongos selvagens. SINOP aparenta induzir um quadro mais grave que a infecção por ATCC, um isolado mais antigo e padronizado a estudos *in vivo*. A maior letalidade e aumento dos sinais clínicos evidentes nos animais, demonstra uma relação entre a replicação viral e a resposta imune induzida na infecção. A análise da carga viral nos tecidos musculares, articulares e neuronais, demonstrou que o isolado SINOP, do genótipo L, apresenta maior replicação viral e disseminação pelo organismo, uma vez que tecidos adjacentes demonstraram maior carga viral que o ATCC. O comprometimento muscular e articular devido a intensa

replicação viral, pode ter contribuído para a maior letalidade associada a essa cepa. Possivelmente, a presença de modificações no genoma do isolado SINOP, possibilitou maior virulência em animais e exacerbação da resposta inflamatória, culminando na degradação dos tecidos infectados.

7 CONCLUSÃO

- Os vírus ATCC e ACRE, pertencentes ao mesmo genótipo, apresentaram maior identidade genômica, enquanto entre os vírus de genótipo distinto, a identidade genômica foi reduzida em 10%;
- As regiões do genoma que apresentaram mais diferenças entre as sequências nucleotídicas são correspondentes as proteínas de envelope viral (E1 e E2) e uma proteína que faz parte do complexo replicativo (NsP3);
- O gene correspondente a proteína NsP3 nos vírus ACRE e SINOP apresentou diferentes sequências de inserções e deleções nucleotídicas entre eles e que estiveram ausentes no ATCC;
- As trocas de nucleotídeos resultaram em mudanças de aminoácidos tanto nos genes das proteínas E1 e E2 quanto na NsP3;
- O isolado do ACRE apresentou menor capacidade de dispersão viral, enquanto o isolado SINOP demonstrou maior capacidade de dispersão viral entre os vírus;
- O vírus ACRE, propagado em células C636, apresentou menor replicação viral, em comparação com os vírus ATCC e SINOP, na infecção de mioblastos e miotubos murinos (C2C12);
- A viabilidade celular em mioblastos infectados foi mantida acima de 80% em todas as condições de infecção pelos vírus ATCC, SINOP e ACRE;
- A viabilidade celular dos miotubos infectados por vírus propagados em células C636 sofreu maior redução por ATCC, enquanto a infecção por ACRE não demonstrou alteração na viabilidade das células;
- A infecção por vírus propagados em células VERO demonstrou maior replicação viral pelo vírus ATCC, enquanto os vírus ACRE e SINOP demonstraram replicação semelhante;
- A viabilidade das células infectadas por ATCC demonstrou maior redução impactando na replicação viral que diminuiu em 48 hpi;
- A doença induzida pelo SINOP foi mais intensa na infecção de camundongos jovens em relação a induzida pelo ATCC, demonstrado pela morte precoce, maior edema de pata e menor ganho de peso dos animais;

- A carga viral encontrada nos tecidos musculares (gastrocnêmio e quadríceps), nas patas, nos joelhos e no cérebro dos animais foi maior pelo vírus SINOP em relação ao ATCC com a manutenção de carga viral entre os dias 3 e 6 dpi.

Mais estudos são necessários para elucidar o perfil atenuado de ACRE em relação aos demais vírus estudados e se as modificações inseridas no gene da NsP3 estão relacionadas a esse evento. Além disso, é preciso elucidar o aumento de virulência do vírus SINOP, pertencente ao genótipo L, em relação aos vírus do genótipo D demonstrado pela indução de uma doença mais severa em modelo de camundongos experimentais.

