



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIEGO DO PRADO VENTORIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA, ES

2018

DIEGO DO PRADO VENTORIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

VITÓRIA, ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

V466d Ventorim, Diego do Prado, 1993 -
Diversidade genética de Chikungunya no estado do Espírito Santo /
Diego do Prado Ventorim – 2018.
72 f. : il.

Orientador: Iuri Drumond Louro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Vírus Chikungunya. 2. Filogenia. 3. Infecções por Arbovirus. 4.
Variação Genética. I. Louro, Iuri Drumond. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**"DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO ESPÍRITO
SANTO"**

Diego do Prado Ventorim

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro (UFES)
Orientador

Profa. Dra. Débora Dummer Meira (UFES)
Membro Interno

p/ Prof. Dr. Marcelo dos Santos (UFRN – Participação Remota)
Membro Externo

Vitória-ES, 05 de março de 2018.

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família por todo suporte e pelo apoio em continuar na vida acadêmica. Agradeço à minha mãe por sempre me apoiar nas minhas decisões, dando opiniões e conselhos. Ao meu pai e irmãos por entenderem que Mestrado é sim um trabalho e não “ apenas estudos”.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Iuri Drumond Louro pela confiança e pelo apoio desde a graduação. Agradeço imensamente à Fernanda, que passou todos os momentos do Mestrado comigo, compartilhando tristezas e felicidades!

Agradeço ainda a Elaine pelo apoio desde a graduação, me dando conselhos e esporros hehe, sempre respondendo qualquer dúvida minha, em qualquer horário que seja, sendo um exemplo de força de vontade e trabalho duro!

Agradeço ainda à Michelle pelas ajudas diversas e conselhos no projeto. Agradeço também ao Luiz Valli † por idealizar o projeto.

Agradeço à Raquel Spinassé por toda ajuda no decorrer do projeto e principalmente pelo apoio na correção desta dissertação. Agradeço ao Lucas pelo auxílio interno no LACEN e por sempre estar disponível para qualquer dúvida que seja. No mais, agradeço imensamente a todos os colegas de laboratório que fazem com que os dias fiquem menos pesados e mais alegres!

Agradeço à minha namorada, que sempre estava lá para me apoiar em qualquer decisão... sempre pronta para ouvir meus desesperos e alegrias, no fim sendo meu porto seguro sempre. Te amo meu amor!

Agradeço ainda aos meus companheiros do G.R.E.S. Seleção Natural que desde a graduação estão comigo, compartilhando alegrias e frustrações na Biologia, auxiliando sempre no alívio das tensões do mestrado e proporcionando momentos de incomparáveis alegrias no Bar do Pedro.

Agradeço à Secretaria Estadual de Saúde/ES e o Laboratório Central/ES pela parceria que possibilitou este a realização deste projeto.

Agradeço à FAPES/CAPES por financiar o projeto e pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço ainda à banca de defesa pelo tempo dedicado à leitura do trabalho e pelas sugestões que enriquecem ainda mais o estudo.

No mais, agradeço todos meus amigos que de alguma forma me auxiliaram/apoiariam no desenvolvimento desse trabalho.

“The moment that you own it, you better never let it go”

Lose Yourself - Eminem

RESUMO

VENTORIM, D.P. **Diversidade Genética de Chikungunya no estado do Espírito Santo**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A febre chikungunya é uma arbovirose altamente debilitante, causada pelo vírus chikungunya, o qual é transmitido pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Em 2014 foram registrados os primeiros casos da doença no Brasil, sendo constatada a presença dos genótipos asiático e Leste/Centro/Sul africano do vírus. No final de 2015, pela primeira vez, foram reportados casos no Espírito Santo (ES) e entre 2016-2017 o estado enfrentou um surto da doença. Diante disso, nós, juntamente à Secretaria Estadual de Saúde/ES e ao Laboratório Central/ES objetivamos identificar qual linhagem do vírus circula no ES; analisar características genéticas virais nas amostras estudadas e levantar dados epidemiológicos sobre a doença no estado. As amostras do estudo foram provenientes do Laboratório Central/ES e referentes ao período de março/2016 - dezembro/2017. O diagnóstico viral foi realizado por sorologia ou por técnicas moleculares. Vinte e sete amostras (diagnosticadas molecularmente) foram utilizadas na amplificação parcial e sequenciamento de dois genes codificantes de proteínas do envelope viral, *E1* e *E2*. Seis dessas amostras foram utilizadas nas análises filogenéticas. Os resultados epidemiológicos demonstraram que no período do estudo foram reportados 2.021 casos suspeitos da febre chikungunya, sendo 412 (20,38%) confirmados. Além disso, a distribuição geográfica desses casos constatou que Vitória e Vila Velha representaram mais de 50% de todos os casos do estado. Os achados mostraram que a frequência da infecção pelo vírus chikungunya, em relação ao número de amostras referenciadas ao Laboratório Central/ES, pode ser considerada baixa. No entanto, constatou-se que a doença apresenta relevância epidemiológica e grande distribuição no estado. Os resultados filogenéticos evidenciaram que o vírus circulante pertence à linhagem Leste/Centro/Sul africana, a qual também foi constatada em diversos surtos na Europa, África e Ásia. Além disso, a caracterização molecular dos fragmentos das

proteínas E1 e E2 não mostraram a presença das mutações adaptativas E1-K211E; E1-A226V; E2-L210Q e E2-I211T. Esse resultado permite sugerir que o vírus circulante no ES apresenta um potencial de disseminação menor em comparação aos vírus circulantes em grandes epidemias mundiais recentes. Devido à falta de uma vacina e à dificuldade no controle populacional do mosquito vetor, estudos sobre a diversidade genética como este tornam-se alternativas viáveis em busca de melhor entendimento e controle da febre chikungunya no Brasil e, especificamente, no ES.

Palavras chave: Chikungunya. Filogenia. Arbovirose. Diversidade genética

GENETIC DIVERSITY OF CHIKUNGUNYA IN THE ESPÍRITO SANTO STATE.

ABSTRACT

VENTORIM, D.P. **Genetic Diversity Of Chikungunya in the Espírito Santo State.** 2018. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Chikungunya fever is a highly debilitating arbovirose, caused by chikungunya virus, which is transmitted by the bite of *Aedes* genus mosquitoes. In 2014, the first disease cases were registered in Brazil, with Asian and East/Central/South African virus genotypes presence. At the end of 2015, for the first time, cases were reported in Espírito Santo (ES) and between 2016-2017 the state faced a disease outbreak. Thus, we, along with the State Department of Health/ES and the Central Laboratory/ES, aim to identify which virus strain circulates in ES; analyze viral genetic characteristics in the samples studied and to collect epidemiological data about the disease in the state. Study samples came from Central Laboratory/ES and refer from March 2016 to December 2017. Viral diagnosis was performed by serology or by molecular techniques. Twenty-seven samples (molecularly diagnosed) were used in the partial amplification and sequencing of two genes encoding viral envelope proteins, *E1* and *E2*. Six of these samples were used in phylogenetic analyzes. Epidemiological results demonstrated that during the study period, 2,021 suspected cases of chikungunya fever were reported, of which 412 (20.38%) were confirmed. In addition, geographical distribution of these cases showed that Vitória and Vila Velha represented more than 50% of all cases in the state. The findings showed that frequency of chikungunya virus infection, in relation to the number of samples referred to Central Laboratory/ES, can be considered low. However, it was verified that the disease presents epidemiological relevance and high distribution in the state. Phylogenetic results showed that the circulating virus belongs to East/Central/South African lineage, which has also been observed in several outbreaks in Europe, Africa and Asia. Moreover, molecular characterization of *E1* and *E2* protein fragments did not show the presence of adaptive mutations *E1*-K211E; *E1*-A226V; *E2*-L210Q and *E2*-I211T. This result suggests that circulating

virus in ES has lower potential for dissemination compared to circulating viruses in recent major global epidemics. Due to the lack of a vaccine and the difficulty in mosquito vector control, genetic diversity studies such as this one, become feasible alternatives in search of better understanding and chikungunya fever control in Brazil and, specifically, in ES.

