



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA – UFDPAR

BACHARELADO EM BIOMEDICINA

PALOMA MARIA DE SOUSA ARAUJO

**CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO *IN SILICO* DE INICIADORES
PARA DETECÇÃO MOLECULAR DOS ARBOVÍRUS
Chikungunya virus (CHIKV) E *West Nile virus* (WNV) EM
CONTEXTO DE PANDEMIA DO SARS-COV-2**

PARNAÍBA – PI

2022

PALOMA MARIA DE SOUSA ARAUJO

**CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO *IN SILICO* DE INICIADORES
PARA DETECÇÃO MOLECULAR DOS ARBOVÍRUS
Chikungunya virus (CHIKV) E *West Nile virus* (WNV) EM
CONTEXTO DE PANDEMIA DO SARS-COV-2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado na Universidade Federal do
Delta do Parnaíba como requisito
obrigatório para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela
Ferreira

PARNAÍBA- PI

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde

A663c Araújo, Paloma Maria de Sousa

Construção e validação in silico de iniciadores para detecção molecular dos arbovírus Chikungunya Virus (chikv) e West Nile virus (wnv) em contexto de pandemia do SARS-COV-2 [recurso eletrônico] / Paloma Maria de Sousa Araújo. – 2022

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

1. Arboviroses. 2. Vírus Chikungunya. 3. Vírus do Oeste do Nilo. 4. In Silico. 5. Diagnóstico Molecular. I. Título.

CDD: 579.2

Dedico...

*Em memória de todos aqueles que perdi em
minha caminhada: Bisavó Petronila, vovô
Ireno, tio Edinaldo e amiga Beatriz.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Iracema e Pedro, por todo o suporte.

Ao meu irmão, Pedro Italo, por todo o encorajamento.

Às minhas primas-irmãs, Ianka e Eduarda, por toda a compreensão.

Aos meus familiares por toda a força.

Às minhas amigas, Ana Clara e Vanessa, por todo o acolhimento.

Ao meu amigo, Matheus, por toda a paciência.

Ao meu amigo, Wandson, por todas as conversas.

Ao meu amigo, Humberto, por todo o companheirismo.

Às minhas amigas, Denise, Mariana e Taíse, pela caminhada.

Aos meus amigos, Airton, Alex, Letícia e Wesley, por todas as vivências.

Ao meu orientador, Prof. Gustavo, pela confiança, compreensão e ensinamentos.

À professora Renata, por toda a inspiração.

Aos meus colegas de curso, por toda a união.

Aos meus professores, por todos os aprendizados.

Ao meu grupo LiAGen, por todas as experiências.

ÀUFPI/UFDPar, pela estrutura.

Ao Ensino Público, pela possibilidade da minha graduação de qualidade.

A todos aqueles que impactaram minha vida durante esses anos de graduação e contribuíram para a realização deste trabalho.

“I do believe your galaxy”
Magic Shop – Bangtan Soneyondan

“Nan nal mideo nae deungi apeun geon
nalgaega dotgi wihamin geol”
Interlude: Wings – Bangtan Soneyondan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 ARBOVÍRUS	13
2.2 ALPHAVÍRUS	14
2.2.1 Chikungunya virus	16
2.2.1.1 Epidemiologia	16
2.2.1.2 Diversidade genética	16
2.2.1.3 Ciclo de transmissão	18
2.2.1.4 Patogênese e aspectos clínicos	19
2.3 FLAVIVIRUS	20
2.3.1 West Nile vírus	21
2.3.1.1 Epidemiologia	21
2.3.1.2 Diversidade genética	21
2.3.1.3 Ciclo de transmissão	22
2.3.1.4 Patogênese e aspectos clínicos	23
2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DOS INICIADORES	29
4.2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

RESUMO

Os arbovírus são um grupo de vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae*. No Brasil, o *Chikungunya virus* (CHIKV), tornou-se uma grande ameaça à saúde pública a partir do surto no biênio 2015-2016. A gravidade da infecção está associada à cronificação de artralgia debilitante presente entre 40-80% dos infectados. O *West Nile virus* (WNV), é responsável por mais de dezenas de milhares de casos notificados nas Américas, sendo 24.000 destes neuro-invasivos e mais de 2.300 óbitos. A circulação no Brasil foi detectada em áreas florestais e rurais, e em 2014 foi confirmado o primeiro paciente infectado por WNV no Piauí, com quadro clínico de encefalite aguda. Para se fazer a diferenciação laboratorial dos arbovírus, diversos métodos podem ser utilizados, como os sorológicos e moleculares. O diagnóstico molecular apresenta um resultado mais sensível e específico, e para esse grupo de doenças a técnica mais utilizada é a RT-PCR qualitativa e suas variantes, como o a RT-PCR quantitativa. O que garante a diferenciação entre as diferentes aplicações é a utilização de uma sequência alvo específica e os iniciadores. Para a obtenção de um resultado fidedigno, a construção dos iniciadores deve obedecer a algumas características. A partir do desenho e validação *in silico*, é possível utilizar iniciadores que fornecem maior especificidade e sensibilidade na amplificação do material genético dos arbovírus estudados. Os parâmetros para a construção dos iniciadores dos vírus estudados foram previamente estabelecidos, como tamanho dos iniciadores e do fragmento amplificado, temperatura de anelamento e conteúdo GC%, de acordo com os critérios definidos de cada técnica. O *Geneious Prime*® é uma ferramenta alternativa de fácil uso que realiza alinhamento de sequência, construção de iniciadores e análise de suas características. Este software indica os iniciadores, suas características básicas e possível formação de estruturas secundárias, sendo que essa análise consta como a primeira etapa para sua validação. Ao final da checagem, os iniciadores que atenderam aos parâmetros são submetidos à ferramenta *UCSC In-Silico PCR*, para pesquisa em banco de dados de sequências de outros organismos, a fim de avaliar possíveis anelamento com organismos que não são de interesse e que podem ser amplificados como contaminantes durante as técnicas moleculares. Em conjunto, a busca na literatura com o intuito de verificar o padrão de publicações realizadas acerca dos arbovírus em estudos *in vitro* e *in silico*, delimitada entre os anos de 2019, anterior a pandemia de SARS-CoV-2, até março de 2022. Considerando que os iniciadores construídos a partir das regiões *nsP2* e *nsP1* para CHIKV e regiões *E* e *3'UTR* para WNV atenderam as características básicas e ideais de funcionamento adequado para as técnicas de RT-PCR e RT-qPCR, podemos sugerir a utilização na experimentação das técnicas moleculares. Em relação à produção científica, foi percebida discrepância entre os bancos de dados. Enquanto no ScienceDirect houve grande aumento nos estudos produzidos ao longo dos anos, de forma não homogênea (desvio padrão 18,5-85), no PubMed, a amostragem foi mais homogênea (desvio padrão 1,1-9,1), porém, com quantidade inferior de estudos.

Palavras-chave: arbovirose; vírus Chikungunya; vírus do Oeste do Nilo; *in silico* diagnóstico molecular.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação gráfica de partícula viral dos vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* 15
- Figura 2** – Representação gráfica de genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus*, incluindo as ORFs de poliproteína não estrutural e estrutural 15
- Figura 3** – Distribuição das linhagens de CHIKV, na imagem superior entre os anos de 1953-2000 e a na inferior entre os anos de 2001-2018 17
- Figura 4** – Representação dos ciclos de transmissão enzoótica e urbana do CHIKV 18
- Figura 5** – (A) Representação gráfica do genoma dos *Flavivirus*, composto por uma única ORF com três genes que codificam proteínas estruturais e sete genes que codificam proteínas não estruturais, flanqueado por duas UTRs. (B) Representação gráfica da estrutura da partícula viral dos *Flavivirus* 20
- Figura 6** – Esquema indicando o ciclo de transmissão do WNV, indicando o vetor (mosquito), o reservatório (ave) e os hospedeiros acidentais (humano e equídeo) 23
- Figura 7** – Relação entre especificidade do teste diagnóstico e estágio clínico da infecção para detecção laboratorial dos arbovírus 24
- Figura 8** – Comparação entre os sistemas *TaqMan®* e *SYBR®Green* 26
- Figura 9** – Captura da tela da interface do software *Geneious Prime®*, indicando as sequências depositadas para posterior alinhamento 29
- Figura 10** – Captura da tela da interface do software *Geneious Prime®*, indicando o alinhamento pelo plug-in *MAFFT Alignment*, das 13 sequências de WNV utilizadas no estudo 30
- Figura 11** – Captura da tela da interface da ferramenta *UCSC In-Silico PCR* 30
- Figura 12** – Fluxograma demonstrando a metodologia utilizada para pesquisa nos bancos de dados correlacionando os arbovírus estudados com os testes *in vitro* e *in silico* 31
- Figura 13** – Relação entre publicações depositadas no ScienceDirect entre os anos de 2019 a 2022, com os CHIKV e WNV, e estudos *in vitro* e *in silico* 39
- Figura 14** – Relação entre publicações depositadas no PUBMED entre os anos de 2019 a 2022, com os CHIKV e WNV, e estudos *in vitro* e *in silico* 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Iniciadores construídos para CHIKV, com base nas análises do *Geneious Prime*® para sugerir amplificação da região *nsP2* por RT-PCR 34
- Tabela 2** – Iniciadores construídos para CHIKV, com base nas análises do *Geneious Prime*® para sugerir amplificação da região *nsP1* por RT-qPCR 35
- Tabela 3** – Iniciadores construídos para WNV, com base nas análises do *Geneious Prime*® para sugerir amplificação da região *E* por RT-PCR 36
- Tabela 4**–Iniciadores construídos para WNV, com base nas análises do *Geneious Prime*® para sugerir amplificação da região *3'UTR* por RT-qPCR 37

LISTA DE ABREVIATURAS

BIOMIC – Laboratório de Biologia de Microrganismos

BLAST– Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local(do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”)

C – Proteína de capsídeo

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do Inglês “Centers for Disease Control and Prevention”)

cDNA – DNA complementar

CHIKV – *Chikungunya virus*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP –Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

E – Proteína de envelope

ECSA – Leste/Centro/Sul Africano

IOL – Genótipo do Oceano Indico

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa (do inglês “*Japanese Encephalitis virus*”)

Kb –Kilobases

MAFFT –Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia(do inglês “National Center for BiotechnologyInformation”)

NS – Proteínas não estruturais (do inglês “nonstructural protein”)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

ORF – Matriz de Leitura Aberta (do inglês “Open Reading Frame”)

Pb – Pares de bases

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

prM –Pré Membrana

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa(do inglês “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction”)

RT-qPCR – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês “Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reactive”)

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (do inglês “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”)

SCIELO – Biblioteca eletrônica científica on-line (do inglês Scientific Electronic Library Online)

SNC – Sistema Nervoso Central

TR – Transcriptase Reversa

UTR – Região não traduzida (do inglês “Untranslated region”)

Waf – Genótipo da África Ocidental ou do Oeste Africano

WNV – *West Nile virus*

1INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças zoonóticas causadas por vírus, transmitidos de vetores invertebrados para hospedeiros vertebrados, tendo seus representantes distribuídos entre as famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), *Bunyaviridae* (gêneros *Orthobunyavirus* e *Phlebovirus*), *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (FIGUEIREDO, 2007). Os humanos e os animais infectados por esses vírus podem variar de uma sintomatologia subclínica a uma gama de sintomas leves e até evoluir para óbitos, enquanto os vetores não apresentam sinais da infecção mesmo com o contato durante toda a sua vida (LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Como resultado do impacto do aumento da densidade populacional por meio da urbanização e do desenvolvimento de sistemas globais de transporte, a frequência da exposição de humanos a mosquitos vetores e a mobilidade global de humanos aumentaram de forma significativa. Assim, conseqüentemente os padrões de interações vírus-vetor-hospedeiro também mudaram durante os últimos séculos. Em paralelo, a capacidade agrícola, a pecuária e o desmatamento generalizado se intensificaram em resposta às demandas do desenvolvimento industrial, urbanização e aumento da densidade populacional humana (LIMA-CÂMARA, 2016; GOULD et al., 2017).