8 REFERÊNCIAS

- Abraham, R., Hauer, D., Mcpherson, R., *et al.* "ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication", *PNAS*, v. 115, n. 44, 15 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1812130115>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1812130115>.
- Acosta-Ampudia, Y., D. M. Monsalve, Y. Rodríguez, Y. Pacheco, J.-M. Anaya And C. Ramírez-Santana (2018). "Mayaro: an emerging viral threat?" *Emerging microbes & infections* 7(1): 163-163.
- Agarwal, A., Parida, M., Dash, P. K. "Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses", *Reviews in Medical Virology*, v. 27, n. 5, p. e1941, 30 ago. 2017. DOI: 10.1002/rmv.1941. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.1941?casa_token=EMLgeuDBtFIAAAAAA%3AejlBrQnCwuDWjg1h3L60fgBg5EIQgbD03znb9ymvbx2d6onQGGXty0QaDKJNBIOAgTJRpPABWvjNQ.
- Agarwal, A., Sharma, A. K., D. Sukumaran, *et al.* "Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*", v. 497, p. 59–68, 1 out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682216301660>.
- Aguilar-Luis, M. A., Del Valle-Mendoza, J., Silva-Caso, W., *et al.* "An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru", *International Journal of Infectious Diseases*, v. 92, p. 253–258, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.01.024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220300266>.
- Ampudia-Acosta, Y., Monsalve, M. D., *et al.* "Mayaro: an emerging viral threat?" 2018. *Emerging Microbes & Infections*. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/s41426-018-0163-5>.
- Anderson, C. R., Wattle, G. H., Ahin, N. W., *et al.* "Mayaro Virus: A New Human Disease Agent", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1 nov. 1957. DOI: 10.4269/ajtmh.1957.6.1012. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/6/6/article-p1012.xml>.
- Andreolla, A. P., Borges, A. A., Bordignon, J., *et al.* "Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development", *Viruses*, v. 14, n. 8, p. 1787, 16 ago. 2022. DOI: 10.3390/v14081787. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/8/1787>.
- Arrigo, N. C., Watts, D. M., Frolov, I., *et al.* "Experimental infection of *Aedes sollicitans* and *Aedes taeniorhynchus* with two chimeric Sindbis/Eastern equine encephalitis virus vaccine candidates", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 78, n. 1, p. 93–7, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2215343/>.
- Assunção-Miranda, I., Cruz-Oliveira, C., Da Poian, A. T. "Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis", *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1155/2013/973516. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/973516/>.
- Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., *et al.* "Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010", *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, out. 2015. DOI: 10.3201/eid2110.141660. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4593426/>.
- Aymeric Neyret, Bernard, E., Olivier Aïqui-Reboul-Paviet, *et al.* "Identification of a non-canonical G3BP-binding sequence in a Mayaro virus nsP3 hypervariable domain", *FRONTIERS*, v. 12, 11 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.958176>. Disponível em: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.958176/full?utm_source=dlvr.it&utm_medium=twitter.
- Azevedo, R. S. S., Silva, E. V. P., Carvalho, V. L., *et al.* "Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon", *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 11, p. 1830–1832, nov. 2009. DOI: 10.3201/eid1511.090461. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857233/>.
- Bengue, M., Ferraris, P., Barthelemy, J., *et al.* "Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes", *Viruses*, v. 13, n. 3, p. 465, 11 mar. 2021. DOI: 10.3390/v13030465. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/465>.

Borgherini, G., Poubeau, P., Staikowsky, F., *et al.* "Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients", *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 1 jun. 2007. DOI: 10.1086/517537. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/44/11/1401/475984>.

Brown, R., Wan, J., Kielian, M. "The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew", *Viruses*, v. 10, n. 2, p. 89, 22 fev. 2018. DOI: 10.3390/v10020089. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/2/89>.

Broeckel, R., Haese, N. N., Ilhem Messaoudi, *et al.* "Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model)", v. 4, n. 3, p. 662–681, 16 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens4030662>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/4/3/662>.

Button, J. M., Qazi, S. A., Wang, J. C.-Y., *et al.* "Revisiting an old friend: new findings in alphavirus structure and assembly", *Current Opinion in Virology*, v. 45, p. 25–33, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.coviro.2020.06.005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625720300377?casa_token=mUNXDtx32vgAAAAA:bTFDEeyQAmf8S8IcFE2NgIbGDvX2qQHVRe_S5rcfgepUkJozj7BT51yykZ31karDq4UliOwk4A.

Caicedo, E.-Y., Charniga, K., Rueda, A., *et al.* "The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 6, p. e0009418, 3 jun. 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009418. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009418>.

Camini, F. C., Da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., *et al.* "Implications of oxidative stress on viral pathogenesis", *Archives of Virology*, v. 162, n. 4, p. 907–917, 30 dez. 2016. DOI: 10.1007/s00705-016-3187-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-016-3187-y>.

Carl Th. Pedersen, Slocum, D. B., Robinson, D. "Comparative Studies of Plaque Variants Derived From a Florida Strain of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus", v. 6, n. 5, p. 779–784, 1 nov. 1972. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.6.5.779-784.1972>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4344368/>.

Carvalho, C. A. M., Silva, J. L., Oliveira, A. C., *et al.* "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, 27 abr. 2017. DOI: 10.7717/peerj.3245. Disponível em: <https://peerj.com/articles/3245/>.

Causey, O. R. ; Maeoja, O. M., "Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Para, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1957 Vol.6 No.6 pp.1017-1023 pp. ref.2. Record Number : 19601000433

Cavalheiro, M. G., Costa, L. S., Campos, H. S., *et al.* "Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication", v. 88, n. 3, p. 1485–1499, 1 set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150685>.