Key words: Chikungunya. Filogeny. Arbovirose. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Evolução das manifestações clínicas da infecção pelo vírus Chikungunya | 22 |
| Figura 2. Erupções cutâneas típicas da infecção pelo vírus Chikungunya. | 23 |
| Figura 3. Áreas com transmissão autóctone do vírus Chikungunya durante os anos de 2013 e 2015. | 29 |
| Figura 4. Casos prováveis de febre de chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas (2015, 2016 e 2017). | 31 |
| Figura 5. Óbitos por febre de chikungunya confirmados e em investigação segundo mês de ocorrência do óbito. | 31 |
| Figura 6. Filogenia do gênero <i>Alfavírus</i> com visualização do complexo viral da floresta Semliki | 33 |
| Figura 7. Organização do genoma do vírus Chikungunya, incluindo suas proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e estruturais (C, E3, E2, 6K e E1)..... | 33 |
| Figura 8. Linhagens do vírus Chikungunya. | 35 |
| Figura 9. Distribuição geográfica dos casos confirmados da febre chikungunya no Espírito Santo..... | 47 |
| Figura 10. Filogenia do vírus Chikungunya, com distinção das três grandes linhagens. Amostras estudadas (n=6) estão em evidência. Filogenia realizada no programa <i>MEGA 7</i> pelo método <i>Neighbor-Joining</i> e <i>Kimura-2-parâmetros</i> , como modelo de substituição. Foi utilizado um <i>bootstrap</i> de 1000 replicações. Valores acima de 70 são mostrados. | 48 |
| Figura 11. Filogenia do vírus Chikungunya, com distinção das três grandes linhagens. Amostras estudadas (n=6) estão em evidência. Filogenia realizada no programa <i>MEGA 7</i> pelo método <i>Maximum Likelihood</i> e <i>Kimura-2-parâmetros</i> , como | |

modelo de substituição. Foi utilizado um *bootstrap* de 1000 replicações. Valores acima de 70 são mostrados.49

Figura 12. Análise da sequência de aminoácidos baseada no sequenciamento parcial do gene codificante da proteína Envelope 1.....50

Figura 13. Análise da sequência de aminoácidos baseada no sequenciamento parcial do gene codificante da proteína Envelope 2.....50

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Número de casos prováveis e incidência de chikungunya (/100mil hab.) até a Semana Epidemiológica 45, por região e Unidade da Federação (2016 e 2017). | 30 |
| Tabela 2. <i>Primers</i> e sondas utilizados na detecção do vírus Chikungunya em amostras biológicas referenciadas ao LACEN/ES. | 42 |
| Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação parcial dos genes <i>E1</i> e <i>E2</i> do vírus Chikungunya. | 43 |
| Tabela 4. Condições da transcrição reversa e da amplificação - gene <i>E1</i> | 44 |
| Tabela 5. Condições da transcrição reversa e da amplificação - gene <i>E2</i> | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| AL | Alagoas |
| AP | Amapá |
| BA | Bahia |
| BLAST | Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (do inglês: <i>Basical Local Alignment Search Tool</i>) |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CHIKF | Febre Chikungunya (do inglês: <i>Chikungunya fever</i>) |
| CHIKV | Vírus chikungunya (do inglês: <i>Chikungunya virus</i>) |
| DENV | Vírus da dengue (do inglês: <i>Dengue virus</i>) |
| E1 | Envelope 1 |
| E2 | Envelope 2 |
| ECSA | Leste/Centro/Sul africana (do inglês: <i>East/Central/South African</i>) |
| ELISA | Ensaio Imunológico com Absorção Enzimática (do inglês: <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>) |
| ES | Espírito Santo |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IOL | Linhagem do Oceano Indico (do inglês: <i>Indian Ocean Lineage</i>) |
| LACEN/ES | Laboratório Central do Espírito Santo |
| MS | Ministério da Saúde |
| NGACB | Núcleo de Pesquisa Aplicada a Conservação da Biodiversidade |

| | |
|----------------|--|
| NGHM | Núcleo de Genética Humana e Molecular |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| RJ | Rio de Janeiro |
| RS | Rio Grande do Sul |
| RT-PCR | Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: <i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>) |
| RT-qPCR | Transcrição Reversa Quantitativa – Reação em Cadeira da Polimerase (do inglês: <i>Quantitative Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction</i>) |
| SE | Sergipe |
| SEM | Semana Epidemiológica |
| SESA/ES | Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo |
| UFES | Universidade Federal do Espírito Santo |
| ZIKAV | Vírus da zika (do inglês: <i>Zika virus</i>) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 21 |
| | 2.1 TRANSMISSÃO, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. | 21 |
| | 2.2 EPIDEMIOLOGIA..... | 25 |
| | 2.3 CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E REPLICAÇÃO VIRAL..... | 32 |
| | 2.4 ESTUDOS FILOGENÉTICOS - BRASIL..... | 35 |
| 3 | OBJETIVOS | 40 |
| | 3.1 OBJETIVO GERAL | 40 |
| | 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 40 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| | 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 41 |
| | 4.2 AMOSTRAS E DETECÇÃO VIRAL..... | 41 |
| | 4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA | 42 |
| | 4.3.1 Seleção dos genes e confecção dos <i>primers</i> | 42 |
| | 4.3.2 Extração de RNA, amplificação e purificação..... | 43 |
| | 4.3.3 Sequenciamento e análise das sequências | 45 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 6 | DISCUSSÃO | 51 |
| | 6.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS..... | 51 |
| | 6.2 RESULTADOS FILOGENÉTICOS | 54 |
| 7 | CONCLUSÃO | 58 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |
| | ANEXOS | |

1 INTRODUÇÃO

A febre chikungunya (CHIKF) é uma doença altamente debilitante causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), sendo transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* (TSETSARKIN *et al.*, 2007; ALLA e COMBE, 2011). Os principais sintomas da doença são febre súbita acima de 39°C, juntamente à poliartralgia e *rash* cutâneo (BURT *et al.*, 2012).

A primeira epidemia da CHIKF foi reportada no Sul da Tanzânia (ROBINSON, 1955), desde então, diversos surtos foram relatados em diferentes países da África e da Ásia (POWERS e LOGUE, 2007; LO PRESTI *et al.*, 2014). Alguns autores sugerem que os surtos ocorridos nos países banhados pelo Oceano Índico entre os anos 2004-2009 tenham relação com uma mutação no gene codificante da proteína do envelope 1, levando a substituição do aminoácido alanina por uma valina na posição 226 da proteína (E1-A226V), a qual aumenta em 40 vezes a replicação viral em *A. albopictus* (TSETSARKIN e WEAVER, 2011).

Pela primeira vez, em dezembro de 2013, foram reportados casos da CHIKF na América Central (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). Desde então, o vírus espalhou-se por diversos países das Américas, chegando ao Brasil em setembro de 2014 (NUNES *et al.*, 2015).

Dados do Ministério da Saúde (MS) (2017) indicam uma incidência (número de casos prováveis [casos notificados] dividido pela população de determinada região geográfica) de 89,5 casos/100 mil habitantes em 2017, no Brasil. Tendo em vista o Espírito Santo (ES), o estado relatou uma incidência de 20 casos/100 mil habitantes em 2017.

Atualmente são conhecidas 3 grandes linhagens de CHIKV: Asiática, Oeste africana e Leste/Centro/Sul da África (do inglês: *East/Central/South African* - ECSA). No Brasil, estudos relatam a presença da linhagem Asiática e ECSA, em diferentes localidades do país (NUNES *et al.*, 2015; SARDI *et al.*, 2016; COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017b; SOUZA *et al.*, 2017).

Estudos filogenéticos possibilitam inferir novos dados sobre CHIKV no Brasil e no mundo. Além disso, sugere-se que variações genéticas virais estão relacionadas à persistência do vírus no vetor, o que acarretaria na elevação do número de casos da doença em humanos (TSETSARKIN *et al.* 2007; TSETSARKIN e WEAVER, 2011).

Adicionalmente, esses estudos, possibilitam avaliar a diversidade genética viral, a fim de observar se diferentes variantes estão associadas a diferentes manifestações clínicas e/ou à persistência da doença. Com base nisso, Cunha e colaboradores (2017b) associaram o genótipo ECSA ao surgimento e persistência dos casos da CHIKV no nordeste do Brasil. Em adição, Souza *et al.* (2017) abordaram a importância da vigilância viral das diferentes cepas de CHIKV existentes no Brasil (ECSA e Asiática), uma vez que o papel dessas linhagens na gravidade e na cronicidade da doença é incerto.