Em relação às famílias de arbovírus, a *Flaviviridae* tem como um de seus principais membros o *West Nile virus* (WNV) ou vírus do Nilo Ocidental, causador de infecção assintomática na maioria das vezes. Os casos mais graves compreendem quadros de meningite, encefalite e paralisia flácida aguda. Ademais, cerca de 10% dos casos podem evoluir para óbito (GRUBAUGH; EBEL, 2016). A alta transmissibilidade deste vírus em climas subtropicais, quentes/úmidos e a alta morbidade podem afetar principalmente indivíduos em situações de vulnerabilidade e que já possuam outros comprometimentos de saúde (RONCA; RUFF; MURRAY, 2021).

Por sua vez, o *Chikungunya virus* (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae*, desencadeou mais de 70 epidemias entre os anos de 1959 e 2016. A infecção pode ser assintomática, mas quando sintomática é dividida em aguda, pós-aguda e crônica, tendo início com sintomas mais brandos, como febre, mialgia, dor de cabeça e erupção cutânea, que podem evoluir para comprometimentos em sistemas, especialmente nos indivíduos idosos. A gravidade por este vírus está relacionada à cronicidade da infecção, tanto com a persistência de artralgia debilitante que acomete entre 40 a 80% dos pacientes infectados, assim como também com a ocorrência de quadros neurológicos (BURT et al., 2017; SILVA et al., 2019).

O Estado do Piauí é considerado hiperendêmico para dengue - considerando a co-circulação dos 4 sorotipos de *Dengue virus* (DENV), além de já ter sido detectada a presença do WNV e do CHIKV (SANTOS, 2013; VALE, 2015; VIEIRA, 2015; GARCÊS, 2016; CARDOSO et al, 2019). Esse cenário impacta na morbimortalidade da população, principalmente que residem em áreas de risco ou possuem fatores de risco para desenvolvimento de sintomas mais graves. Muitos pacientes infectados geram um aumento na demanda do atendimento público, o que gera uma sobrecarga ao sistema de saúde. Em locais do país onde o manejo clínico e vigilância epidemiológica não são realizados de forma eficaz, os casos podem se desdobrar em óbitos (BRASIL, 2020).

Devido à dificuldade em distinguir clinicamente as diferentes arboviroses pela similaridade entre suas sintomatologias, principalmente na fase inicial da infecção, o diagnóstico laboratorial diferencial é fundamental para o correto manejo clínico do paciente, a vigilância epidemiológica dos casos, e o rastreamento da circulação dos vírus. Diferentes métodos podem ser utilizados, destacando-se os sorológicos - desenvolvidos a partir de reações entre antígenos e anticorpos, e os moleculares - a partir da detecção do material genético do patógeno, sendo que estes últimos apresentam resultados mais sensíveis e específicos (VOGELS et al., 2019; FISCHER et al., 2021).

No diagnóstico molecular são utilizadas as técnicas de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) convencional, que fornece um resultado qualitativo, e a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), que apresenta um resultado qualiquantitativo, por meio da mensuração do padrão de fluorescência. Para resultado confiável, os iniciadores que sinalizam qual região deve ser amplificada, precisam ser desenhados com parâmetros específicos para cada técnica empregada. Para a RT-qPCR, os principais sistemas de compostos fluorescentes são: o *SYBR®Green*, que se liga de forma inespecífica à dupla fita de DNA, e o *TaqMan®*, que utiliza uma sonda fluorescente específica para cada reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004; BUSTIN et al., 2017).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ARBOVÍRUS

Os arbovírus são um grupo de vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, contendo 545 espécies, composto em sua maioria por vírus de RNA (do inglês *Ribonucleic Acid*). Dessas, aproximadamente, 150 são consideradas de importância clínica, pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Esses vírus evolutivamente se adaptaram para funcionar em ambientes celulares divergentes como de insetos e mamíferos. Isto poderia ser explicado pelas altas frequências de mutação dos genomas de RNA, que podem auxiliar no ciclo de replicação em diferentes hospedeiros, visto que apenas uma das famílias desse grupo possui genoma de DNA (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

Durante as últimas décadas, populações humanas maiores foram afetadas pelos arbovírus, devido ao aumento da dispersão dos patógenos. Isso se deve a diversos fatores, como a falta de medidas de controle dos vetores e aumento das viagens aéreas para áreas endêmicas. Por conseguinte, são responsáveis por gerar a amplificação secundária em animais domesticados, o transbordamento de ciclos enzoóticos, e o contato dos hospedeiros humanos com vetores peridomésticos. Ademais, é possível que novas doenças em humanos e animais sejam desencadeadas a partir de novos arbovírus, ou pela expansão dos que já são conhecidos para novas áreas geográficas, influenciada por mudanças climáticas ou demográficas (WEAVER et al., 2018).

O único continente onde os arbovírus não são endêmicos é o Antártico. Estes vírus tendem a ter uma distribuição geográfica e climática específica. No Brasil, foram isoladas mais de 200 espécies, das quais 40 destas causam doenças em humanos (BAGNO et al., 2019). A distribuição destes agentes em larga escala no território nacional está diretamente relacionada à grande proliferação dos vetores, ao clima tropical e subtropical, ao crescimento urbano e presença de áreas florestais (ESPOSITO; FONSECA, 2017; LIMA-CÂMARA, 2016).

As manifestações clínicas da infecção pelos arbovírus podem variar, desde quadros assintomáticos até a ocorrência de doenças febris, com manifestações hemorrágicas e encefálicas ou sintomas artríticos persistentes (FIGUEIREDO, 2007; GUZMAN; HARRIS, 2015). A maioria dos infectados exibe sintomatologia com características inespecíficas durante a fase aguda, o que dificulta a distinção clínica entre arboviroses na fase inicial,

podendo apresentar febre, mialgia e artralgia, cefaleia, náuseas, vômitos, podendo evoluir ainda para casos crônicos e/ou para óbitos (HALL et al., 2012).

Para se fazer a diferenciação laboratorial entre os arbovírus, diversos métodos podem ser utilizados. Os sorológicos são testes rápidos e baratos, o que facilitam a sua utilização na rotina. Por outro lado, apresenta especificidade reduzida, aumentando a probabilidade de resultados falso-negativos, como também reação-cruzada em áreas de co-circulação de diferentes arbovírus. Por sua vez, os métodos moleculares apresentam como vantagem um resultado mais sensível e específico. Considerando que os arbovírus possuem genoma de RNA, as principais técnicas utilizadas são a RT-PCR, teste molecular convencional, e RT-qPCR, teste quali-quantitativo (MORELI; COSTA, 2013).

Com o intuito de implementar uma nova metodologia nos estudos de arboviroses, Costa (2021) padronizou a técnica de RT-qPCR para a quantificação genômica de CHIKV e WNV, tendo como alvos moleculares a detecção das regiões *nsP1* e *3'-UTR*, respectivamente. Ainda, em sua pesquisa foi identificada a dinâmica de circulação das arboviroses e avaliado o perfil clínico dos pacientes positivos para CHIKV, bem como também o perfil epidemiológico dos casos que evoluíram para a fase crônica, entre os anos de 2017 a 2020, no norte do Estado do Piauí.

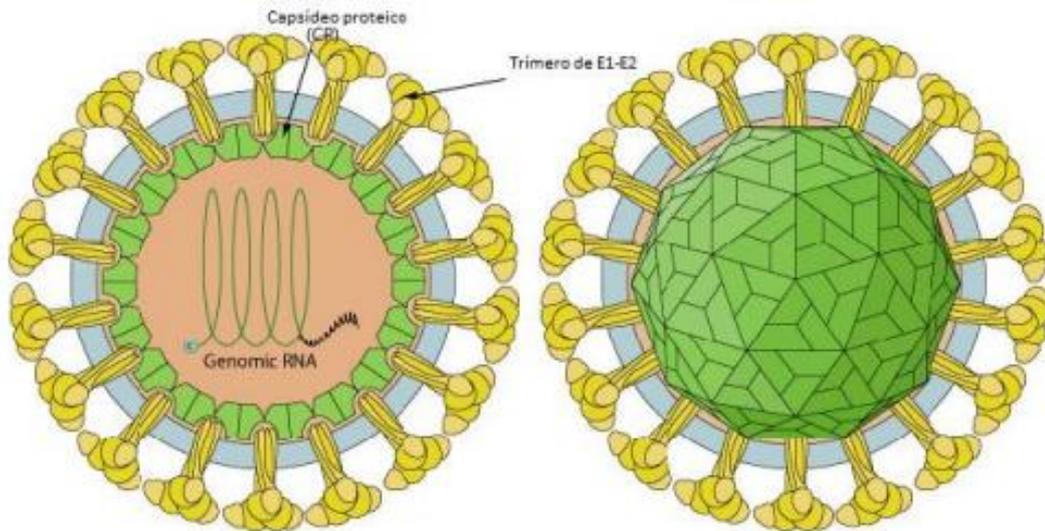
2.2 ALPHAVIRUS

O gênero *Alphavirus* é pertencente à família *Togaviridae*, tem mais de 40 membros, contendo apenas dois representantes aquáticos e um representante com infecção restrita aos insetos, sendo importantes causadores de epidemias pelo mundo (FIGUEIREDO, 2007). Os vírus causam doenças artríticas e encefalites em humanos e são classificados como vírus do Velho ou Novo Mundo, dependendo de sua distribuição geográfica. Os vírus do Velho Mundo geralmente causam febre, erupção cutânea e doenças artríticas, enquanto os do Novo Mundo majoritariamente desencadeiam encefalites (OMS, 2020).

Os vírus pertencentes a este gênero são esféricos, envelopados, com nucleocapsídeo icosaédrico de 65 a 70 nm (Figura 1), com genoma constituído de fita simples de RNA senso positivo contendo 10 a 12 kb, flanqueada por 2 regiões não codificantes (UTR, do inglês *Untranslated Region*): UTR 5' composta por 76 nucleotídeos, e UTR 3' constituída por 526 nucleotídeos. Possuem ainda duas matrizes de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), sendo que uma delas codifica uma poliproteína com 2.474 aminoácidos, que é clivada por proteases em 4 proteínas não estruturais (*nsP*, do inglês *Nonstructural Protein*), *nsP1*, *nsP2*, *nsP3* e *nsP4*, que atuam na multiplicação e montagem de novas partículas virais.

Enquanto isso, a outra ORF é composta por 3.735 nucleotídeos, e codifica uma poliproteína com 1.244 aminoácidos, que é clivada por proteases em 5 proteínas estruturais: CP, E3, E2, 6K e E1 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SILVA, 2019).

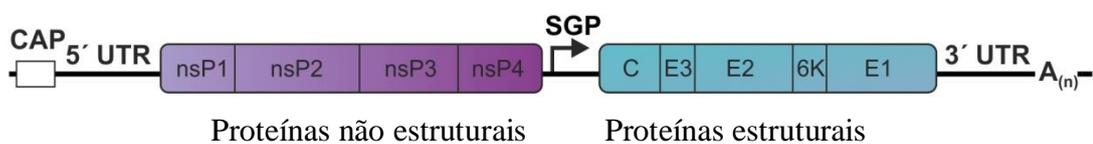
Figura 1 – Representação gráfica da estrutura da partícula viral dos membros pertencentes ao gênero *Alphavirus*.



Fonte: VIRALZONE, 2017; Adaptado por KOGA, 2017.