Chaaithanya, Krishna, I., Muruganandam, N., Sundaram, G. S., *et al.* "Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection", *Mary Ann Liebert, Inc., Viral Immunology*, Aug 2011. DOI: <http://doi.org/10.1089/vim.2010.0123>

Charrel, R. N., Xavier De Lamballerie, Didier Raoult. "Chikungunya Outbreaks — The Globalization of Vectorborne Diseases", v. 356, n. 8, p. 769–771, 22 fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmp078013>. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMp078013>.

Chen, L., Wang, M., Zhu, D., *et al.* "Implication for alphavirus host-cell entry and assembly indicated by a 3.5Å resolution cryo-EM structure", *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 14 dez. 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07704-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07704-x>.

Chow, A., Her, Z., Ong, E. K. S., *et al.* "Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor", *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 2, p. 149–157, 15 jan. 2011. DOI: 10.1093/infdis/jiq042. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/203/2/149/910821>.

Couto-Lima, Yoann Madec, Ignez, M., *et al.* "Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations", v. 7, n. 1, 7 jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05186-3>.

Cunha, M. S., Cruz, N. V. G., Schnellrath, L. C., *et al.* "Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil", *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 10, p. 1737–1739, out. 2017. DOI: 10.3201/eid2310.161855. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5621531/>.

De Castro-Jorge, L. A., De Carvalho, R. V. H., Klein, T. M., *et al.* "The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus", *PLOS Pathogens*, v. 15, n. 9, p. e1007934, 3 set. 2019. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007934. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007934>.

De Thoisy, B., Gardon, J., Salas, R. A., *et al.* "Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana", *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, out. 2003. DOI: 10.3201/eid0910.030161. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3033094/>.

Diagne, C. T., Bengue, M., Choumet, V., *et al.* "Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms", *Pathogens*, v. 9, n. 9, p. 738, 8 set. 2020. DOI: 10.3390/pathogens9090738. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/9/738>.

Dupuis-Maguiraga, L., Noret, M., Brun, S., *et al.* "Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 3, p. e1446, 27 mar. 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001446. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001446>.

Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., *et al.* "Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion", *Epidemiology and Infection*, v. 137, n. 4, p. 534–541, 11 ago. 2008. DOI: 10.1017/S0950268808001167. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/atypical-chikungunya-virus-infections-clinical-manifestations-mortality-and-risk-factors-for-severe-disease-during-the-20052006-outbreak-on-reunion/33DA6DD44AA27ACE3B2216FCA688A592>.

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?", *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, n. 5, p. 540–544, set. 2017. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.06.002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/VbHrbB9JY8rVTv77sPzfmNp/abstract/?lang=en>.

Fernanda Caetano Camini, Carla, C., Letícia Trindade Almeida, *et al.* "Oxidative stress in Mayaro virus infection", v. 236, p. 1–8, 1 maio 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170216307122>.

Figueiredo, C. M., Neris, R. L. da S., Gavino-Leopoldino, D., *et al.* "Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity", *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 1 out. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02246. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02246/full>.

Fros, J. J., Geertsema, C., Zouache, K., *et al.* "Mosquito Rasputin interacts with chikungunya virus nsP3 and determines the infection rate in *Aedes albopictus*", *Springer Nature*, v. 8, n. 1, 17 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1070-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13071-015-1070-4>.

Ganesan, V., Duan, B., Reid, S. "Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling", *Viruses*, v. 9, n. 12, p. 368, 1 dez. 2017. DOI: 10.3390/v9120368. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/12/368>.

Ganjian, N., Riviere-Cinamond, A. "Mayaro virus in Latin America and the Caribbean", *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 44, p. 1, 11 fev. 2020. DOI: 10.26633/rpsp.2020.14. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2020.v44/e14/en/>.

Gardner, J., I. Anraku, T. T. Le, T. Larcher, L. Major, P. Roques, W. A. Schroder, S. Higgs And A. Suhrbier (2010). "Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice." *Journal of virology* 84(16): 8021- 8032.

Gianandrea Borgherini, Poubeau, P., Frédérik Staikowsky, *et al.* "Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients", v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 1 jun. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1086/517537>. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/44/11/1401/475984>.

Giménez-Richarte, Á., De Salazar, M. O., Arbona, C., *et al.* "Prevalence of Chikungunya, Dengue and Zika viruses in blood donors: a systematic literature review and meta-analysis", *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, v. 20, n. 4, p. 267–280, 2022. DOI: 10.2450/2021.0106-21. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9256504/>.

Göertz, G. P., Marit Lingemann, Geertsema, C., *et al.* "Conserved motifs in the hypervariable domain of chikungunya virus nsP3 required for transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes", *PLOS*, v. 12, n. 11, p. e0006958–e0006958, 9 nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006958>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006958>.

Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C., *et al.* "Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013", *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 11, nov. 2013. DOI: 10.3201/eid1911.130777. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837653/>.

Henri J. Jupille, Melisa Medina-Rivera, *et al.* "A Tyrosine-to-Histidine Switch at Position 18 of the Ross River Virus E2 Glycoprotein Is a Determinant of Virus Fitness in Disparate Hosts", *ASM Journals Journal of Virology*, Vol. 87, No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03326-12>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jvi.03326-12>

Hoarau, J.-J., Jaffar Bandjee, M.-C., Krejbich Trotot, P., *et al.* "Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response", *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.0900255. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/184/10/5914/38673>.

Hotez, P. J., Murray, K. O. "Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro?", v. 11, n. 8, p. e0005462–e0005462, 31 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005462>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005462>.

Hussain, K. M., Lee, R. C. H., Ng, M. M.-L., *et al.* "Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis", *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 19 fev. 2016. DOI: 10.1038/srep21406. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep21406>.

J. Erin Staples, Monath, T. P. "Yellow Fever: 100 Years of Discovery", v. 300, n. 8, p. 960–960, 27 ago. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.300.8.960>. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/182442>.

Johannes, Palazzo, L., Ahel, I. "(ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology", v. 34, n. 5-6, p. 263–284, 6 fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.334631.119>. Disponível em: <https://genesdev.cshlp.org/content/34/5-6/263.short>.

Kafai Nm, Diamond Ms, Fox Jm. "Distinct Cellular Tropism and Immune Responses to Alphavirus Infection". *Annu Rev Immunol*. 2022 Apr 26;40:615-649. doi: 10.1146/annurev-immunol-101220-014952. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35134315.

Kelvin, A. A., Banner, D., Silvi, G., *et al.* "Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, p. e1279, 16 ago. 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001279. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001279>.

Kendall, C., Khalid, H., Müller, M., *et al.* "Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements", *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. 17, p. 9296–9312, 27 jul. 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz640. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/17/9296/5539885>.

- Kim, A. S., Diamond, M. S. "A molecular understanding of alphavirus entry and antibody protection", *Nature Reviews Microbiology*, 6 dez. 2022. DOI: 10.1038/s41579-022-00825-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00825-7>.
- Kinney, R. M., Chang, G.-J. J., Tsuchiya, K. R., *et al.* "Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein", v. 67, n. 3, p. 1269–1277, 1 mar. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.67.3.1269-1277.1993>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC237493/>.
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., *et al.* "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages", *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 3, p. 894–906, 1 mar. 2010. DOI: 10.1172/jci40104. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/40104>.
- Langsjoen, R. M., Haller, S. L., Roy, C. J., *et al.* "Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models", v. 9, n. 2, 2 maio 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02449-17>. Disponível em: <https://researchexperts.utmb.edu/en/publications/chikungunya-virus-strains-show-lineage-specific-variations-in-vir>.
- Langsjoen, R. M., Muruato, A. E., Kunkel, S. R., *et al.* "Differential Alphavirus Defective RNA Diversity between Intracellular and Extracellular Compartments Is Driven by Subgenomic Recombination Events", v. 11, n. 4, 25 ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00731-20>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32817101/>.
- Lavergne, A., Thoisy, B. De, Lacoste, V., *et al.* "Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses", *Virus Research*, v. 117, n. 2, p. 283–290, maio 2006. DOI: 10.1016/j.virusres.2005.11.006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016817020500345X?casa_token=153f8yoI34MAAAA:Cpa dUg2gfrS7gJrSh_bvKwycZL67s35VdLuxI2xcMTqOXIr77S7Yo8G0UrbmztUg8JfV23vIg.
- Lednicky, J., De Rochars, V. M. B., Elbadry, M., *et al.* "Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015", *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 11, p. 2000–2002, nov. 2016. DOI: 10.3201/eid2211.161015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088037/>.
- Lee, C. H., Regina, Mohamed Hussain, K., Chu, J. J. H. "Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 8, p. e0007610, 26 ago. 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007610. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007610>.
- Lidbury, Brett A., Rulli, Nestor E., Suhrbier, A., *et al.* "Macrophage-Derived Proinflammatory Factors Contribute to the Development of Arthritis and Myositis after Infection with an Arthrogenic Alphavirus", *The Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 11, p. 1585–1593, jun. 2008. DOI: 10.1086/587841. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/197/11/1585/796340>. Acesso em: 31 dez. 2022.
- Lim, E., Supramaniam, A., Lui, H., *et al.* "Chondrocytes Contribute to Alphaviral Disease Pathogenesis as a Source of Virus Replication and Soluble Factor Production", *Viruses*, v. 10, n. 2, p. 86, 15 fev. 2018. DOI: 10.3390/v10020086. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/2/86>.
- Llagonne-Barets, M., Icard, V., Leparç-Goffart, I., *et al.* "A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana", *Journal of Clinical Virology*, v. 77, p. 66–68, abr. 2016. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.02.013. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216300051?casa_token=jDO7cZ-VBv0AAAAA:1cxBiKqatqoxcp_z1MNuO_bMS1sXzqqO0zdUe0QL0PHGSNohym1MJfLpT8U0PQFM0WZeCjcEQ.
- Lo Presti, A., Lai, A., Cella, E., *et al.* "Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, n. 12, p. 925–932, dez. 2014. DOI: 10.1016/s1995-7645(14)60164-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764514601644>.
- Lohachanakul, J., Phuklia, W., Thannagith, M., *et al.* "Differences in response of primary human myoblasts to infection with recent epidemic strains of Chikungunya virus isolated from patients with and without myalgia", *Journal of Medical Virology*, v. 87, n. 5, p. 733–739, 5 fev. 2015. DOI: 10.1002/jmv.24081. Disponível em:

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.24081?casa_token=pWur3KoKtT4AAAAA%3A27hemwBbbxCyOzar2SyP_sST0ijcmKxChTvYxH58CooYNfgmrDuPFcE-S5PIDdojTGQMMu5ZsaSPBA.

Long, K. C., Ziegler, S., Saravanan Thangamani, *et al.* "Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*", *v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011.* DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3183788/>. Acesso em: 24 jun. 2023.

Lopes Marques, C. D., Ranzolin, A., Cavalcanti, N. G., *et al.* "Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms", *Best Practice & Research Clinical Rheumatology, v. 34, n. 4, p. 101502, ago. 2020.* DOI: 10.1016/j.berh.2020.101502. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S152169422030019X?casa_token=hGyYGqWJ55oAAAAA:hsuFr4_f8y3v59erkUvtYTqOitrfnaAE7Zm7EidjLs-Z4c6ufakya9i1lh1bj51l_iM4pw02Lw.

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, dez. 2016.* DOI: 10.1016/j.micinf.2016.10.007. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916301666?casa_token=cXv3bxN0OrwAAAAA:OPaBV4MBI5oJxJ4pT1kQsja5JY2k27wOZ4lONYKMj1pE-KJvhlNnSLuW-bpei7bn2Twd1Z0Ayg.

Mahendradas, P., Ranganna, S. K., Shetty, R., *et al.* "Ocular Manifestations Associated with Chikungunya", *Ophthalmology, v. 115, n. 2, p. 287–291, fev. 2008.* DOI: 10.1016/j.ophtha.2007.03.085. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642007004885?casa_token=qYuYwZAW9_YAAAAA:hSUwm-vrSFNyt2DjhAFrvAuDL30CiF6tWN84fLHSzgnOdjusyisbKDcx78Nm2uUwpXrqsuHDzQ.

Maia, L. M. S., Bezerra, M. C. F., Costa, M. C. S., *et al.* "Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*", *Medical and Veterinary Entomology, v. 33, n. 3, p. 437–442, 18 fev. 2019.* DOI: 10.1111/mve.12369. Disponível em: https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mve.12369?casa_token=_amIACtBQTUAAAAA%3AhBpuCZFupEzXPnYQ5d617xyPXewd8cLZanIEK2Ar8et_fhvUV86Iiw-H-JEA170ErEjLGBE51tigXg.

Marcela Sabino Cunha, Nadia V.G. Cruz, Schnellrath, L. C., *et al.* "Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil", *v. 23, n. 10, p. 1737–1739, 1 out. 2017.* DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2310.161855>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5621531/>.

Matusali, G., Colavita, F., Bordi, L., *et al.* "Tropism of the Chikungunya Virus", *Viruses, v. 11, n. 2, p. 175, 20 fev. 2019.* DOI: 10.3390/v11020175. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/175>.

Mavian, C., Rife, B. D., Dollar, J. J., *et al.* "Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin", *Scientific Reports, v. 7, n. 1, 18 ago. 2017.* DOI: 10.1038/s41598-017-07152-5. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07152-5>.

Mcperson, R., Abraham, R., E. Sreekumar, *et al.* "ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macromodular domain is critical for virus replication and virulence", *PNAS, v. 114, n. 7, p. 1666–1671, 31 jan. 2017.* DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621485114>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1621485114>.

Mendes, A., Kuhn, R. "Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly", *Viruses, v. 10, n. 3, p. 138, 20 mar. 2018.* DOI: 10.3390/v10030138. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/3/138>.