Devido aos poucos estudos relacionados à diversidade genética de CHIKV no Brasil, principalmente no sudeste do país, e devido à importância de tais análises, tanto com relação à pesquisa básica quanto com relação à pesquisa aplicada, o presente trabalho, em parceria com a Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo (SESA/ES) e, juntamente ao Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN/ES), objetivou identificar as linhagens de CHIKV circulantes no estado do ES, analisando suas características genéticas, além de levantar dados epidemiológicos sobre a CHIKV no estado. Tais resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de futuros bioprodutos, insumos, alvos terapêuticos ou vacinas direcionados à população do ES.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRANSMISSÃO, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

A CHIKF é uma doença infecciosa e debilitante, causada pelo CHIKV, o qual tipicamente apresenta dois ciclos ambientais: selvagem e humano-mosquito-humano (HIGGS e VANLANDINGHAM, 2015). O ciclo selvagem é caracterizado pela transmissão viral a primatas selvagens por meio de vetores do gênero *Aedes* tais como *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. africanus* e *A. Neoafricanus* (DIALLO *et al.*, 1999). O ciclo humano-mosquito-humano é confinado a áreas urbanas, tendo como principal vetor o *A. aegypti*, o qual apresenta a característica singular de preferencialmente se alimentar de sangue humano (ALLA e COMBE, 2011). Nas últimas décadas, *A. albopictus* emergiu como um segundo vetor de CHIKV em humanos (TSETSARKIN *et al.*, 2007; TSETSARKIN e WEAVER, 2011), sendo apontado como principal vetor em surtos ocorridos em países banhados pelo Oceano Índico, como Quênia, Reunião (território ultramarino francês), Madagascar, Mayotte e Índia (CHARREL; LAMBALLERIE; RAOULT, 2007). O ciclo de transmissão do vírus requer a infecção de mosquitos fêmeas por meio da sua alimentação com sangue de vertebrados contendo o vírus. Ocorre então um período de incubação e, durante a próxima refeição, ocorre a transmissão do vírus a outro vertebrado pela picada do mosquito infectado (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

A CHIKF é caracterizada por apresentar duas fases: aguda e crônica. Após um período de incubação viral, que comumente varia entre 3 - 7 dias (Figura 1), instala-se a fase aguda da doença, caracterizada por sintomas tais como: febre alta (>39°C), severa poliartralgia, dores de cabeça, *rash* cutâneo e mialgia (BURT *et al.*, 2012).

Os sintomas da fase aguda usualmente desaparecem com menos de duas semanas. Após isso, alguns casos evoluem para a fase crônica da doença (Figura1),

representada principalmente por uma poliartralgia de longa duração, podendo durar meses ou anos (MANIMUNDA *et al.*, 2010). Casos assintomáticos são considerados raros, representando de 3 a 5% dos infectados (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015).

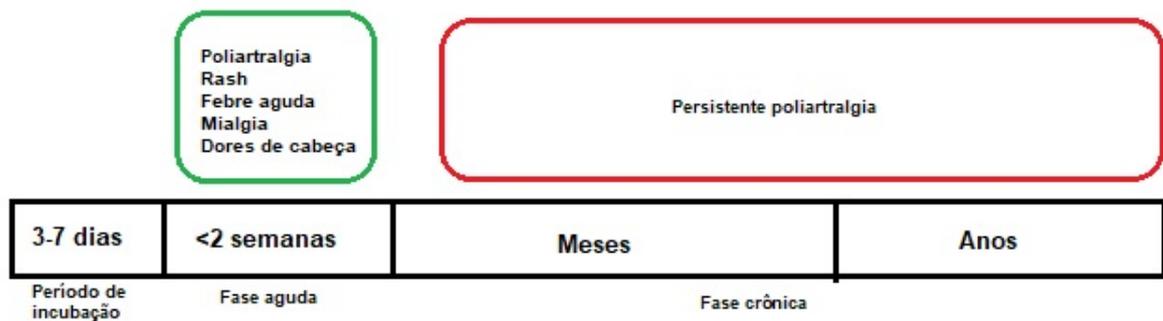


Figura 1. Evolução das manifestações clínicas da infecção pelo vírus Chikungunya.

Normalmente, o *rash* cutâneo acomete 40 a 50% dos casos, sendo representado por uma erupção maculopapular seguida de coceira que acomete o tronco, as extremidades e face (Figura 2) (THIBERVILLE *et al.*, 2013). De acordo com Thiberville *et al.* (2013) lesões na pele e nas mucosas são relatadas durante o estágio agudo da doença, tais como: hipermelanose, hiperpigmentação, fotossensibilidade, dermatite esfoliativa, lesões vasculíticas, lesões semelhantes a eritema nodoso, exacerbação de dermatoses pré-existentes, como psoríase e úlcera da mucosa.



Figura 2. Erupções cutâneas típicas da infecção pelo vírus Chikungunya. Erupção maculopapular nos braços (A), manchas petequiais nas pernas (B) e eritroderma nos pés (C). Fonte: BURT *et al.*, 2012.

A poliartralgia está presente em 87 - 98% dos casos, sendo considerado o sintoma mais característico e debilitante da doença (BURT *et al.*, 2012). Comumente, os pacientes apresentam artralgia nos dedos, punhos, tornozelos, cotovelos, dedos dos pés e joelhos, podendo estar acompanhada de inchaços (em 25 a 42% dos casos) (BURT *et al.*, 2012).

Alguns pacientes apresentam persistência de dores articulares após a fase aguda da doença, caracterizando o início da fase crônica. Trabalhos tais como Sissoko *et al.* (2009), Bouquillard e Combe (2009), Manimunda *et al.* (2010), Thiberville *et al.* (2013) e Dupuis-Maguiraga *et al.* (2012) apresentam fatores de risco para a persistência da poliartralgia em casos distintos.

De acordo com estes estudos, indivíduos acima de 45 anos; pessoas com dores articulares preexistentes ou osteoartrite e indivíduos com grande intensidade de dor articular na fase aguda são predispostos a apresentarem a fase crônica da CHIKF. Além disso, tal fase normalmente é caracterizada por alterações na intensidade da dor, acometendo via de regra, as mesmas articulações afetadas na fase aguda.

Gerardin *et al.* (2013) mostrou que a presença de um anticorpo específico IgG está associado à persistente poliartralgia na população de Reunião. Por outro lado, Win *et al.* (2010) apresentou que os níveis de creatinina são significativamente menores em pessoas que apresentaram a fase crônica da doença, sendo que mulheres

tenderam a ter menores níveis da substância, em relação a homens. Contrariando estudos anteriores, Win *et al.* (2010) não encontraram uma associação significativa entre idade acima de 45 anos e a persistência da poliartralgia.

Em poucos casos, a infecção por CHIKV pode causar sintomas neurológicos, como por exemplo, encefalite, paralisia flácida aguda, síndrome de Guillain-Barré, mielopatia, neuropatia periférica, mieloperopatia e miopatia (SINGH *et al.*, 2008; CHANDAK *et al.*, 2009).

Em crianças, as principais manifestações neurológicas da infecção por CHIKV são convulsões, encefalite, síndrome meníngea ou encefalopatia aguda (ROBIN *et al.*, 2008). Durante a epidemia por CHIKV em Reunião (2005-2006), foi observada pela primeira vez a transmissão vertical do vírus, da mãe para o filho, sendo a encefalite o principal sintoma apresentado pelos recém-nascidos (GERARDIN *et al.*, 2008). Contudo, as principais características da CHIKF em crianças são dermatológicas, como hiperpigmentação, eritema generalizado e erupção maculopapular (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Para diagnóstico da CHIKF, além da observação das manifestações clínicas da doença, é necessária a detecção de RNA viral de amostras séricas obtidas nos primeiros dias de manifestação sintomática (entre o 1º e 5º dia), pela técnica de biologia molecular “*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*” (RT-PCR) (MARDEKIAN e ROBERTS, 2015).

Após 6 dias ou mais de sintomas, o melhor método de detecção viral é a utilização de ensaios “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*” (ELISA) para IgM e IgG, os quais analisam a presença de anticorpos em resposta à infecção pelo vírus (MARDEKIAN e ROBERTS, 2015). Isso porque a resposta imunológica aguda do organismo hospedeiro humano reage à presença do vírus, diminuindo sua carga viral, fazendo com que métodos moleculares sejam menos eficientes.

Atualmente não existem vacinas ou medicamentos licenciados que limitem a replicação do CHIKV no hospedeiro ou que auxiliem no aspecto clínico da doença, sendo o tratamento restrito ao alívio dos sintomas com uso de antitérmicos e analgésicos (ALLA e COMBE, 2011; WEAVER e LECUIT, 2015). Entretanto, Delang

et al. (2014) demonstraram atividade antiviral *in vitro* para o medicamento Favipiravir. Além disso, Abdelnabi *et al.* (2018) demonstraram que o mesmo medicamento exibe a capacidade de inibir a replicação de CHIKV em camundongos.

Para tratamento das dores articulares persistentes da fase crônica, usualmente utilizam-se anti-inflamatórios não esteroides e corticoides. Contudo, em manifestações severas de poliartralgia são utilizados medicamentos como: metotrexato, hidroxicloroquina ou sulfasalazina por até 6 meses após a infecção pelo vírus (ALLA e COMBE, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A primeira epidemia documentada da CHIKF aconteceu em 1952 no sul da Tanzânia (ROBINSON, 1955). Devido à doença causar severa dor articular, acarretando desvio postural, a mesma foi chamada de “*Chikungunya*”, que significa “doença que dobra as articulações” (FOURIE e MORISON, 1979).

Desde o primeiro surto, epidemias de CHIKF apareceram e reapareceram diversas vezes entre 1960 e 1990 em locais como Uganda, Zimbábue, Senegal, Congo, Camarões, África do Sul e Costa do Marfim (LO PRESTI *et al.*, 2014).