Os membros desse gênero têm no seu genoma glicoproteínas transmembranas tipo 1 de envelope, E2 e E1, que atuam na ligação do vírus à célula alvo do hospedeiro, causando endocitose por fusão de membrana. Ocorre a tradução e processamento das proteínas de replicação, que permitem a replicação do RNA genômico de entrada e a tradução do mRNA em proteínas estruturais. As sequências nas extremidades 5' e 3', assim como na região intergênica, apresentam elementos repetidos conservados que operam na regulação da síntese do RNA viral (ARIAS-GOETA et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2 – Representação gráfica de genoma dos vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus*, incluindo as ORFs de poliproteína não estrutural e estrutural.



Fonte: Adaptado PIETILA, 2017.

2.2.1 *Chikungunya virus*

2.2.1.1 Epidemiologia

O *Chikungunya virus* (CHIKV) foi isolado inicialmente em 1953 na Tanzânia, logo após um surto ocorrido em 1952 no mesmo local, a partir de soro de pacientes com doença febril associada a fortes dores articulares. No ano de 2007, a transmissão da doença foi relatada pela primeira vez na Europa. Até o final de 2013, os casos de surtos por este vírus haviam sido identificados em países da África, Ásia, Europa, e em países dos oceanos Índico e Pacífico. Ademais, ainda no fim de 2013, foi identificada a primeira transmissão local nas Américas e consequente expansão do CHIKV (SAHADEO et al., 2017; CDC, 2022).

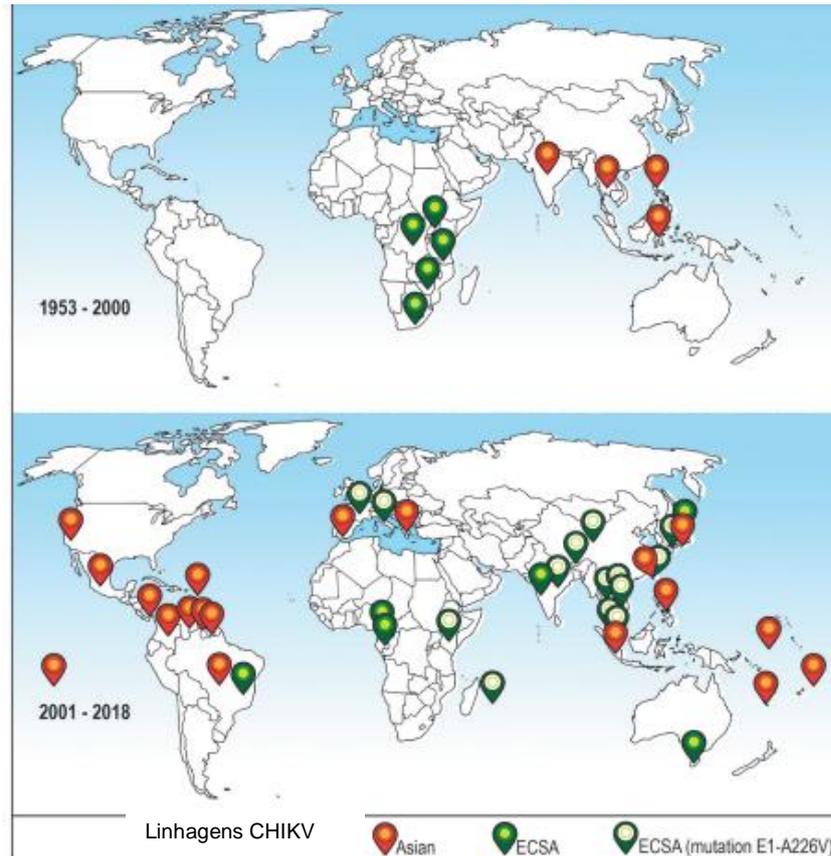
Durante o primeiro semestre de 2014, os casos de CHIKV no Brasil eram descritos apenas como importados. Contudo em setembro do mesmo ano, foi registrado o primeiro caso de transmissão autóctone do vírus na Região Norte (estado do Amapá) e posteriormente na Região Nordeste (em Feira de Santana, Bahia). Até outubro de 2014, mais 682 casos autóctones foram notificados ao Ministério da Saúde do país, com casos, majoritariamente, nas regiões em que houve as primeiras transmissões autóctones relatadas (PRESTI et al. 2014).

Em 2016, houve um total de 349.936 casos suspeitos e 146.914 casos confirmados laboratorialmente notificados pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), sendo que metade destes foram registrados em 2015. A maioria das infecções ocorreu no Brasil, Bolívia e Colômbia, contabilizando entre eles cerca de 300.000 casos suspeitos (OMS, 2020). Dessa forma, o CHIKV no Brasil tornou-se uma grande ameaça à saúde pública a partir do surto ocorrido nos anos 2015-2016, sendo que ainda há risco de infecção pelo vírus em cerca de 90% da população brasileira, devido à presença de dois genótipos distintos no território (CUNHA; TRINTA, 2017).

2.2.1.2. Diversidade genética

O CHIKV é dividido em três genótipos de acordo com a localidade e características genotípicas. O genótipo da África Ocidental ou do Oeste Africano (Wf) e o genótipo Oriental ou do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA) são mantidos na África, enquanto o Asiático é endêmico na Ásia. Durante a dispersão do vírus na Ásia, a linhagem do Oceano Índico (IOL) emergiu a partir do ECSA (Figura 3). Nas Américas, uma variante da linhagem asiática foi responsável pelo primeiro surto (ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016; MUSSO et al., 2018).

Figura 3 – Distribuição das linhagens de CHIKV, na imagem superior entre os anos de 1953-2000 e a na inferior entre os anos de 2001-2018.



Fonte: Adaptado TANABE et al, 2018.

No Brasil em 2014, foram confirmadas as primeiras infecções autóctones pelo genótipo asiático no Norte do país e o pelo genótipo ECSA na Bahia, a partir de um paciente infectado em Angola. Entre os anos de 2017 e 2018, foi relatado um surto no estado baiano, revelando a reintrodução do genótipo ECSA, com presença de linhagens já circulantes e emergentes de outros locais do país. Assim, demonstra-se a complexidade na dinâmica de expansão do CHIKV e os fatores que a influenciam como o transporte de pacientes entre as diferentes regiões e as alterações evolutivas dos vetores (MAIA et al. 2019; ZAID et al., 2021).

Durante a realização das atividades pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMIC), no norte do estado do Piauí, foi relatada por Cardoso et al, (2019) a circulação do genótipo ECSA do CHIKV no estado durante os anos de 2016 e 2017, e a caracterização molecular indicou a introdução desta linhagem no ano de 2015-2016. Por conseguinte, Barros (2018) indicou a manutenção deste arbovírus no estado e a evolução dos pacientes positivos para a fase crônica. Por sua vez, Silva et al, (2019) identificaram a

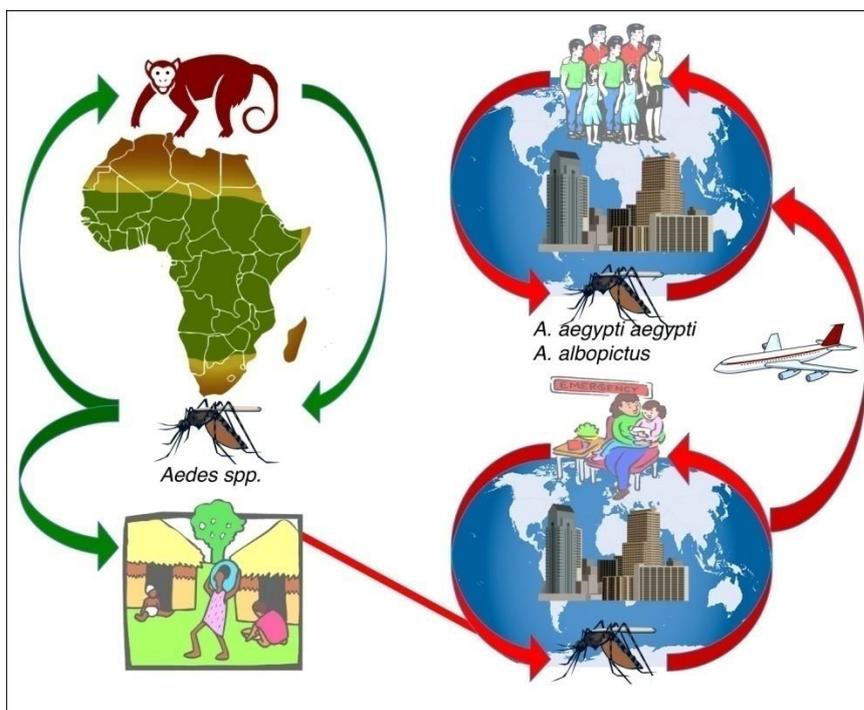
ocorrência de polineuropatia periférica nos membros superiores e inferiores em uma paciente com doença febril e artralgia grave.

2.2.1.3. Ciclo de transmissão

O CHIKV é um arbovírus transmitido entre humanos através de fêmeas de mosquitos *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. Ambas as espécies também podem transmitir outros vírus transmitidos por mosquitos, incluindo o DENV e o *Zika virus* (ZIKV) (OMS, 2020). Embora a transmissão direta entre humanos não esteja demonstrada, existe a possibilidade da transmissão vertical entre mãe e feto, acontecendo em 50% das gestações em que a mãe estava em viremia durante o parto (GALÁN–HUERTA *et al.*, 2018).

O ciclo tem início quando um mosquito não infectado realiza o repasto sanguíneo e se alimenta de um paciente infectado pelo vírus, e assim o mesmo pode ser transmitido para um novo hospedeiro não infectado, se multiplicando e aumentando a viremia. Se um mosquito se alimentar desses indivíduos durante o tempo em que o vírus circula no sangue, ele pode contrair o vírus e o ciclo pode ser reiniciado. Nos períodos não epidêmicos, os principais reservatórios do CHIKV são os mamíferos, enquanto que nos períodos epidêmicos, os seres humanos tornam-se os reservatórios principais, sendo que o período de incubação do vírus pode variar de quatro a sete dias (Figura 4) (TEIXEIRA *et al.*, 2015; BRASIL, 2020).

Figura 4 – Representação dos ciclos de transmissão enzoótica e urbana do CHIKV



Fonte: TSETSARKIN, 2016

2.2.1.4. Patogênese e aspectos clínicos

A partir da entrada do CHIKV no organismo humano, ocorre a replicação inicial nos fibroblastos dérmicos, que se desloca pela corrente sanguínea e pode infectar o fígado, os músculos, as articulações, o baço, os linfonodos e até o cérebro, adentrando as células do hospedeiro por endocitose mediada por clatrina (SOURISSEAU et al., 2007). Após a penetração do vírus e o seu desnudamento, ocorre sua multiplicação para formar novos vírions. O período virêmico no hospedeiro vertebrado pode variar, durando de dois a dez dias após a infecção (KAM et al., 2009).

Conforme observado, a infecção pode ser assintomática ou sintomática, sendo esta última classificada em três fases: aguda, pós-aguda e crônica. A primeira corresponde aos vinte e um dias iniciais a partir da infecção, caracterizada por quadro de febre alta, mialgia intensa, cefaleia, fotossensibilidade e erupção cutânea, podendo apresentar comprometimento no sistema nervoso central, respiratório e urinário, especialmente em indivíduos idosos. Na segunda fase, a maioria dos infectados apresentam melhorias e, alguns, têm recidivas relacionadas com poliartralgia e poliartrite (CUNHA; TRINTA, 2017).