Migné, C. V., Moutailler, S., Attoui, H. "Strategies for Assessing Arbovirus Genetic Variability in Vectors and/or Mammals", *Pathogens, v. 9, n. 11, p. 915, 5 nov. 2020.* DOI: 10.3390/pathogens9110915. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/9/11/915>.

Mohd Zim, M. A., Sam, I.-C., Omar, S. F. S., *et al.* "Chikungunya infection in Malaysia: Comparison with dengue infection in adults and predictors of persistent arthralgia", *Journal of Clinical Virology, v. 56, n. 2, p. 141–145, fev. 2013.* DOI: 10.1016/j.jcv.2012.10.019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653212004076?casa_token=XTRv_xmdkqsAAAAA:024Y0Ia-YrktotnmILqx9bNipybpbzrea_ZUR6CQb52_DmNBFpVshFtJL10Z22jaNJ0EWEeP8w.

Morison, T. E., Whitmore, A. C., Shabman, R. S., Lidbury, B. A., Mahalingam, S., And Heise, M. T. (2006) "Characterization of Ross River Virus Tropism and Virus-Induced Inflammation in a Mouse Model of Viral

Arthritis and Myositis” | Journal of Virology. 2023. Journal of Virology. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.80.2.737-749.2006>.

Moro, M. L., Grilli, E., Corvetta, A., *et al.* "Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study", *Journal of Infection*, v. 65, n. 2, p. 165–172, ago. 2012. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.04.005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445312001028?casa_token=yoNRCyp2-8QAAAAA:zW5E9sXaor6C18mHplpvuIi2fiCqJ95FcDxsHopc0gk6wzqePqhsWpOB3bQQHz0kOWeGfb12BQ.

Mostafavi, H., Abeyratne, E., Zaid, A., *et al.* "Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease", *Viruses*, v. 11, n. 3, p. 290, 22 mar. 2019. DOI: 10.3390/v11030290. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/290>.

Mota, M. T. D. O., M. R. Ribeiro, D. Vedovello And M. L. Nogueira (2015). "Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas." *Future Virology* 10(9): 1109-1122. Disponível em: https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/fvl.15.76?casa_token=Uchl1s9C_gwAAAAA%3A-ZnjabnzlKEh4vqRGZ-OSEwCSQP1HQDS52qiB_npTRtC3fsXDA_7r2wv_hE6uwtbAedoq5hoNhni

Mourão, G. P. M., Bastos, S. M., *et al.* "Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008" | *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2021. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0669>.

Navarrete-Espinosa, Joel., & Gómez-Dantés, Héctor . (2006), "Arbovirus causales de fiebre hemorrágica en pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social." *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, Vol. 44, núm.4, pp.347-353. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457745534009>

Neumayr, A., Gabriel, M., Fritz, J., *et al.* "Mayaro Virus Infection in Traveler Returning from Amazon Basin, Northern Peru", *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 4, p. 695–696, abr. 2012. DOI: 10.3201/eid1804.111717. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3309675/>.

Ng, L. F. P., Chow, A., Sun, Y.-J., *et al.* "IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity", *PLoS ONE*, v. 4, n. 1, p. e4261, 21 jan. 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0004261. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004261>.

Nicacio, J. M., Gomes, O. V., Carmo, R. F. do, *et al.* "Heart Disease and Arboviruses: A Systematic Review and Meta-Analysis", *Viruses*, v. 14, n. 9, p. 1988, 8 set. 2022. DOI: 10.3390/v14091988. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/9/1988>.

Ninla-Aesong, P., Mitarnum, W., Noipha, K., "Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: A 5-Year Follow-Up Study in Southern Thailand", *Mary Ann Liebert, Inc., Viral Immunology*, Dec 2019. DOI: <http://doi.org/10.1089/vim.2019.0064>

Ozden, S., Huerre, M., Riviere, J.-P., *et al.* "Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection", *PLoS ONE*, v. 2, n. 6, p. e527, 13 jun. 2007. DOI: 10.1371/journal.pone.0000527. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000527>.

Philippe Grivard, K. Le Roux, Laurent, P., *et al.* "Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection", v. 55, n. 10, p. 490–494, 1 dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.07.002>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811407001174?casa_token=PC0aanEcqkgAAAAA:agycgvaMo3JfRsDMET9MHWwt1IVKvHwVQw04CRmWeYHwe3BIC-ETR3MXAULnfGNOn5o5ITNEIQ.