No continente asiático, a primeira epidemia documentada foi relatada em 1960 na Tailândia (POWERS e LOGUE, 2007). Desde então, frequentes surtos foram descritos em países asiáticos tais como Índia, Malásia, Indonésia, Vietnã, Mianmar e Paquistão entre 1960 e 2003 (POWERS e LOGUE, 2007).

Os surtos em países africanos e asiáticos foram considerados imprevisíveis, apresentando um intervalo de 7 a 20 anos entre surtos individuais e de 40 a 50 anos entre surtos de maior escala (POWERS e LOGUE, 2007). De acordo com Thiberville *et al.* (2013), embora os fatores intrínsecos a esses surtos permaneçam desconhecidos, é provável que a recorrência esteja relacionada à fatores ecológicos, virais e à imuno proteção adquirida após infecção por CHIKV.

Este último fator apresenta papel central na periodicidade dos surtos, tendo em vista que surtos recorrentes afetam preferencialmente a população mais jovem (não exposta e conseqüentemente, não imunizada durante as epidemias anteriores) (THIBERVILLE *et al.*, 2013). Além disso, dados epidemiológicos indicam que a distribuição global de *A. aegypti* e *A. albopictus* associada à presença de turistas, está envolvida na transmissão da doença em locais anteriormente livres do vírus (AMRAOUI e FAILLOUX, 2016).

Sabe-se que o principal vetor de CHIKV, e o que apresenta maior capacidade de transmissão viral é o *A. aegypti*. Contudo, foram documentadas epidemias em localidades onde a frequência desse vetor é baixa, como em países banhados pelo Oceano Índico (Quênia, Reunião, Mayotte e Maurício), entre os anos de 2004 a 2009, tendo o *A. albopictus* como vetor comumente encontrado nessas localidades (LO PRESTI *et al.*, 2016).

Curiosamente, foi observado que, durante o referido surto, o vírus circulante apresentava uma substituição do aminoácido alanina por uma valina na posição 226 da proteína envelope 1 viral (E1) (E1-A226V). De acordo com TSETSARKIN *et al.* (2007), esta mutação está diretamente relacionada ao aumento da replicação viral e da persistência do vírus em *A. albopictus*. Isto fornece uma explicação do porquê foram observados surtos em localidades onde o vetor principal não é comumente encontrado. Essa mesma mutação foi constatada em surtos na Itália e na Índia (REZZA *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2008).

Em 2007, estimou-se cerca 6,5 milhões de casos da CHIKF na Índia, afetando 19 estados (MAVALANKAR; SHASTRI; RAMAN, 2007). No ano referido, *A. albopictus* apresentava ampla distribuição na Índia, sendo identificada a mutação E1-A226V nos principais surtos (KUMAR *et al.*, 2008). Além do mais, um estudo realizado em Kerala (Índia) conduzido por Nyvas *et al.* (2010) identificou uma nova alteração, onde o aminoácido leucina era substituído por uma glutamina na posição 210 da proteína envelope 2 (E2) (E2 - L210Q) tanto em amostras de humanos infectados como diretamente em mosquitos.

TSETSARKIN e WEAVER (2011) mostraram que a mutação E2-L210Q aumenta significativamente a disseminação de CHIKV em *A. albopictus*, devido ao aumento

da sua infectividade nas células epiteliais do intestino médio do vetor. Por outro lado, o mesmo estudo observou que a mutação E1-A226V apresenta efeito maior na aptidão de CHIKV no vetor, comparada à mutação E2-L210Q.

Ademais, foi reportada que as mutações E1-K211E e E2-V264A estão relacionadas com o aumento da infectividade, disseminação e transmissão do vírus em *A. aegypti*, durante surtos ocorridos na Índia, entre os anos 2006 e 2010 (AGARWAL *et al.*, 2016).

A grande quantidade de surtos na região asiática refletiu no aparecimento de casos da CHIKF entre viajantes. Entre os anos de 2006 e 2015, foram reportados 3.498 casos da doença nos Estados Unidos (YACTAYO *et al.*, 2016).

Pela primeira vez, em dezembro de 2013, foram confirmados casos autóctones de CHIKV na América Central (Saint Martin) e, em janeiro de 2014, nas ilhas de Guadalupe, Dominica e Virgens, sendo *A. aegypti* o único potencial vetor (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). Desde então, o vírus se espalhou por 45 países entre as Américas (Figura 3), sendo 329.002 casos confirmados da CHIKF até 15 de dezembro de 2017, sendo 270.325 (82%) só no Brasil (PAHO, 2017).

O primeiro caso autóctone do Brasil foi confirmado no Oiapoque - Amapá (AP), em 13 de setembro de 2014. Sete dias depois, outros casos foram confirmados em Feira de Santana – Bahia (BA) (NUNES *et al.*, 2015). Desde então, o vírus se dispersou de forma rápida por todo território brasileiro.

Dados do MS (2017) indicam uma incidência de 89,5 casos/100 mil habitantes em 2017. Em 2016, entre a semana epidemiológica (SEM) 1 e a SEM 52, foram registrados 277.882 casos prováveis da CHIKF, e em 2015, 20.901 casos (Figura 4).

Entre 01 de janeiro e 11 de novembro de 2017 (SEM 45) foram registrados 184.458 casos prováveis da doença no país, sendo que em 2016, no mesmo período, foram computados 271.637 casos prováveis (Tabela 1).

Em 2017, até o final da SEM 45, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis da doença (141.363; 76,6%) em relação ao país (Tabela 1). Tendo em vista o ES, o estado apresentou um aumento na quantidade de casos prováveis

de 2016 (416) para 2017 (796), sendo que a incidência também aumentou de 10,5 casos/100 mil habitantes para 20 casos/100 mil habitantes (MS, 2017).

Até a SEM 45/2017 foram constatados 149 óbitos confirmados laboratorialmente pela doença, sendo 129 mortes ainda sob investigação (Figura 5). Destes, apenas um óbito é referente ao estado do ES (MS, 2017).



Figura 3. Áreas com transmissão autóctone do vírus Chikungunya durante os anos de 2013 e 2015. Fonte: YACTAYO *et al.* (2016).

Tabela 1. Número de casos prováveis e incidência de chikungunya (/100mil hab.) até a Semana Epidemiológica 45, por região e Unidade da Federação (2016 e 2017). Fonte: SINAN 13/11/2017

| Região/Unidade da Federação | Casos prováveis (n) | | Incidência (/100 mil hab.) | |
|-----------------------------|---------------------|----------------|----------------------------|--------------|
| | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 |
| Norte | 7.998 | 16.125 | 45,2 | 91,1 |
| Rondônia | 724 | 213 | 40,5 | 11,9 |
| Acre | 337 | 102 | 41,3 | 12,5 |
| Amazonas | 779 | 259 | 19,5 | 6,5 |
| Roraima | 210 | 4.046 | 40,8 | 786,8 |
| Pará | 3.705 | 8.094 | 44,8 | 97,8 |
| Amapá | 921 | 197 | 117,7 | 25,2 |
| Tocantins | 1.322 | 3.214 | 86,2 | 209,7 |
| Nordeste | 235.837 | 141.363 | 414,4 | 248,4 |
| Maranhão | 13.713 | 6.279 | 197,2 | 90,3 |
| Piauí | 2.753 | 6.243 | 85,7 | 194,4 |
| Ceará | 46.267 | 113.766 | 516,2 | 1.269,2 |
| Rio Grande do Norte | 24.834 | 1.959 | 714,6 | 56,4 |
| Paraíba | 20.231 | 1.545 | 505,8 | 38,6 |
| Pernambuco | 49.631 | 2.093 | 527,4 | 22,2 |
| Alagoas | 18.325 | 482 | 545,6 | 14,3 |
| Sergipe | 9.130 | 388 | 403,0 | 17,1 |
| Bahia | 50.953 | 8.608 | 333,5 | 56,3 |
| Sudeste | 24.267 | 23.169 | 28,1 | 26,8 |
| Minas Gerais | 1.361 | 17.307 | 6,5 | 82,4 |
| Espírito Santo | 416 | 796 | 10,5 | 20,0 |
| Rio de Janeiro | 18.198 | 4.009 | 109,4 | 24,1 |
| São Paulo | 4.292 | 1.057 | 9,6 | 2,4 |
| Sul | 1.730 | 334 | 5,9 | 1,1 |
| Paraná | 948 | 196 | 8,4 | 1,7 |
| Santa Catarina | 504 | 73 | 7,3 | 1,1 |
| Rio Grande do Sul | 278 | 65 | 2,5 | 0,6 |
| Centro-Oeste | 1.805 | 3.467 | 11,5 | 22,1 |
| Mato Grosso do Sul | 262 | 91 | 9,8 | 3,4 |
| Mato Grosso | 542 | 3.039 | 16,4 | 91,9 |
| Goiás | 442 | 222 | 6,6 | 3,3 |
| Distrito Federal | 559 | 115 | 18,8 | 3,9 |
| Brasil | 271.637 | 184.458 | 131,8 | 89,5 |