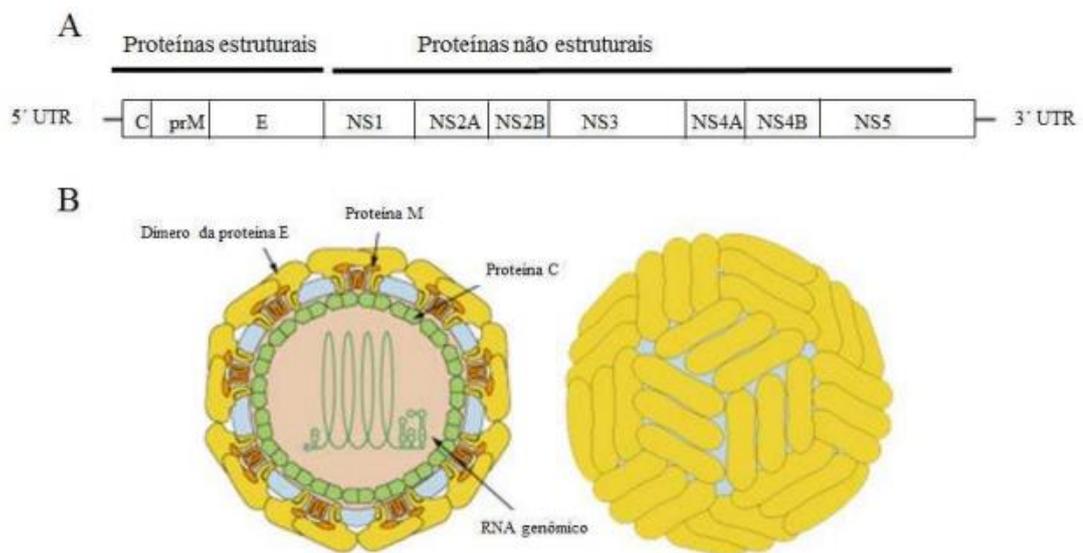
Por sua vez, a gravidade da infecção por CHIKV está associada à sua cronificação e caracteriza a terceira fase da infecção, em que os pacientes sofrem de artralgia por mais de três meses, sendo muitas vezes um quadro debilitante que pode ser acompanhado de edema e rigidez das articulações, estando presente entre 40 a 80% dos infectados (RUNOWSKA et al., 2018). No estado do Piauí, foi identificado por Silva et al, (2019) um caso positivo para CHIKV em uma mulher idosa com doença febril e artralgia grave. Foi constatada a ocorrência de polineuropatia periférica acometendo membros superiores e inferiores, evidenciada pelos achados eletroneuromiográficos.

O mecanismo pelo qual o vírus induz artrite persistente ainda não foi identificado, no entanto, o fato de que a cronicidade e a artrite reumatoide possuem muitas vias celulares e citocinas comuns relacionadas à sua patogênese, poderiam ser fatores que desencadeiam esse quadro. Nos últimos anos, a expansão do CHIKV para regiões tropicais e subtropicais da África e da Ásia afetou milhões de pessoas em todo o mundo. Atualmente, não existe vacina ou medicamento específico para a doença, e o tratamento dos casos é realizado para a diminuição dos sintomas apresentados. Em casos de cronificação, diferentes fármacos antirreumáticos têm sido utilizados, com espectro variável de sucesso entre os casos (WEAVER; LECUIT, 2015).

2.3 FLAVIVIRUS

O gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*, é composto por vírus que se destacam como importantes patógenos que infectam humanos e animais. São vírus envelopados de genoma de RNA fita simples e senso positivo, com aproximadamente 10-11 kb, e 40-60 nanômetros de diâmetro (FERREIRA et al., 2008). O genoma consiste em uma ORF flanqueada por 2 regiões não codificantes (5' UTR e 3' UTR). A única ORF é traduzida numa poliproteína compreendendo três proteínas estruturais (proteína C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)(Figura 5). Essas proteínas desempenham funções na montagem e replicação dos novos vírus, e na ligação entre vírus e células hospedeiras (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; SOUZA, 2019).

Figura 5 – (A) Representação gráfica do genoma dos *Flavivirus*, composto por uma única ORF com três genes que codificam proteínas estruturais e sete genes que codificam proteínas não estruturais, flanqueado por duas UTRs. (B) Representação gráfica da estrutura da partícula viral dos *Flavivirus*.



Fonte: RODRIGUES, 2021.

Os Flavivírus compreendem mais de 70 espécies circulantes, e dentre as que mais causam infecções estão o DENV, o vírus do Nilo Ocidental (WNV), e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (DAEP et al., 2014). A infecção ocasionada pelos Flavivírus pode se apresentar variando desde assintomática até evoluir para formas clínicas graves, como febre hemorrágica, meningoencefalite e complicações neurológicas, que são capazes de gerar altas taxas de morbimortalidade (HOLMES et al., 2020).

2.3.1 *West Nile virus*

2.3.1.1 Epidemiologia

O WNV foi isolado inicialmente no ano de 1937 em Uganda, e durante os anos de 1950 a 1970, o vírus causou alguns surtos associados às doenças febris (CHANCEY et al., 2015). Este arbovírus é endêmico em regiões da África, da Europa, da Ásia e do Oriente Médio, e em 1999, foi relatada sua presença nos Estados Unidos, ocasionando em uma epizootia equina e aviária, e, por conseguinte infecção humana, de onde se expandiu para o continente americano (GUBLER, 2006). Em 2003, nos EUA foram registrados 9.862 casos e 264 mortes (HEINZ; STIASNY, 2012).

A circulação no Brasil foi detectada em áreas florestais e rurais, sendo identificados anticorpos por ELISA em equídeos e aves na Amazônia e Pantanal, neste último, também foi detectado anticorpos no soro de galinhas (MELANDRI et al., 2012; SILVA et al., 2013; OMETTO et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2022). Em 2014 foi confirmado o primeiro paciente humano infectado por WNV, no Piauí, com encefalite aguda. O primeiro isolamento foi em 2018 no Espírito Santo, a partir de um cavalo morto com complicações neurológicas. No Ceará, em 2019 foi relatado o primeiro caso em um cavalo. Indicando assim, a dispersão desse vírus para diferentes áreas do país, e que mais casos possam ter ocorrido sem reconhecimento clínico e diagnóstico laboratorial (CASTRO-JORGE et al., 2019; SICONELLI et al., 2020; COSTA et al., 2021).

2.3.1.2 Diversidade genética

O WNV pode ser separado em até nove linhagens, embora muitas delas sejam mais apropriadamente classificadas como sublinhagens ou espécies distintas, devido aos altos níveis de divergência de sequência, e distinção ecológica e biológica (CIOTA, 2017). Desta forma, duas linhagens principais (I e II) de WNV são atualmente aceitas e podem causar doenças neuroinvasivas. A linhagem I é a mais distribuída, presente na África, na Europa, nas Américas, na Austrália e na Ásia, enquanto a linhagem II é encontrada circulando na África subsaariana e na Europa (VAZQUEZ et al., 2016).

A linhagem I do WNV é subdividida em clados diversos, como o NY-99 (clado Ia), que foi identificado nos Estados Unidos durante o surto de 1999, e o vírus Junjin (clado Ib), uma variante endêmica da Austrália. Por sua vez, a linhagem II não se manteve restrita apenas à África Subsaariana como inicialmente foi relatada, já que em 2004 ela passou a ser correlacionada com surtos de WNV na Europa Ocidental e Oriental, e são implicadas como participantes de ciclos endêmicos na Grécia e Espanha (KRAMER; STYER; EBEL, 2008).

A diversidade genética do WNV é influenciada pela deriva genética, o que possibilita rápida adaptação e surgimento de novos genótipos, mas com diminuição da eficiência da transmissão. O vírus alterna seu padrão entre expansão genética (ocorrida em mosquitos) e restrição (observada em aves). Hipóteses debatidas sugerem que nos períodos em que a transmissão ocorre de forma rápida, os vírus têm maiores chances de se adaptarem àquela localidade, devido a mais oportunidades de seleção. Além disso, os ciclos envolvendo vetores específicos podem também influenciar nessa disseminação (GRUBAUGH; EBEL, 2016).

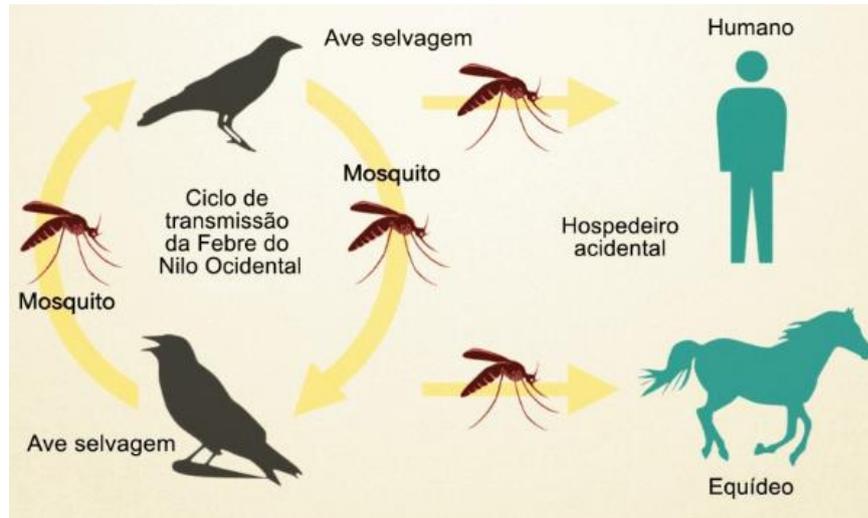
Diversos fatores influenciam na transmissão do WNV, entre eles, as condições climáticas que podem alterar a competência do vetor, a dinâmica populacional do vetor e a taxa de replicação do vírus dentro do mosquito. O aumento da temperatura ambiente e flutuações nas quantidades de chuva contribuíram para endemização do vírus em diversos países (PAZ, 2015). Ainda, nos próximos anos, áreas de risco podem se tornar mais evidentes, devido aos altos níveis de emissão de gases de efeito estufa. No Brasil, diversas áreas se tornarão mais propensas a apresentar distribuição do WNV, principalmente, as regiões Nordeste e Centro-Oeste e o bioma Pantanal (LORENZ; AZEVEDO; NETO, 2021).

2.3.1.3 Ciclo de transmissão

O WNV é transmitido, principalmente, pelos mosquitos do gênero *Culex sp.*, enquanto que espécies como *Aedes albopictus* e *Aedes vexans* são considerados potenciais vetores. Essa capacidade do vírus em infectar uma gama de mosquitos pode estar relacionada à alta diversidade das espécies hospedeiras, o que ocasiona diferentes ciclos de transmissão. Os pássaros são os hospedeiros reservatórios naturais, e o WNV é mantido na natureza pelo ciclo enzoótico entre mosquito-pássaro-mosquito, com a infecção humana ocorrendo pelo transbordamento desse ciclo (Figura 6) (ROSSI, ROSS, EVANS, 2010).

As espécies *Culex quinquefasciatus* e *A. albopictus* são altamente abundantes e amplamente distribuídas no Brasil, sendo um indicativo de risco para a transmissão vetorial do WNV no país. Além disso, a disseminação do vírus pode ocorrer ainda por meio de transfusão sanguínea e transplantes de órgãos, principalmente para pessoas imunocomprometidas. A transmissão vertical (entre mãe e feto), perinatal ou por meio da amamentação, apesar de ser possível, aparentemente não é considerada via importante (MARTINS et al., 2019).

Figura 6 – Esquema indicando o ciclo de transmissão do WNV, indicando o vetor (mosquito), o reservatório (ave) e os hospedeiros acidentais (humano e equídeo)



Fonte: TELLES, 2022.