Pinheiro, F. P.; Dias, L. B. "Vírus Mayaro e Una: Estudo de variantes produzindo grandes e pequenas placas". *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica*, v. 6, Patologia, p. 211 - 224, 1967. Laboratório de Vírus de Belém, Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviço Especial de Saúde Pública, Belém, Pará, Brasil. Disponível em: <https://patuaback.iec.gov.br/server/api/core/bitstreams/058a473a-27ad-4db0-9286-061ea6faec4f/content>

Pinheiro Fp, Freitas Rb, Da Rosa Jft, Gabbay Yb, Mello Wa, Leduc Jw 1981. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *Am J Trop Med Hyg* 30: 137-142.

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., Da Rosa, A. T., Weaver, S. C., & Tesh, R. B. (2006). "Genetic relationships among Mayaro

and Una viruses suggest distinct patterns of transmission.” *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(3), 461–469.

Receveur, M. C., Grandadam, M., Pistone, T., *et al.* "Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010", *Eurosurveillance*, v. 15, n. 18, 6 maio 2010. DOI: 10.2807/ese.15.18.19563-en. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.18.19563-en?crawler=true>.

Rémi N. Charrel, M.D., Ph.D., Xavier De Lamballerie, M.D., Ph.D., And Didier Raoult, M.D., PH.D.” *Chikungunya Outbreaks — The Globalization of Vectorborne Diseases*”. The Globalization of VectorBorne Diseases, february 22, 2007. Disponível em: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/47977209/769-libre.pdf?1470933929=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DChikungunya_Outbreaks_The_Globalization.pdf&Expires=1672925477&Signature=AnxRsESwn7u8n24IoALZWojE4UiOjKCviRYWq6wIN7fx5Fze2ozWxB-wCeCRoCWhEJYTeWwxcm87AP8fLc2QwVOzP5UJ7r-7PqfRAoHgn50BHDYcTpHqH3nSt2T~1OqxJBy6d2aRaQgkkKimGnxFkarJt1F4BzHEbcmimfp8k1KqizYJCr1Zg98LpWtzug6wlmz74AhGhZwYERsf5erO1dK8hZ8UmfWHfA5DP871~f0SjgdA-p1t5Aw-acRd7M6WBo9eDP8IZLcTy1R92WpE8tzz-cgeFZZwaCb6Rd3arHv51i-NNy8cyYOMnjI05pcZD6~M-IYm3HuUMp6aehVxw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Ren, C. S., Qazi, A. S., Towel, B., *et al.* “Mutations at the Alphavirus E1’-E2 Interdimer Interface Have Host-Specific Phenotypes” | *Journal of Virology*. 2021. *Journal of Virology*. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jvi.02149-21>.

Ribeiro-Filho, H. V., Coimbra, L. D., Cassago, A., *et al.* "Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses", *Nature Communications*, v. 12, n. 1, 24 maio 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-23400-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23400-9>.

Rückert, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S. M., *et al.* "Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes", *Nature Communications*, v. 8, n. 1, 19 maio 2017. DOI: 10.1038/ncomms15412. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms15412?origin=ppub>.

Rupp, J. D., Sokoloski, K. J., Gebhart, N. N., *et al.* "Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions", *Journal of General Virology*, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000249>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635493/>.

Ryman, K. D., Klimstra, W. B. "Host responses to alphavirus infection", *Immunological Reviews*, v. 225, n. 1, p. 27–45, out. 2008. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2008.00670.x. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-065x.2008.00670.x?casa_token=IywCgBtHhHYAAAAA%3Azc4IprUswQmaK5ClzVTAXV8thr3MF18IsUGpd_67m3tULS0SLwrT7C5_2fNAs5_1RY06bXECyqYvKg.

Sane, J., Kurkela, S., Desdouts, M., *et al.* "Prolonged Myalgia in Sindbis Virus Infection: Case Description and In Vitro Infection of Myotubes and Myoblasts", *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 3, p. 407–414, 21 maio 2012. DOI: 10.1093/infdis/jis358. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/206/3/407/2192408>.

Santiago, F. W., Halsey, E. S., Siles, C., *et al.* "Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. e0004104, 23 out. 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004104. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004104>.

Santos, F. M., Dias, R. S., De Oliveira, M. D., *et al.* "Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus", *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 5, p. e0007375, 3 maio 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007375. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007375>.

Santos, S.A.K. (2020). VÍRUS MAYARO: Doença Infeciosa da Região Amazônica. Monografia (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, 38f.