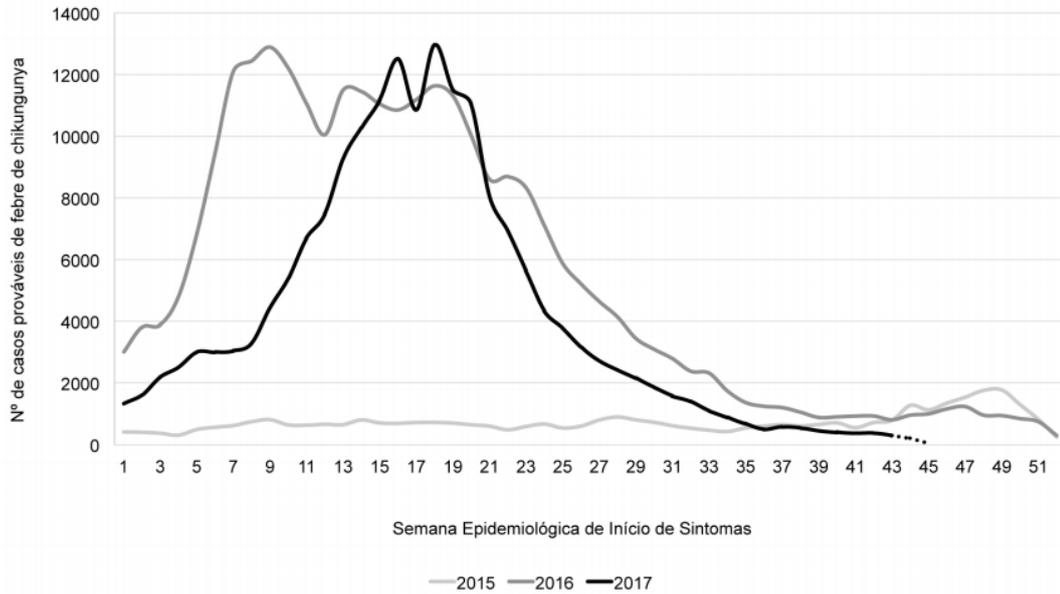


Figura 4. Casos prováveis de febre de chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas (2015, 2016 e 2017): Fonte: SINAN 13/11/2017.

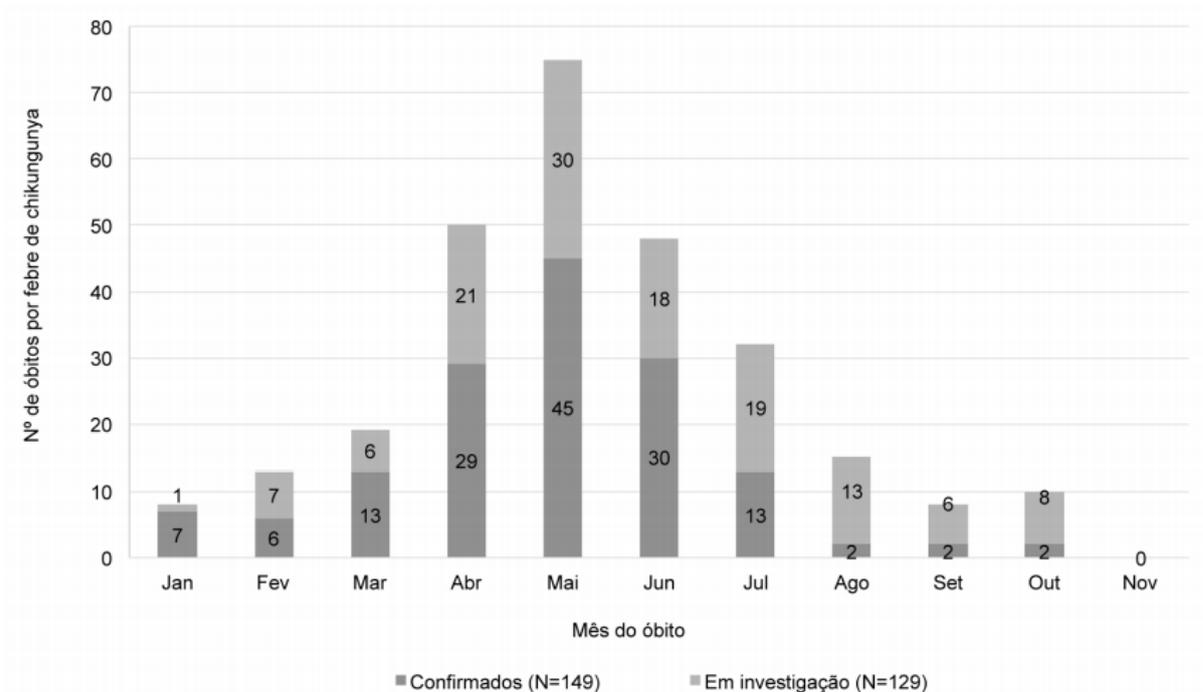


Figura 5. Óbitos por febre de chikungunya confirmados e em investigação segundo mês de ocorrência do óbito. Fonte: SINAN 13/11/2017.

2.3 CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E REPLICAÇÃO VIRAL

O CHIKV é um alfavírus com cerca de 60 a 70nm de diâmetro, envelopado, esférico e de RNA fita simples de sentido positivo, pertencente à família Togaviridae (WAHID *et al.*, 2017). O vírus pertence ao complexo viral antigênico da floresta Semliki (Figura 6), juntamente com outros alfavírus encontrados na África (O'nyong–nyong), América do Sul (Mayaro) e na região da Austrália/Oceania (Roos River vírus) (VANLANDINGHAM *et al.*, 2006).

O CHIKV apresenta um genoma com cerca de 12 quilobases (kb) e duas origens de replicação (WAHID *et al.*, 2017). O extremo 5' é capeado com uma 7-metilguanossina enquanto a extremidade 3' é poliadenilada (KHAN *et al.*, 2002). O vírus apresenta 9 proteínas, sendo 4 não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e 5 estruturais (C, E3, E2, 6k, E1) (Figura 7). As proteínas não-estruturais são diretamente traduzidas da extremidade 5' e representam dois terços do genoma viral (KHAN *et al.*, 2002).

A proteína nsP1 está relacionada à síntese da fita negativa de RNA, já a nsP2 possui ação de helicase e atividade proteásica; a nsP3 apresenta ação de síntese de RNA e a nsP4 evidencia ação de polimerase, contudo, RNA-dependente (WEAVER e LECUIT, 2015).

Com relação às proteínas estruturais, a proteína C representa o capsídeo viral; E1 e E2 são proteínas do envelope; 6K faz parte de um canal de íons seletivos que apresenta potencial para afetar a permeabilidade da membrana e, por fim, E3 evidencia papel no direcionamento das proteínas para o retículo endoplasmático rugoso (RER), proporcionando a montagem adequada das mesmas (LUM e NG, 2015). Além disso, Uchime *et al.* (2013) relataram que a proteína E3 poderia desempenhar uma função mantenedora do potencial hidrogeniônico (pH) durante a formação do vírus.