2.3.1.4 Patogênese e aspectos clínicos

A maioria das infecções (cerca de 80%) causadas pelo WNV nos hospedeiros humanos são subclínicas, mas ao apresentarem sintomatologia, esta é diversificada, com ocorrência de casos leves a graves variando desde febre a meningoencefalite fatal. Na maior parte dos casos, a infecção resulta em quadro clínico descrito como “febre do Nilo Ocidental”, com sintomatologia semelhante a uma gripe leve, podendo apresentar mal-estar, dor nos olhos e cabeça, mialgia e erupção cutânea. Uma parcela dos indivíduos pode desenvolver meningite, encefalite ou paralisia flácida aguda (DONASILIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017).

A incidência de comprometimentos neurológicos causados pelo WNV corresponde entre 50-71% para encefalite entre 15-35% para meningite, e entre 3-19% para o desenvolvimento de paralisia flácida aguda. Os óbitos são correspondentes a 10% dos casos, e as sequelas clínicas, geralmente, são curadas dentro de um ano. A persistência da sintomatologia foi relatada em pacientes com quadros de doença neuroinvasiva do Nilo Ocidental. Os riscos para tais comprometimentos podem aumentar de acordo com fatores do hospedeiro, como a idade, a capacidade de resposta do sistema imunológico e a presença de outras doenças de base (CAMPBELL et al., 2002).

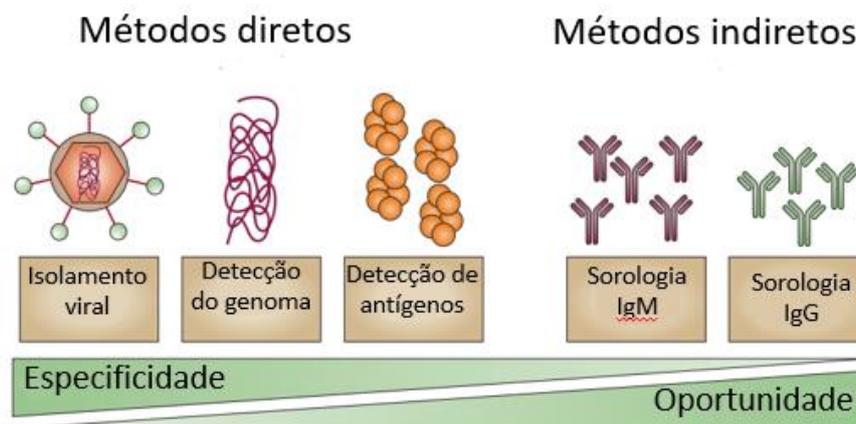
O WNV infecta células do sistema fagocitário mononuclear, monócitos e macrófagos, e células dendríticas (KRISHNAN et al., 2021). A infecção inicia a partir do acoplamento do vírus à superfície da célula do hospedeiro, e sua consequente entrada por meio de endocitose mediada por receptor. Estudos realizados indicaram que o WNV possui tropismo pelas

regiões cinzentas como medula espinhal, lobos temporais, gânglios da base e cerebelo (GUARNER et al., 2004).

2.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS ARBOVÍRUS

A sintomatologia das infecções ocasionadas por arbovírus se dá de forma similar e inespecífica, principalmente em fase inicial, o que dificulta o diagnóstico diferencial entre as patologias relacionadas. Diferentes métodos podem ser utilizados, dependendo do período clínico de cada paciente (Figura 7), sendo que dentre eles, o diagnóstico molecular se destaca por fornecer um resultado mais específico e sensível, a partir da capacidade de detectar o material genético do patógeno. Para esse grupo de doenças, a técnica mais utilizada é a RT-PCR convencional, a partir de uma análise qualitativa, e suas variantes como é o caso da RT-PCR quantitativa ou em tempo real (RT-qPCR) (MORELI; COSTA, 2013).

Figura 7 – Relação entre especificidade do teste diagnóstico e estágio clínico da infecção para detecção laboratorial dos arbovírus.



Fonte: PEELING et al., 2010. Adaptado por COSTA, 2021.

As técnicas comumente utilizam os mesmos reagentes, mas o que garante a diferenciação entre suas aplicações é a utilização de uma sequência alvo específica, e diferentes pares de iniciadores. Estes elementos são regiões curtas de nucleotídeos responsáveis por se ligarem a fita de material genético e assim, indicar para a enzima DNA polimerase qual região deve ser estendida. Partindo desse pressuposto, a construção destes iniciadores é uma etapa imprescindível para o resultado final das técnicas moleculares descritas. Ao se desenhar um par de iniciadores para uma região alvo específica, um deles deve se anelar com a fita positiva, orientada na direção 5' → 3'(senso) e o outro deve

complementar a fita negativa, orientada na direção 3' → 5' (contrassenso ou antissenso) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Para obtenção de um resultado fidedigno, é necessário que a construção dos iniciadores obedeça a algumas características, sendo elas (HALL et al., 2012):

- a) Deve ser constituído de 15 a 30 nucleotídeos a depender da técnica utilizada;
- b) O conteúdo de GC deve variar entre 40-60%;
- c) A extremidade 3' dos iniciadores deve conter uma guanina (G) ou citosina (C) para fixar o iniciador e aumentar a estabilidade, por meio das três ligações de hidrogênio contidas em pares de GC;
- d) As temperaturas de fusão ou de *melting* (T_m) devem variar entre 52-58 °C, embora possa ser divergido para 45-65 °C. Além disso, diferença de T_m final entre o par não deve ser maior que 5°C;
- e) As extremidades 3' do par não devem ser complementares entre si, assim como também a outras sequências no iniciador. Caso isso ocorra, poderá resultar, respectivamente, na formação de dímeros e estruturas em formato de gancho;
- f) Repetições de di-nucleotídeo ou base única devem ser evitadas, pois podem impedir o anelamento com a sequência alvo e/ou formar estruturas secundárias. Se for inevitável, incluir no máximo 4 bases.

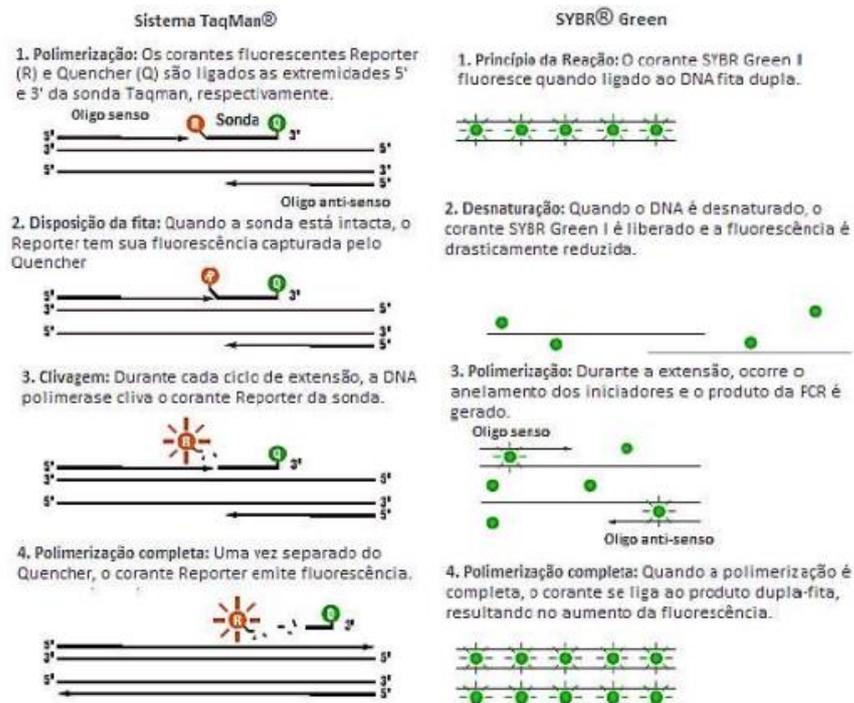
Na PCR com utilização de RNA como sequência alvo, é necessário realizar inicialmente a etapa de Transcrição Reversa (TR), onde há conversão do RNA em um molde de DNA complementar (cDNA) a partir da ação da enzima transcriptase reversa, que é formado por complementaridade à fita inicial. Além disso, para que ocorra a reação de forma bem-sucedida, é preciso se atentar ao uso de todos os reagentes necessários, tais como: iniciadores, RNA molde, DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), água estéril, MgCl₂ e tampões. Todos esses componentes são submetidos a diferentes temperaturas específicas em um termociclador, para que ocorra a TR, o anelamento e a formação da nova fita de DNA (BARKHAM et al., 2006; VIEIRA, 2011).

Para avaliar visualmente o produto da amplificação a partir da RT-PCR convencional, o material genético precisa ser submetido ao processo de eletroforese em gel, geralmente sendo utilizado a agarose como matriz para a corrida eletroforética. Com o auxílio de um tampão de carregamento (ou de corrida) e de um agente intercalante de DNA utilizado como corante, o produto é submetido a uma determinada corrente elétrica, onde deverá ser observado o perfil de migração do material. Devido o fato do DNA possuir carga negativa, durante a eletroforese esse material irá migrar pelo gel de agarose em direção ao pólo positivo

do dispositivo, de acordo com o seu peso molecular. Partículas com menor peso irão se dispersar mais rapidamente, enquanto partículas com maior peso irão se dispersar mais lentamente. Ao final do processo, ocorre a visualização dos produtos da amplificação sob luz ultravioleta (UV) por meio do transiluminador, geralmente com sistema fotodocumentador acoplado (BRONZONI et al., 2005; LORENZ, 2012).

Por sua vez, a RT-qPCR se destaca por permitir a detecção mais rápida do material genético alvo. Para sua realização, podem ser utilizados dois principais sistemas: o *SYBR®Green*, que utiliza corantes que se ligam de forma inespecífica à dupla fita de DNA, e o *TaqMan®*, que utiliza sondas fluorescentes específicas para cada reação (Figura 8). A sonda deve ser marcada por dois corantes fluorescentes, um repórter, que emite a fluorescência, e o *quencher*, que captura a fluorescência, até o anelamento com os iniciadores, em que a sonda é clivada por uma nuclease, permitindo a extensão da fita e a liberação da fluorescência. Por sua vez, o padrão de fluorescência emitido será captado pelo aparelho, e o software acoplado irá construir um gráfico, relacionando a quantidade de material genético presente na amostra com os ciclos que foram utilizados para sua amplificação (BUSTIN et al., 2017).

Figura 8 – Comparação entre os sistemas *TaqMan®* e *SYBR®Green*.



Fonte: SANTOS, 2020.

Diferentemente da técnica convencional, a RT-qPCR permite quantificação do material genético em tempo real. A especificidade e sensibilidade, a capacidade de alto

rendimento, por ser um sistema fechado, que minimiza a possibilidade de contaminação, e pela quantificação da carga viral que pode ser correlacionada com a gravidade dos sintomas a RT-qPCR a melhor tecnologia para a detecção e/ou acompanhamento e comparação dos níveis de RNA. No entanto, não existe validação por meio de estudos para indicar quão subjetivos são os resultados, como também possui incertezas acerca da validade biológica dos dados quantitativos (SILVA; QUINTANA, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Construir e validar iniciadores para aplicação e detecção molecular de CHIKV e WNV pelas técnicas de RT-PCR e RT-qPCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar diferentes ferramentas para desenhos de iniciadores;
- Construir iniciadores a partir das regiões *nsP1* e *nsP2* para CHIKV e regiões *E* e *3'UTR* para WNV;
- Avaliar iniciadores para RT-PCR e RT-qPCR por ferramentas *in silico*;
- Verificar o padrão de produção científica sobre CHIKV e WNV relacionado a ensaios *in silico* e *in vitro*, antes e durante a pandemia de SARS-CoV-2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DOS INICIADORES

Inicialmente, para a construção dos iniciadores aplicados à RT-PCR e RT-qPCR, foram selecionados os genes de interesse com base nas regiões conservadas descritas na literatura e utilizadas em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMIC), alocado nas dependências da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr), que já estuda há alguns anos sobre a circulação e manutenção dos arbovírus no estado piauiense.