Schaeffer, M. ; Gajdusek, D. C. ; Lema, A. B. ; Eichenwald, H. “ Epidemic Jungle Fevers among Okinawan Colonists in the Bolivian Rain Forest. I. Epidemiology.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1959 Vol.8 No.3 pp.372-96 ref.13

- Schilte, C., Staikovskiy, F., Couderc, T., *et al.* "Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 21 mar. 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002137. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002137>.
- Sehnert, B., Gierer, P., Ibrahim, S., *et al.* *Arthritis Research & Therapy*, v. 8, n. 4, p. R95, 2006. DOI: 10.1186/ar1973. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar1973>.
- Siew-Wai Fong, R. Manjunatha Kini, Lisa F. P. Ng "Mosquito Saliva Reshapes Alphavirus Infection and Immunopathogenesis" *ASM Journals Journal of Virology* Vol. 92, No. 12, 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.01004-17>
- Slegers, C. A. D., Keuter, M., Günther, S., *et al.* "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, jul. 2014. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.04.020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665321400153X?casa_token=p_vWjJMG-boAAAAA:sJNDadqN34nHlaUCkznEpcGOWtnD1qJq5Ia8ekZBK_kwgjSfEYhA54ITG9PMehBPUOXyUDc42Q.
- Soumahoro, M.-K., Boelle, P.-Y., Gaüzere, B.-A., *et al.* "The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005–2006: A Cost-of-Illness Study", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 6, p. e1197, 14 jun. 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001197. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001197>.
- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., *et al.* "Characterization of Reemerging Chikungunya Virus", *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 6, p. e89, 29 jun. 2007. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030089. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030089>.
- Staikowsky, F., Le Roux, K., Schuffenecker, I., *et al.* "Retrospective survey of Chikungunya disease in Réunion Island hospital staff", *Epidemiology and Infection*, v. 136, n. 2, p. 196–206, 16 abr. 2007. DOI: 10.1017/S0950268807008424. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/retrospective-survey-of-chikungunya-disease-in-reunion-island-hospital-staff/7C0C5C9F0494A2600B1A0CC6E0B7D953>.
- Terzian, A. C. B., Suzuki, R. B., Ferreira, M. U., *et al.* "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, 4 fev. 2015. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0417. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4347347/>.
- Tesh, R. B. (1982). "Arthritides caused by mosquito-borne viruses." *Annu Rev Med* 33: 31-40.
- Tesh, Robert B., Watts, Douglas M., Russell, Kevin L., *et al.* "Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America", *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999. DOI: 10.1086/515070. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/28/1/67/302503>.
- Tsetsarkin, K. A., Weaver, S. C. "Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence", v. 7, n. 12, p. e1002412–e1002412, 8 dez. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002412>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002412>.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., Mcgee, C. E., *et al.* "A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential", v. 3, n. 12, p. e201–e201, 7 dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030201>.
- Torres-Ruesta, A., Chee, R. S. & Ng, L. F. P. "Insights into antibody-mediated alphavirus immunity and vaccine development landscape". *Microorganisms* <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050899> (2021).
- Vieira, C. J. Da S. P., Silva, D. J. F. Da, Barreto, E. S., *et al.* "Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil", *Acta Tropica*, v. 147, p. 12–16, jul. 2015. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.03.020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15000790?casa_token=T79bf8LFd4UAAAAA:Y6tkGBN7t6t6eP691y_8gZoDQr6ruDN18KPPmawYSBSdFO3J4tgQKO6oeKSLzuLDOqZmnsVAaw.

Weaver, S. C., Kang, W. , Shirako, Y., *et al.* "Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses" | *Journal of Virology*. 2022. *Journal of Virology*. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jvi.71.1.613-623.1997>.

Weaver, S. C., Reisen, W. K. "Present and future arboviral threats", v. 85, n. 2, p. 328–345, 1 fev. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354209004951?casa_token=KY7rDwNMjCAAAAAA:Ju-U6nvN9HeK02v9gzj12XdTJTshp9PgpztnaNZDpyuiKIftWbJc_85yjrIIDnVLMro3-HCfkA.

Welsby, I., D. Hutin, Gueydan, C., *et al.* "PARP12, an Interferon-stimulated Gene Involved in the Control of Protein Translation and Inflammation", v. 289, n. 38, p. 26642–26657, 1 set. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.589515>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)48490-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)48490-X/fulltext).

Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., *et al.* "Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses", *Nature*, v. 557, n. 7706, p. 570–574, maio 2018. DOI: 10.1038/s41586-018-0121-3. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0121-3>.

Ziegler, S. A., Lu, L., Xiao, S.-Y., *et al.* "An Animal Model for Studying the Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n. 1, p. 133–139, 1 jul. 2008. DOI: 10.4269/ajtmh.2008.79.133. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=aaa28ebb18f9c3096a2132db0eed7380f3d630a8>.

Zuchi, N., Heinen, L. B. Da S., Santos, M. A. M. dos, *et al.* "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, 19 ago. 2014. DOI: 10.1590/0074-0276140108. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/vgTJNTypd5C66wgtRBSYhpB/abstract/?lang=en>.