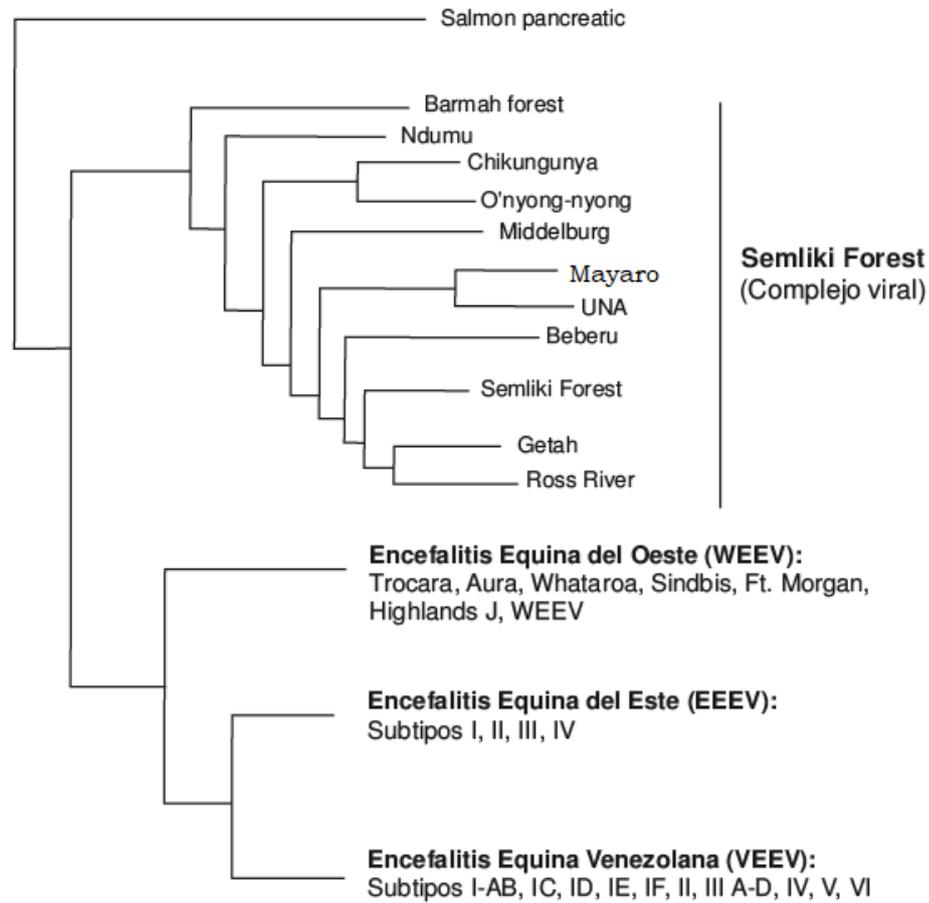


Figura 6. Filogenia do gênero *Alfavírus* com visualização do complexo viral da floresta Semliki, Fonte: MUNHOZ e NAVARRO, 2012.

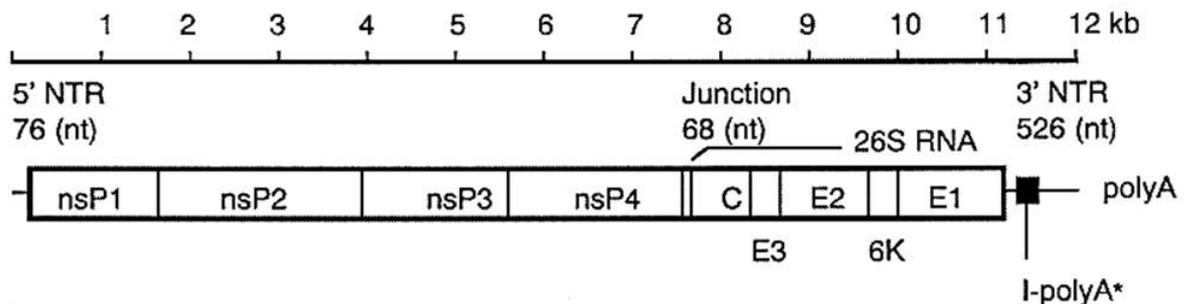


Figura 7. Organização do genoma do vírus Chikungunya, incluindo suas proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). Fonte: KHAN *et al.*, 2002.

As proteínas E1 e E2 ligam-se e são incorporadas como um heterodímero no envelope viral, sendo responsáveis pela ligação do vírus e pela fusão do mesmo à membrana da célula hospedeira (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

A incorporação de CHIKV nas células é mediada pela proteína E1, em um processo dependente de pH baixo, pelo fato de condições ácidas permitirem mudanças conformacionais que possibilitam a dissociação do heterodímero E1-E2, e a formação do homotrímero E1, o qual se liga na membrana hospedeira por meio de um peptídeo de fusão hidrofóbico (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

Bernard *et al.*, (2010) apresentaram que o colesterol possui papel chave na entrada de CHIKV em células humanas, sendo que a retirada da substância da membrana alvo diminuiu em até 65% a entrada do vírus na célula.

Após entrada na célula hospedeira, o RNA viral é traduzido em uma poliproteína que, por sua vez, é clivada nas nsP1-4, as quais se associam e formam o complexo de replicação viral (LUM e NG, 2015). Tal complexo, primeiramente, sintetiza um RNA inicial de fita negativa, o qual é então, utilizado como molde para a síntese do RNA 49S genômico, bem como do RNA 26S subgenômico (LUM e NG, 2015). Posteriormente, há formação de pE2, E1, 6K e C (tradução do RNA 26S); processamento do capsídeo por proteases e liberação do mesmo no citoplasma. Por conseguinte, o complexo de golgi cliva pE2, formando E2 e E3, as quais são encaminhadas para a superfície celular, para a síntese de novos vírions.

O capsídeo, liberto no citoplasma, se associa com o RNA 49S genômico, formando o nucleocapsídeo icosaédrico (LUM e NG, 2015). Ao fim, os vírions maduros são montados na membrana plasmática e brotam da célula hospedeira infectada. Tal processo de replicação viral leva menos de 8 horas em vertebrados (SOURISSEAU *et al.*, 2007).

Os genes *E1* e *E2* são regularmente utilizados como alvos em estudos da diversidade genética de CHIKV, pelo fato de ambos apresentarem alta variabilidade genética, o que distingue as linhagens do vírus, além de possuírem função na entrada viral na célula hospedeira e na replicação do vírus (SOUZA *et al.*, 2017).

2.4 ESTUDOS FILOGENÉTICOS - BRASIL

Atualmente são conhecidos três grandes grupos de CHIKV. O primeiro clado consiste no vírus isolado de Senegal, Nigéria e Costa do Marfim, que representa o genótipo Oeste africano; o segundo contém cepas isoladas do Leste/Centro/Sul da África (ECSA) e o terceiro representa a linhagem Asiática do vírus (Figura 8) (LO PRESTI *et al.*, 2014).

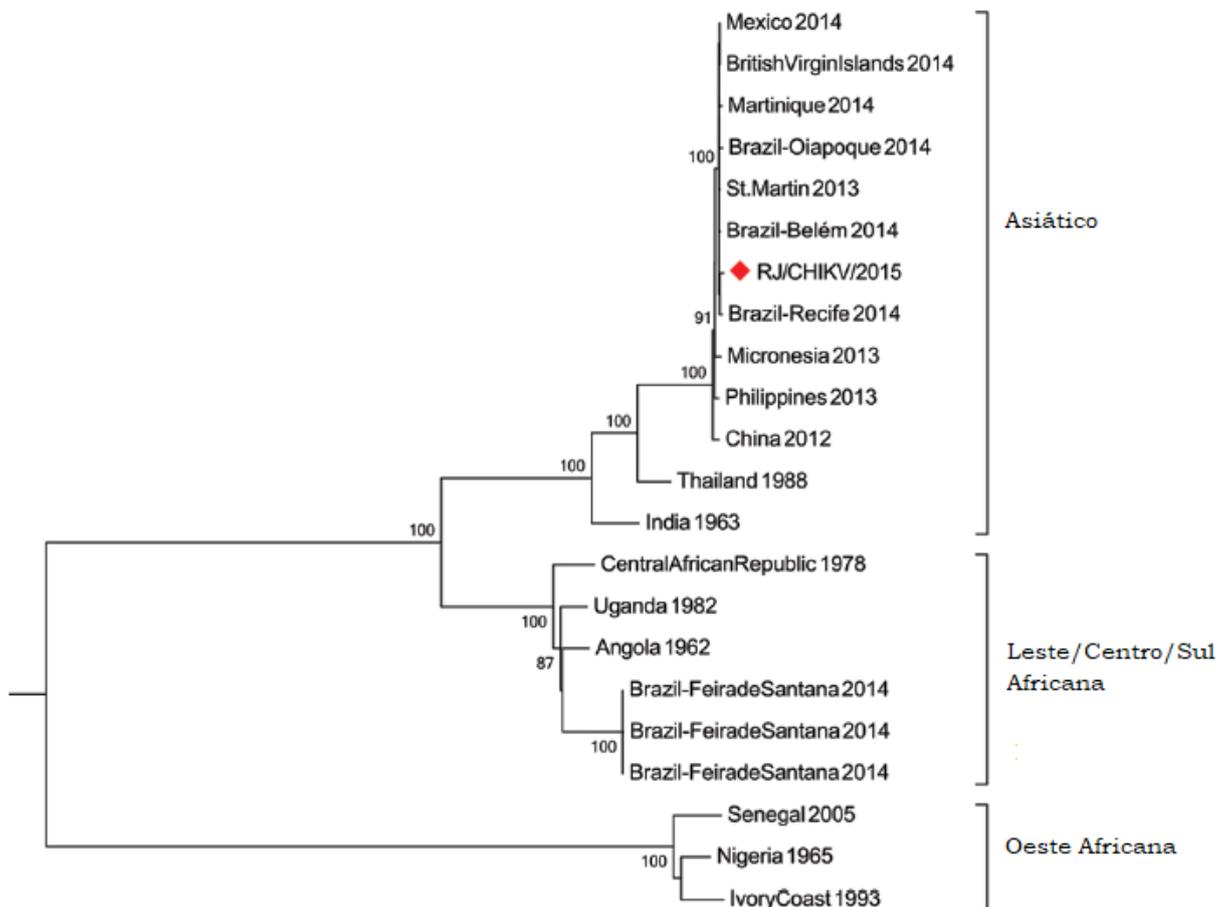


Figura 8. Linhagens do vírus Chikungunya. Fonte: CONTEVILLE *et al.*, 2016 (adaptada)