Os genomas do CHIKV e do WNV foram consultados na página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e baixados em formato FASTA, no qual os nucleotídeos ou aminoácidos são representados usando códigos de uma única letra. As sequências de todos os vírus foram depositadas no software *Geneious Prime*® (Figura 9), responsável por todas as etapas de desenho dos iniciadores. Posteriormente, o anelamento múltiplo das sequências foi realizado pelo plug-in *MAFFT Alignment*, disponível no próprio programa (Figura 7).

Figura 9 – Captura da tela da interface do software *Geneious Prime*®, indicando as sequências depositadas para posterior alinhamento.

The screenshot displays the Geneious Prime software interface. The top menu bar includes File, Edit, View, Tools, Sequence, Annotate & Predict, and Help. The main window is divided into several panes:

- Left Pane:** A tree view showing the project structure, including Local files, NCBI databases, and various sequence types like Genomes, Plasmids, and Proteins.
- Center Pane:** A table listing sequences with columns for Name, Description, Modified, Sequence Length, # Sequences, % Pairwise Identity, % Identical, Tm, Topology, and Mo. The table shows 13 of 21 selected sequences, including various West Nile virus strains and complete genomes.
- Bottom Pane:** A 'Sequence View' showing a multiple sequence alignment of the selected sequences. The alignment is displayed as horizontal bars representing nucleotide positions. The 'Statistics' panel on the right indicates a mean length of 10,959 bp and 13 sequences.

Fonte: Autoria Própria, 2022.

Figura 10 – Captura da tela da interface do software *Geneious Prime*®, indicando o alinhamento pelo plug-in *MAFFT Alignment*, das 13 seqüências de WNV utilizadas no estudo.

The screenshot shows the Geneious Prime software interface. The main window displays a sequence alignment view. The top menu bar includes File, Edit, View, Tools, Sequence, Annotate & Predict, and Help. The toolbar contains various icons for navigation and editing. The sidebar on the left shows a project tree with folders for Local, WNV 21, Sample Documents, Alignments, Cloning, Contig Assembly, Genomes, Reference Features, Operations, and NCBI. The main window shows a consensus sequence and multiple individual sequences aligned below it. The alignment is color-coded by nucleotide type (A, C, G, T). The interface includes a menu bar, a toolbar, and a sidebar with a project tree. The status bar at the bottom indicates the cursor position and the original base number.

Os parâmetros para construção dos iniciadores para os arbovírus em questão foram previamente estabelecidos, como tamanho dos iniciadores e do fragmento amplificado, temperatura de anelamento e conteúdo GC%, de acordo com as particularidades de cada técnica. O *Geneious Prime*® indica os iniciadores, suas características básicas e possível formação de estruturas secundárias, sendo que essa análise consta como a primeira etapa para sua validação. Ao final da checagem, os iniciadores que atenderam aos parâmetros são submetidos ao *UCSC In-Silico PCR* (Figura 8), para pesquisa em banco de dados de seqüências de organismos, para avaliar possíveis amplificadores com genomas contaminantes.

Figura 11 – Captura da tela da interface da ferramenta *UCSC In-Silico PCR*

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR web interface. The interface is divided into sections for configuration options and output. The configuration options section includes fields for Genome, Assembly, Target, Forward Primer, Reverse Primer, Max Product Size, Min Perfect Match, Min Good Match, and Flip Reverse Primer. The output section shows a sample of the search results in FASTA format.

4.2 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A busca na literatura foi realizada nos bancos de dados ScienceDirect (Operado pela revista anglo-holandesa Elsevier), PubMed (Serviço da Biblioteca Nacional de Medicina do E.U.A do inglês U. S. National Library of Medicine) e SciELO (Biblioteca Eletrônica Científica Online, do inglês *Scientific Electronic Library Online*), utilizando como palavras-chave os descritores “*Chikungunya virus*”, “CHIKV”, “*West Nile virus*”, “WNV”, “*In vitro*”, “*In silico*”, relacionando-os por meio dos operadores booleanos OR e AND.

O recorte temporal da pesquisa foi delimitado entre os anos de 2019 (anteriormente à pandemia de SARS-CoV-2), até o momento da finalização da escrita do presente trabalho, em abril de 2022 (durante a pandemia). A referida cronologia foi definida a fim de quantificar e comparar o padrão das publicações realizadas acerca dos referidos arbovírus em estudos *in vitro* e *in silico*. Os dados foram tabulados e os resultados encontrados foram analisados por meio de estatística descritiva, sendo dispostos em tabelas e figuras (gráficos) elaborados, respectivamente, pelos programas *Microsoft Office Word*® e *Microsoft Office Excel*®, versão 2007 (Figura 9).

Figura 12 – Fluxograma demonstrando a metodologia utilizada para pesquisa nos bancos de dados correlacionando os arbovírus estudados com os testes *in vitro* e *in silico*



Fonte: Autoria Própria, 2022.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar o anelamento dos genomas dos arbovírus estudados por meio do software, foi realizada a pesquisa no GenBank, que consiste em banco de dados de sequências de nucleotídeos. Para o CHIKV, foram obtidas 157 sequências completas com no mínimo 12,000pb. No caso do WNV, as sequências foram selecionadas apenas com as da linhagem 1, que é a circulante nas Américas, sendo 13 sequências de genoma completo com no mínimo 11,000pb. Essa delimitação dos tamanhos é necessária para que haja homogeneidade em relação à quantidade de nucleotídeos, evitando sequências com regiões que não foram sequenciadas.

Ao final da análise, os iniciadores desenhados para CHIKV visando a amplificação do gene *nsP2* por meio da RT-PCR atenderam parcialmente aos requisitos estipulados. Os oito iniciadores gerados possuem em suas sequências os mesmos tamanhos, de 20 pb, que está incluído na faixa ideal entre 18 a 24. Ademais, as T_m e os conteúdos%GC estão dentro do intervalo ideal. O iniciador 2,893R foi o único que não formou nenhum tipo de estrutura secundária, apesar de ter na sua sequência quatro timinas subsequentes, o que pode facilitar a formação dessas estruturas. Entretanto, a possibilidade da formação delas nos outros iniciadores é diminuída devido à diferença entre temperaturas de formação das estruturas e das etapas da técnica (Tabela 1).

Para a RT-qPCR, o uso do gene *nsP1* para detecção de CHIKV gerou 10 iniciadores, também com características parcialmente ideais, devido a formação das estruturas secundárias em 6 destes (729F, 729F', 950F, 817R, 817R' e 1,054R), com temperaturas distintas em relação às utilizadas na técnica. Os tamanhos dos iniciadores são entre 19 e 20, e essa diminuição assim como no amplificado, é necessária devido ao aumento da sensibilidade da RT-qPCR (Tabela 2). Conforme observado na literatura, os iniciadores devem ser menores, apresentando entre 17-20 pb, para evitar amplificação de regiões contaminantes, e também, o amplificado deve ter no máximo 200 pb (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993). Essas características foram delimitadas anteriormente ao desenho.

Os iniciadores desenhados para WNV visando à amplificação do gene *E* por meio da RT-PCR resultaram em 5 pares com 20pb, T_m e conteúdo%GC ideais. Os iniciadores 1,815F, 1,845R, 1,845F indicaram temperatura de formação de estruturas secundárias distantes em relação às utilizadas na técnica (Tabela 3). Por fim, para a RT-qPCR, dois pares de iniciadores foram desenhados a partir do gene 3'UTR para detecção do WNV, e todos apresentaram possibilidade de formação de estruturas secundárias, e assim como na RT-PCR convencional, com temperaturas distantes das etapas da técnica. Quanto ao tamanho dos iniciadores de

WNV e seus amplificadores, foram seguidas as mesmas características dos desenhos utilizados para CHIKV (Tabela 4).

A detecção precoce de patógenos é crucial para a prevenção de doenças e manejo das infecções, para conter a disseminação dos casos de pacientes infectados durante surtos, epidemias e pandemias (KELLY-CIRINO et al., 2019; RAJAPAKSHA et al., 2019). Os métodos moleculares são mais sensíveis e específicos quando comparados a outros métodos diagnósticos, como os sorológicos, que são rotineiramente mais empregados para detecção dos arbovírus. No entanto, a otimização dos protocolos de PCR e seus derivados depende da eficiência e especificidade dos iniciadores utilizados para a amplificação do patógeno buscado (BUSTIN, 2017; GRUBAUGH, 2018)

Tabela1– Iniciadores construídos para CHIKV, com base nas análises do *Geneious Prime*®, para sugerir amplificação da região *nsP2* por RT-PCR.

Nome	Sequência	Tm	%GC	Hairpin Tm	Self Dimer Tm	Pair Dimer Tm	Amplificado (pb)
2,460F	GGAACGTTACTTGCCTTGAT	56.1	45.0	0	2.3	0	434
2,893R	GCATAGAGTGGGTTTTTCGTT	56.1	45.0	0	0	0	434
2,681F	GAATGAGTACAACATGCCGA	55.9	45.0	0	0	.9	913
3,593R	GAGCACATGATGTCCGTTTA	55.9	45.0	0	0	0.9	913
2,848F	GAGTTTACGCAGTTAGGCAA	56.1	45.0	37.8	0	0	958
3,805R	AGCATTTCAGTTTCATTGC	56.1	40.0	45.2	5.2	0	958
3,870F	GCAGATAGAACCAGTGAACG	58.3	50.0	0	0	37.0	30
3,899R	GCAGATTACTCGTTCCTGG	56.3	50.0	0	0	3.7	30

Fonte: Autoria própria, 2022.

Tabela 2 – Iniciadores construídos para CHIKV, com base nas análises do *Geneious Prime*© para sugerir amplificação da região *nsP1* por RT-qPCR.

Nome	Sequência	Tm	%GC	Hairpin Tm	Self Dimer Tm	Pair Dimer Tm	Amplificado (pb)
729F	GTGACTTCTGTAGCAAGG	57.6	52.6	0	0	14.3	89
817R	AGCGTTGACCCTACTGAGAA	58.4	50.0	0	0	14.3	89
729F'	ACAGAAGGTAGACGAGGCA A	58.4	50.0	0	0	14.3	89
817R'	AGCGTTGACCCTACTGAGA	57.6	52.6	0	0	14.3	89
950F	GATGAGCCCAGGCCTTTATG	58.4	55.0	43.2	0	0	105
1,054R	ACTCTTTCACCGTCTACCGT	58.4	50.0	33.7	0	0	105
1,051F	GAGTGTCATTCTCGGTGTG	55.7	52.6	0	0	0	80
1,130R	CGTGACTTCTGTAGCAAGG	55.7	52.6	0	0	0	80
1,051F	GAGTGTCATTCTCGGTGTGC	58.9	55.0	0	0	0	81
1,131R	GCGTGACTTCTGTAGCAAGG	58.9	55.0	0	0	0	81

Fonte: Autoria própria, 2022.

Tabela 3– Iniciadores construídos para WNV, com base nas análises do *Geneious Prime*© para sugerir amplificação da região *E* por RT-PCR.

Nome	Sequência	Tm	%GC	Hairpin Tm	Self Dimer Tm	Pair Dimer Tm	Amplificado (pb)
1,827F	GTGTAGGGTGAAGATGGAGA	56.0	50.0	0	0	0	535
2,361R	TAGAAGTCCCTGTGTGATCC	56.0	50.0	0	0	0	535
1,826F	AGTGTAGGGTGAAGATGGAG	55.9	50.0	0	0	0	538
2,363R	CCTAGAAGTCCCTGTGTGAT	55.9	50.0	0	0	0	538
1,815F	AGGACATCTGAAGTGTAGGG	55.9	50.0	0	0	25.1	31
1,845R	CTCCATCTTCACCCTACACT	55.9	50.0	0	0	25.1	31
1,845F	GAAGTTCAGCTTAAGGGAA	55.9	45.0	0	16.4	0	310
2,154R	GTGGTGGTTTATCTGCTGTT	55.9	45.0	0	0	0	310
1,688F	AGTTTGAAGAACCTCATGCC	55.9	45.0	0	0	0	563
2,250R	AAAATCCCAAGCAGTGTCTC	55.9	45.0	0	0	0	563

Fonte: Autoria própria, 2022.

Tabela 4– Iniciadores construídos para WNV, com base nas análises do *Geneious Prime*© para sugerir amplificação da região 3'UTR por RT-qPCR.

Nome	Sequência	Tm	%GC	Hairpin Tm	Self Dimer Tm	Pair Dimer Tm	Amplificado (pb)
10,814F	AACCAGGGAGAAGGGACTAG	57.7	55.0	38.5	0	25.3	98
10,911R	ACCTCTAGTCCTTCCCTTGG	57.7	55.0	0	0	25.3	98
10,552F	GCCACCGGAAGTTGAGTAGA	59.4	55.0	0	9.5	8.7	96
10,647R	GTTCTGAGGGCTTACGTGGA	59.4	55.0	0	0	8.7	96

Fonte: Autoria própria, 2022.

Com o desenho pelo *Geneious Prime*®, não é possível selecionar as regiões específicas para serem incluídas e excluídas depois de estarem aneladas, do gene de interesse que será amplificado, como é possível por outros softwares, como o *Primer3Plus*, que é comumente utilizado na construção de iniciadores. Essa característica aumenta a possibilidade do iniciador se pareara uma região ainda mais conservada, pois a partir da marcação entre os nucleotídeos subsequentes, é possível excluir regiões onde o genoma sequenciado já apresenta nucleotídeos mutados.

O *USCS In-Silico PCR*, uma das ferramentas pertencentes ao *In UCSC Genome Browser*, que consiste em um visualizador gráfico para explorar anotações de genoma para genética e biologia molecular, em constante atualização de dados e recursos. Em específico, o *USCS In-Silico PCR* pesquisa um banco de dados de sequências com um par de iniciadores de PCR, usando uma estratégia de indexação para desempenho rápido. Quando bem-sucedida, a pesquisa retorna um arquivo de saída de sequência no formato FASTA contendo todas as sequências no banco de dados que estão entre e incluem o par de iniciadores (HAEUSSLER et al., 2018).

Todos os iniciadores foram submetidos à ferramenta *USCS In-Silico PCR* para verificação de possível anelamento com material genético de organismos contaminantes que não fossem de interesse, como *Caenorhabditis brenneri*, *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Ebola virus*, *Saccharomyces cerevisiae*, e ainda, o genoma humano e do SARS-CoV-2, gerado resultado negativo para esta análise. Entretanto, a simulação dos iniciadores não foi realizada diretamente com seus respectivos vírus, devido à indisponibilidade nos bancos de dados do software. Por sua vez, esta foi a maior limitação encontrada durante a validação *in silico*, pela existência de poucas ferramentas disponíveis que compreendam genomas virais, principalmente dos arbovírus.

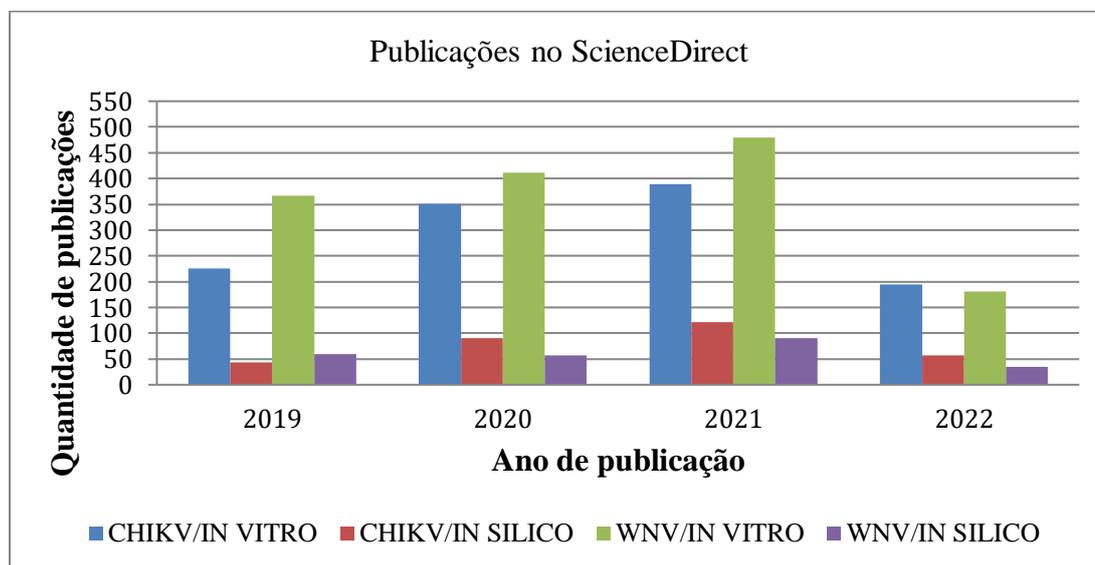
Na análise dos dados acerca da produção científica, quanto à pesquisa no ScienceDirect (Figura 6), sobre os ensaios *in vitro* e *in silico* relacionados ao CHIKV, e os estudos *in vitro* relacionados ao WNV, foi observado o aumento do número de trabalhos publicados durante os anos investigados. Enquanto isso, sobre os ensaios *in silico* voltados ao WNV foi verificada uma diminuição em 2020, e um aumento a partir de 2021. Quanto à pesquisa no PubMed (Figura 7), sobre os estudos *in vitro* relacionados ao CHIKV foi percebido aumento do número de trabalhos em 2020, e diminuição em 2021, enquanto que sobre os ensaios *in silico* voltados a este vírus, houve aumento nos anos subsequentes.

Ademais, tanto nos estudos *in silico* quanto em *in vitro* relacionados ao WNV houve aumento no ano de 2020, que se manteve inalterado em 2021. Quanto à pesquisa no SciELO,

a busca por ensaios *in vitro* e *in silico* voltados ao CHIKV não atenderam a delimitação de tempo, assim como a busca por estudos *in silico* relacionados ao WNV não possui nenhum depósito. Entretanto, a busca por ensaios *in vitro* voltados a este vírus resultou em 2 artigos de 2019 e 2020.

A partir da análise dos dados entre os anos de 2019 e 2021, no banco de dados ScienceDirect, a média das publicações sobre ensaios *in vitro* relacionados ao CHIKV foi de 321,6 com desvio padrão de 85,8, enquanto que a média das publicações sobre estudos *in silico* relacionados a este vírus foi de 85,0, com desvio padrão de 39,3. Ademais, a média das publicações sobre ensaios *in silico* relacionados ao WNV foi de 68,7, com desvio padrão de 18,5, enquanto que a média das publicações sobre estudos *in vitro* relacionados a este vírus foi de 419,3, com desvio padrão de 56,9. Esses valores demonstram o grande aumento nos estudos produzidos ao longo dos anos, indicando uma não homogeneidade da amostra.

Figura 13 – Relação entre publicações depositadas no ScienceDirect entre os anos de 2019 a 2022, com os CHIKV e WNV, e estudos *in vitro* e *in silico*

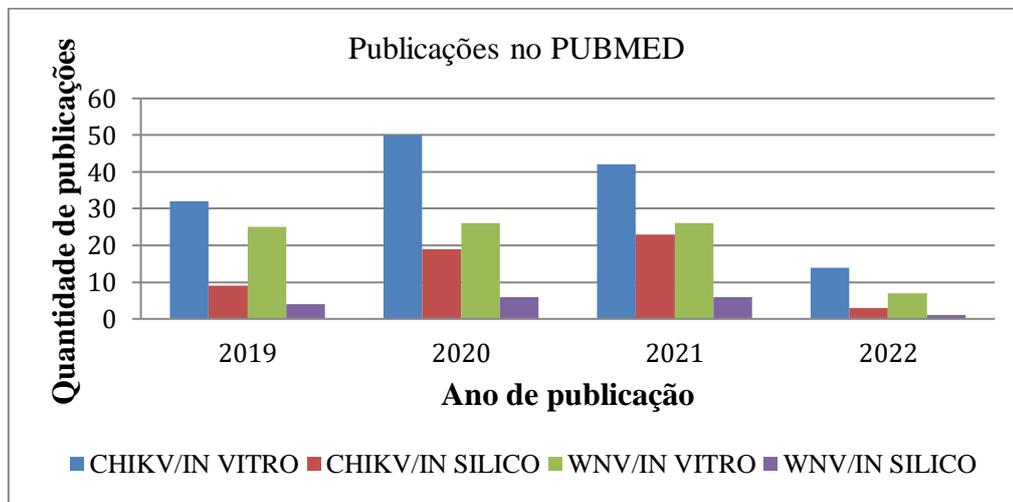


Fonte: Autoria Própria, 2022.

No banco de dados do PubMed, a média das publicações sobre ensaios *in vitro* relacionados ao CHIKV foi de 41,3 com desvio padrão de 9,1, enquanto que a média das publicações sobre estudos *in silico* relacionados a este vírus foi de 17, com desvio padrão de 7,2. Ademais, a média das publicações sobre ensaios *in silico* relacionados ao WNV foi de 5,3, com desvio padrão de 1,1, enquanto que a média das publicações sobre estudos *in vitro* relacionados a este vírus foi de 25,6, com desvio padrão de 0,6. Entre o ScienceDirect e o PubMed pode-se observar uma discrepância no número de estudos, e ainda, neste último, a

quantidade de depósitos de trabalhos é mais uniforme, sem grandes variações ao longo dos anos. Isso indica que no PUBMED, a amostragem é mais homogênea em comparação aos estudos disponíveis no ScienceDirect, porém, com quantidade inferior.

Figura 14 – Relação entre publicações depositadas no PUBMED entre os anos de 2019 a 2022, com os CHIKV e WNV, e estudos *in vitro* e *in silico*



Fonte: Autoria Própria, 2022.

A pandemia de SARS-CoV-2 criou a necessidade de testes diagnósticos rápidos em larga escala para solicitar intervenções clínicas e de saúde pública. Nesse contexto, é imprescindível o desenvolvimento de iniciadores que visem regiões conservadas no genoma para evitar resultados falso-negativos e diminuir a necessidade de padronização em diferentes protocolos das técnicas (ANANTHARAJAH et al., 2021; DAVI et al., 2021). Assim como o SARS-CoV-2, os arbovírus estudados em questão também são de genoma RNA, o que indica um genoma com diversas regiões polimórficas que podem limitar a detecção molecular (PARL et al., 2020).

As sequências de alta qualidade são essenciais para realizar os desenhos dos iniciadores, e em muitos casos, filtrar sequências aumenta a sua eficiência. E uma maneira que pode ser utilizada para essa filtragem, é o alinhamento, que permite a organização e visualização das posições dos nucleotídeos com base na similaridade. As ferramentas de alinhamento são úteis, pois podem ser usadas para criar grupos de sequências homólogas, verificar se um gene alvo contém polimorfismos, obter informações sobre relações funcionais, estruturais e evolutivas e até encontrar possíveis erros de sequenciamento (CHOWDHURY; GARAI, 2017).