Acredita-se que o vírus se originou na África, sendo a linhagem Oeste africana a mais antiga, uma vez que a mesma apresenta uma divergência genética maior em comparação aos outros dois grupos (THIBERVILLE *et al.*, 2013). Além disso, os genótipos ECSA e Asiático são parafiléticos em simulações de parentesco

(POWERS *et al.*, 2000). Em adição, a linhagem asiática apresenta um menor tempo de divergência ancestral em comparação às linhagens africanas, evidenciando que a mesma é o clado mais recente, sendo introduzida da África para a Ásia (VOLK *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o movimento das diferentes linhagens virais ao redor do mundo aumentou, provavelmente devido à maior locomoção humana e ao comércio. No começo de 2005, a cepa da linhagem do Oceano Índico (do inglês: *Indian Ocean lineage* – IOL) (grupo monofilético descendente da linhagem ECSA) foi responsável por uma grande epidemia que afetou primeiramente a costa do Quênia e se disseminou para as ilhas do Oceano Índico e, posteriormente, para a Índia e países próximos (LANCIOTTI e LAMBERTI, 2016). Como já abordado no tópico “Epidemiologia”, sugere-se que tal surto tenha relação com a mutação E1-A226V, a qual aumenta a replicação viral e a persistência do vírus em *A. albopictus* (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Na primeira confirmação de casos autóctones de CHIKF nas Américas (Saint Martin) em dezembro de 2013, curiosamente, a linhagem circulante não era IOL, a qual havia ocasionado os surtos mais recentes da doença, mas sim a linhagem asiática, a qual circula no ciclo urbano pelo menos desde 1960 e continuava causando surtos na Ásia (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016).

Quanto aos primeiros casos autóctones de CHIKF no Brasil, em Oiapoque, a linhagem circulante era a Asiática, possivelmente relacionada a um surto ocorrido na Guiana Francesa, contudo, a cepa circulante em Feira de Santana pertencia à linhagem ECSA, a qual possivelmente está relacionada a um cidadão brasileiro contaminado que trabalhava na Angola e visitava sua família na BA (TEIXEIRA *et al.*, 2015; TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016). Notadamente, era a primeira vez que a linhagem ECSA do vírus era reportada nas Américas (SOUZA *et al.*, 2017).

Após confirmação dos primeiros casos autóctones no Brasil, começaram a surgir estudos mais aprofundados sobre a doença, além de trabalhos relacionados à filogenia do vírus circulante no país.

Conteville *et al.* (2016) analisaram filogeneticamente quatro viajantes entre setembro de 2014 a janeiro de 2015 que chegavam na cidade do Rio de Janeiro (RJ) vindos de regiões do Caribe (Curacao, Barbados e Republica Dominicana) e da Venezuela, que apresentavam sintomas característicos da CHIKF (febre alta, artralgia e *rash* cutâneo). Tal estudo verificou que a cepa presente entre os viajantes pertencia à linhagem asiática de CHIKV e a mesma não apresentava a mutação E1-A226V em nenhuma amostra.

Similarmente, Souza *et al.* (2017) analisaram amostras (10) com suspeita da CHIKF entre abril – maio de 2016 em um hospital do RJ durante o primeiro surto da doença no estado. O grupo constatou pela primeira vez a presença da linhagem ECSA na região sudeste, sendo que todas as amostras não apresentavam a mutação E1-A226V, contudo, as mesmas evidenciaram a substituição E1-K211T e duas amostras exibiram a alteração E1-V156A. Tais alterações não estavam presentes na cepa encontrada em Feira de Santana - BA. De acordo com o grupo, novos estudos são necessários para esclarecer as consequências dessas mutações na aptidão dos mosquitos ou sua relação com o sistema imune humano.

Durante 5 dias em fevereiro de 2016, Costa-da-Silva *et al.* (2017) coletaram mosquitos em 6 bairros de Aracaju - SE, sendo *A. aegypti* o mais abundante. Os mosquitos capturados foram analisados com a finalidade de identificar a presença do vírus da Zika (ZIKAV), vírus da dengue (DENV) e CHIKV. Após análises, um mosquito *A. aegypti* apresentou resultado positivo para a presença de CHIKV, sendo o vírus pertencente à linhagem ECSA. Assim, de maneira pioneira, Costa-da-Silva *et al.* (2017) identificaram um *A. aegypti* selvagem com a presença do vírus, além de constatarem a linhagem ECSA (presente no vetor), nas Américas.

Sardi *et al.* (2016) analisaram a presença de CHIKV em 15 amostras positivas para ZIKAV referentes a pacientes de um hospital em Salvador – BA entre abril de 2015 a janeiro de 2016. Das amostras analisadas, duas foram positivas para RNA de CHIKV e após análises de parentesco, foi atestado que as mesmas pertenciam à linhagem ECSA. Além disso, Cunha *et al.* (2017a) analisaram o soro de uma menina de 16 anos e de um homem de 29 atendidos em um hospital militar do RJ, os quais haviam tido resultado negativo para CHIKV, DENV e ZIKAV, porém apresentavam

sintomas da CHIKF. Apesar do resultado negativo, o isolamento do vírus em células Vero foi bem-sucedido. Posteriormente, o RNA viral isolado atestou positivo para CHIKV e negativo para DENV e ZIKAV. Em seguida, análises filogenéticas foram realizadas e foi identificado que o vírus pertencia à linhagem ECSA em ambos os pacientes. Além disso, o estudo detectou mutações tais como NSP4-A481D, E1-K211T, E1-N335D, NSP2-L27I e também detectou as variações E1-M407L e E2-A103T, as quais não estão presentes em outras cepas da linhagem ECSA. As amostras analisadas não apresentaram as mutações E1-A226V e E2-L210Q.

Um trabalho realizado por Costa *et al.* (2017) em Maceió – Alagoas (AL) acompanhou durante março – maio de 2016, 208 casos positivos para CHIKV em dois hospitais privados. Foram escolhidas aleatoriamente 23 amostras para as análises filogenéticas, sendo observado que o vírus circulante no estado era pertencente ao clado ECSA. Não foi encontrada a mutação adaptativa E1-A226V nas amostras analisadas. Os pesquisadores sugerem que o surto foi devido à presença de um turista contaminado vindo do estado da BA (local que sofrera um surto por CHIKV em janeiro - agosto de 2015), uma vez que antes de agosto de 2015 não houve relatos de casos da doença em AL.

Um recente estudo realizado pelo grupo de Cunha *et al.* (2017b) analisou 142 pacientes em fevereiro de 2016 no estado de Sergipe (SE). Destes, 107 foram positivos para CHIKV, sendo escolhidas cinco amostras para os estudos filogenéticos. Após análises, constatou-se que o vírus era pertencente à linhagem ECSA, em todas as amostras. Os pesquisadores chamam atenção para a ampla distribuição de CHIKV no estado: das 13 cidades analisadas, 11 apresentaram amostras positivas.

Estudos filogenéticos possibilitam inferir novos dados sobre CHIKV no Brasil e no mundo. Além disso, sugere-se que variações genéticas virais estão relacionadas à persistência do vírus no vetor, o que acarretaria na elevação do número de casos da doença em humanos (TSETSARKIN *et al.* 2007; TSETSARKIN e WEAVER, 2011).

Adicionalmente, esses estudos, possibilitam avaliar a diversidade genética viral, a fim de observar se diferentes variantes estão associadas a diferentes manifestações clínicas e/ou à persistência da doença. Com base nisso, Cunha *et al.* (2017b)

associaram o genótipo ECSA ao surgimento e persistência dos casos da CHIKF no nordeste do Brasil. Em adição, Souza *et al.* (2017) abordaram a importância da vigilância viral das diferentes cepas de CHIKV existentes no Brasil (ECSA e Asiática), uma vez que o papel dessas linhagens na gravidade e na cronicidade da doença é incerto.