A pandemia de SARS-CoV-2 visibilizou dificuldades para o manejo pela saúde pública brasileira e para o avanço do conhecimento do sistema público de pesquisas. A COVID-19 é ainda problematizada no Brasil pela sua coexistência com arboviroses. Fatores sócioeconômico relacionado às políticas públicas (como a intermitência de recursos para o combate aos vetores de transmissão de arboviroses) e ambientais (a adaptação urbana dos vetores) auxiliam na dificuldade de enfrentamento da pandemia e em conjunto as outras doenças já existentes no território (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Campos et al (2021), indicou o perfil de resposta da comunidade científica brasileira frente a Pandemia do COVID-19. A partir da análise das publicações indexadas na Web of Science, indicaram que o desenvolvimento de estudos em COVID-19, foi realizado marcadamente por parte de grupos internacionalizados e que já eram ativos na temática das arboviroses. Pode-se sugerir assim, que o enfrentamento da pandemia, demandou o esforço conjunto de grupos de estudos de diversas áreas, o que fez com que essas outras temáticas, como as arboviroses, ficassem a segundo plano, principalmente em estudos *in vitro*.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o referido estudo, conclui-se que:

- Os iniciadores construídos para CHIKV e WNV atenderam as características básicas e ideais de funcionamento para anelamento adequado, tanto para a técnica de RT-PCR como para RT-qPCR;
- A partir dos iniciadores construídos, verificou-se que estes poderão, posteriormente, serem validados *in vitro* e utilizados na experimentação das técnicas moleculares de detecção dos arbovírus em questão;
- O software *Geneious Prime*®, é uma ferramenta alternativa de fácil uso, que consta com arcabouço de alinhamento e análises das características dos iniciadores desenhados;
- Durante o período pandêmico de SARS-CoV-2, houve um aumento nas produções bibliográficas sobre testes *in silico* relacionados aos citados arbovírus;
- A partir da detecção e distinção laboratorial dos arbovírus, principalmente em áreas de co-circulação, permite a vigilância epidemiológica, e conseqüente manejo e acompanhamento da evolução dos casos;
- O contexto pandêmico indicou ainda mais a necessidade do uso de técnicas alternativas para validação *in silico* de iniciadores para detecção de outros patógenos, como os arbovírus, principalmente em áreas endêmicas onde estes co-circulam.

REFERÊNCIAS

- ARIAS-GOETA, C. *et al.* *Chikungunya virus* adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect Genet Evol*, v. 24, p. 116-26, Jun 2014. ISSN 1567-7257. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681263>
- BAGNO, F. F., *et al.* Undetected *Chikungunya virus* co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of Dengue and Zika. *J Clin Virol*. V. 113, p. 27-30, feb. 2019.
- BARROS, E. L. T. Caracterização molecular de *Chikungunya virus* e investigação dos arbovírus *Dengue virus*, e *Mayaro virus* no Estado do Piauí. Março de 2018. Dissertação – Universidade Federal do Piauí;
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Brasília-DF, 2020.** Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-33-2020.pdf>, v. 51, n. 33. Acesso em: 14 abr. 2022.
- BURT, F. J., *et al.* *Chikungunya virus*: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis* 2017; v. 17, n. 4 , p. 107–17, fev. 2017;
- BUSTIN, S. A. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.
- BUSTIN, S. *et al.* QPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection And Quantification**, [S.L.], v. 14, p. 19-28, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>.
- CAMPBELL, G. L. *et al.* *West nile virus*. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 519-529, 2002.
- CARDOSO, F. D. *et al.* Circulation of *Chikungunya virus* East-Central-South Africa genotype during na outbreak in 2016-17 in Piaui State, Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [S.L.] out. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201961057>.
- CASTRO-JORGE, L. A. de *et al.* *West Nile virus* infections are here! Are we prepared to face another flavivirus epidemic? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.] mar. 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0089-2018>.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Where Has Chikungunya Virus Been Found?** Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> Acesso em: 14 abr. 2022.
- CHANCEY, C.; *et al.* The global ecology and epidemiology of *West nile virus*. **Bio Med research international**, 2015.
- CIOTA, A.T. *West Nile virus* and its vectors. **Current opinion in insect science**, v. 22, p. 28-36, 2017.

COSTA, D. S. **Investigação molecular das arboviroses circulantes na cidade de Parnaíba – Piauí**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2021.

CUNHA, R. V.; TRINTA., K. S. *Chikungunya virus*: clinical aspects and treatment – A **Review**. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, aug. 2017.

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

DIEFFENBACH, C. W. LOWE T. M. J., DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR methods appl**, v. 3, n. 3, p. S30-S37, 1993.

DONASILIO, M. R., FREITAS, A. R. R., VON ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev Saúde Pública**, v. 51, n. 30, 2017.

ESPOSITO, D. L. A.; DA FONSECA, B. A. L. Sensitivity and Detection of Chikungunya viral Genetic Material Using Several PCR-based Approaches. **Ver Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 4, p. 465-469, July-August. 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 2, p. 224-229, Apr.2007 .Available from<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003786822007000200016&lng=en&nrm=iso>. accesson 16Feb. 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>.

FISCHER, C. *et al.* Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 1221-1229, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.047>.

GALÁN-HUERTA, K. A., *et al.* *Chikungunya virus*: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175-183, 2015.

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

GOULD, E. *et al.* Emerging arboviruses: why today?. **One Health**, [S.L.], v. 4, p. 1-13, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.

GRUBAUGH, N.D. *et al.* Tracking vírus outbreaks in the twenty- First century. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 10-19, 13 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0296-2>.

GRUBAUGH, N. D.; EBEL, G. D. Dynamics of *West Nile virus* evolution in mosquito vectors. **Current opinion in virology**, v. 21, p. 132-138, 2016.

- GUARNER, J. *et al.* Clinicopathologic study and laboratory diagnosis of 23 cases with West Nile vírus encephalomyelitis. **HumanPathology**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 983-990, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2004.04.008>.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2006.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, 2015.
- HADFIELD, J. *et al.* Twenty years of *West Nile virus* spread and evolution in the Americas visualized by Nextstrain. **PLoSPathogens**, v. 15, n. 10, p. e1008042, 2019.
- HALL, R. A. *et al.* **Advances in arbovirus surveillance, detection and diagnosis**. 2012.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, 2012.
- HENDLING, M. *et al.* In-silico Design of DNA Oligonucleotides: challenges and approaches. **Computational And Structural Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 17, p. 1056-1065, 2019. ElsevierBV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.csbj.2019.07.008>
- HERNANDEZ, R., BROWN, D.T., PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. *Adv Virol*, v. 2014, doi: 10.1155/2014/259382;
- HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: an update. **Acta tropica**, v. 190, p. 99-111, 2019.
- HOLMES, A. C. *et al.* A molecular understanding of alphavirus entry. **PlosPathogens**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 1008876, 22 out. 2020. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>.
- JOSE., J., SNYDER, J. E., KUHN, R. RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, p. 837-856, sep. 2009;
- KAM, Y.W. *et al.* Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 11, n. 14-15, p. 1186-1196, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.003>.
- KELLY-CIRINO, C. D. *et al.* Importance of diagnostics in epidemic and pandemic preparedness. **Bmj Global Health**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 001179, 29 jan. 2019. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001179>.
- KOGA, R. C. R. **Aspectos clínicos e sorológicos de indivíduos com sinais e sintomas de Febre Chikungunya**. 2017. Dissertação. (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2017.
- KRAMER, L. D.; STYER, L. M.; EBEL, G. D.. A Global Perspective on the Epidemiology of *West Nile virus*. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 61-81, 1 jan. 2008. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093258>.

KRISHNAN, S. M. *et al.* Comparison of Cytokine Expression Profile in Chikungunya and Dengue Co-Infected and Mono-Infected Patients' Samples. **Pathogens**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 166, 4 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10020166>

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

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

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

LORENZ, T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus trouble shooting and optimization strategies. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 63, p. e3998, 2012.

MAIA, Z. P. G. *et al.* Return of the founder *Chikungunya virus* to its place of introduction into Brazil revealed by genomic characterization of exanthematic disease cases. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 53-57, 27 dez. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2019.1701954>.

MARTINS, L, C. *et al.* First isolation of *West Nile virus* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** [online]. 2019, v. 114 [Accessed 14 April 2022] , e180332. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180332>. Epub 17 Jan 2019. ISSN 1678-8060. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180332>.

MORELI, M. L., DA COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis, **Virology Discovery** 2013. Disponível em: <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2052-6202-1-1.pdf>

MUSSO, D. *et al.* Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. **The Lancet Infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. e355-e361, 2018.

NOVAIS, C. M., PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**. Edição 33 julho/dezembro 2004.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Chikungunya**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>. Acesso em: 14 abr. 2022 .

PEREIRA, A. S. **Expressão de proteínas recombinantes dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya para diagnóstico sorológico diferencial das viroses**. 2018. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

PESKO, K. N. *et al.* *West Nile virus* population genetics and evolution. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 181-190, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.014>.

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

RAJAPAKSHA, P. *et al.* A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. **The Analyst**, [S.L.], v. 144, n. 2, p. 396-411, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c8an01488d>.

RODRIGUES, J. V. S. **Avaliação do potencial efeito antiviral de compostos 1,2,3-triazólicos derivados da vanilina contra o Zika vírus**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

RONCA, S. E., RUFF, J. C., MURRAY, K. O. A 20-year historical review of *West Nile virus* since its initial emergence in North America: has *West Nile virus* become a neglected tropical disease?. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 0009190, 6 maio 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0009190>.

ROSSI, S. L.; ROSS, T. M.; EVANS, J. D.. *West Nile virus*. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 47-65, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>.

ROSSINI, G.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V.. Evolution and epidemiology of *chikungunya virus*. **In: Chikungunya Virus**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 3-10.

RUNOWSKA, M. *et al.* *Chikungunya virus*: a rheumatologist's perspective. **Clin Exp Rheumatol**, v. 36, n. 3, p. 494-501, 2018.

SAHADEO, N. S. D. *et al.* Understanding the evolution and spread of *chikungunya virus* in the Americas using complete genome sequences. **Virus Evolution**, v. 3, n. 1, 2017.

SANTOS, J. C. **Investigação por técnicas moleculares de *Dengue virus* (DENV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV**. 2020. 73 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba, 2020.

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

CAMPOS, A. S. *et.al.* Nota técnica: a resposta rápida da ciência brasileira ao COVID-19 a partir do estudo de arboviroses. **Rev. Tecnol. Soc.**, Curitiba, v. 17, n. 46, p.297-308, jan./mar., 2021. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rts/article/view/12383>.

SILVA, V. L. O.; QUINTANA, V. H. A. Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika. 2019. **Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto**, 2019.

SILVA, V. P. *et al.* Peripheral polyneuropathy associated with *Chikungunya virus* infection. **Journal Of Neurovirology**, [S.L.] ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-019-00782-7>.

SOURISSEAU, M. *et al.* Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. In: (Ed.). **PLoS Pathog**, v.3, 2007. ISBN 1553-7366 (Print)1553-7374 (Electronic). Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030089>

SOUZA, A. F. P.V. B. **Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV)**. 2019. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* East/Central/South african genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 906-8, 2015.

VALE, V. S. **Caracterização molecular de Dengue virus circulantes no Nordeste Brasileiro**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VÁZQUEZ, A. *et al.* Real time PCR assay for detection of all known lineages of *West Nile virus*. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 236, p. 266-270, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.026>.

VIEIRA, D. P. Técnicas de PCR: **Aplicações e Padronização de Reações**. v. 18, 2011.

VOGELS, C. B. F. *et al.* Arbovirus coinfection and co-transmission: a neglected public health concern?. **Plos Biology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 3000130, 22 jan. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3000130>.

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

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

WEAVER, S. C. *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 69, n. 1, p. 395-408, 29 jan. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>.

ZAID, A. *et al.* Arthritogenic phaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 123-133, mai. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30491-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30491-6).