Devido aos poucos estudos relacionados à diversidade genética de CHIKV no Brasil, principalmente no sudeste do país, e devido à importância de tais análises, tanto com relação à pesquisa básica quanto com relação à pesquisa aplicada, o presente trabalho, em parceria com a SESA/ES e, juntamente ao LACEN/ES, objetivou identificar as linhagens de CHIKV circulantes no estado do ES, analisando suas características genéticas, além de levantar dados epidemiológicos sobre a CHIKF no estado. Tais resultados poderão auxiliar no desenvolvimento de futuros bioprodutos, insumos, alvos terapêuticos ou vacinas direcionados à população do ES.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a diversidade genética do vírus Chikungunya no estado do Espírito Santo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a frequência da infecção pelo CHIKV em amostras biológicas referenciadas ao LACEN/ES;
- Analisar a distribuição geográfica dos casos de CHIKV no estado do ES.
- Analisar filogeneticamente as cepas de CHIKV no estado do ES.
- Verificar a presença de mutações em CHIKV, previamente descritas na literatura, nas amostras analisadas filogeneticamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Estudo da diversidade genética e do efeito do *Zika virus* no desenvolvimento de transtornos neurológicos”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) de acordo com o parecer número 1.819.673 (Anexo A), o qual também contempla a detecção e análise da diversidade genética do CHIKV.

4.2 AMOSTRAS E DETECÇÃO VIRAL

O estudo foi realizado com uma parceria entre o Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM-UFES) e a SESA/ES, juntamente ao LACEN/ES. As amostras biológicas do estudo foram provenientes de indivíduos atendidos sob queixa de sintomas característicos da CHIKF em municípios do ES, as quais foram referenciadas ao LACEN/ES entre o período de 08/03/2016 a 12/12/2017. Características de sexo, idade ou etnia não foram levadas em consideração.

O diagnóstico de CHIKF foi realizado no LACEN/ES, por sorologia ELISA (quando as amostras foram coletadas após o 5º dia de sintomas) ou por “*Quantitative Reverse Transcription PCR*” (RT-qPCR) (quando as amostras foram coletadas entre o 1º e o 5º dia de sintomas).

Para a detecção viral por RT-qPCR, a extração do RNA foi realizada pela equipe técnica do LACEN/ES, com uso do kit “*PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit*” (Life Technologies, CA - EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram efetuadas no equipamento *7500 - Real-Time PCR* (Life Technologies, CA – EUA). Os *primers* (Life Technologies, CA – EUA) e sonda (Life Technologies, CA – EUA) utilizados constam na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* e sondas utilizados na detecção do vírus Chikungunya em amostras biológicas referenciadas ao LACEN/ES.

| Primer/sonda | Sequência | Referência |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------|
| 6856 F | 5'- TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA- 3' | Lanciotti <i>et al.</i> 2007 |
| 6981 R | 5'- TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC- 3' | Lanciotti <i>et al.</i> 2007 |
| 6919 FAM* | 5'- AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG- 3' | Lanciotti <i>et al.</i> 2007 |

4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

4.3.1 Seleção dos genes e confecção dos *primers*

Primeiramente, foi realizada uma revisão de literatura, a fim de buscar genes candidatos a serem utilizados nas análises filogenéticas. Após revisão, foi constatado que os principais trabalhos de filogenia analisam a diversidade genética do CHIKV com uso de genes codificantes de proteínas do envelope viral. Assim, o presente estudo utilizou os genes *E1* e *E2* para as devidas análises.

Para a confecção dos *primers* utilizados no estudo, primeiramente os fragmentos que representam cada gene (*E1* e *E2*) foram rodados no programa *Primer 3* (KORESSAAR e RAMM, 2007; UNTERGASSER *et al.*, 2012). O programa seleciona possíveis *primers* para a sequência abordada, de acordo com as especificidades requeridas.

Como critério de seleção, os *primers* deveriam preferencialmente se ligar ao genoma de CHIKV e não ao genoma humano (de acordo com a ferramenta *Basical Local Alignment Search Tool – BLAST*). Além disso, o fragmento gerado deveria apresentar um suporte maior que 700/1000 nas três linhagens de CHIKV (ECSA, Asiática e Oeste africana) de acordo com o método de “*Neighbor Joining*” no programa *MEGA 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Uma análise *in silico* da filogeografia de CHIKV com 50 sequências virais depositadas no GenBank foi realizada com a finalidade de observar se os *primers* desenhados (Tabela 3) evidenciariam as linhagens existentes do vírus.

O programa *MEGA 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) foi utilizado para alinhamento e produção das filogenias. O programa *MLStest* (TOMASINI *et al.*, 2013) foi utilizado para geração dos dados concatenados dos genes *E1* e *E2*.

Tabela 3. *Primers* utilizados para a amplificação parcial dos genes *E1* e *E2* do vírus Chikungunya.

| Primer | Sequência | Tamanho do fragmento | Posição no genoma |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| E1 <i>primary</i> F | 5'- CCGTACGTGAARTGCTG- 3' | 958pb | 10.166pb |
| E1 <i>primary</i> R | 5'- CRCAGTGTACTTGTGTRGA -3' | | 11.123pb (gene <i>E1</i>) |
| E2 <i>internal</i> F | 5'- TGGAACAATGGGACACTTCA -3' | 937pb | 8.824pb |
| E2 <i>internal</i> R | 5'- AGCTCCTGGTGTCAGTTCRT -3' | | 9.760pb (gene <i>E2</i>) |

Nota: R: G ou A.

4.3.2 Extração de RNA, amplificação e purificação

Vinte e sete amostras positivas para o CHIKV (diagnóstico por RT-qPCR) foram utilizadas para amplificação parcial dos genes *E1* e *E2*. A extração de RNA foi

realizada com uso do kit “*PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit*” (Life Technologies, CA - EUA), de acordo com as normas indicadas pelo fabricante.

A transcrição reversa e a amplificação foram realizadas com uso do kit “*GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System*” (Promega, WI – EUA), no equipamento *Veriti™ 96-well Thermal Cycler* (Life Technologies, CA – EUA). As condições estão apresentadas nas Tabelas 4 e 5.

A purificação das amostras amplificadas, foi realizada com uso do kit “*Agarose Gel Extraction*” (Cellco Biotec, SP – BR), de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante.

Tabela 4. Condições da transcrição reversa e da amplificação - gene *E1*.

| RT | | PCR | | | |
|---------------------|----------------------|-------------------|------------|-----------|----------------|
| Temperatura /tempo | | Temperatura/tempo | | | |
| 1 ciclo | | 1 ciclo | 40 ciclos | | 1 ciclo |
| Transcrição Reversa | Desnaturação inicial | Desnaturação | Anelamento | Extensão | Extensão final |
| 45°C/15min | 95°C/2min | 95°C/15seg | 63°C/20seg | 60°C/1min | 60°C/5min |

Tabela 5. Condições da transcrição reversa e da amplificação - gene *E2*

| RT | | PCR | | | |
|---------------------|----------------------|-------------------|------------|-----------|----------------|
| Temperatura /tempo | | Temperatura/tempo | | | |
| 1 ciclo | | 1 ciclo | 40 ciclos | | 1 ciclo |
| Transcrição Reversa | Desnaturação inicial | Desnaturação | Anelamento | Extensão | Extensão final |
| 45°C/15min | 95°C/2min | 95°C/15seg | 64°C/20seg | 60°C/1min | 60°C/5min |

4.3.3 Sequenciamento e análise das sequências

As reações de sequenciamento foram realizadas na Plataforma de Sequenciamento Genômica e Transcriptoma NGS da Fiocruz (Rio de Janeiro, BR) e no Núcleo de Pesquisa Aplicada a Conservação da Biodiversidade (NGACB-UFES), de acordo com o protocolo estabelecido por cada grupo.

Após sequenciamento, a identidade das sequências foi confirmada com uso do *BLAST* e por meio do alinhamento (*MUSCLE*) no programa *MEGA 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Para a análise da diversidade genética, foram utilizados 42 genomas (Anexo B) completos de CHIKV previamente depositados no GenBank, com representatividade de cada linhagem conhecida do vírus, juntamente às sequências obtidas neste estudo.

O alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta *MUSCLE* do *MEGA 7.0* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). As árvores foram construídas utilizando esse mesmo programa pelos métodos “*Neighbor Joining*” e “*Maximum Likelihood*”. Ambos utilizaram “*Kimura-2-parâmetros*”, como modelo evolutivo, e um *bootstrap* de 1000 replicações. A aplicação de dois métodos foi utilizada para confirmação dos resultados.

5 RESULTADOS

Entre o período de 08/03/2016 a 12/12/2017, o LACEN/ES recebeu 2.021 amostras de casos suspeitos da CHIKF, referente a todo estado do ES. Destas, 382 foram confirmadas por sorologia ELISA IgM e 30 por RT - qPCR, sendo ao todo 412 amostras positivas para CHIKF. Assim, a frequência da doença em amostras biológicas referenciadas ao LACEN/ES foi de 20,38%.

A distribuição geográfica dos casos da CHIKF no ES está demonstrada na Figura 9. Foi constatado que os municípios mais afetados pela doença são Vitória e Vila Velha, os quais, somados, representam mais de 50% (228) de todos os casos confirmados no ES.

Dentre as amostras positivas no RT-qPCR, 22 apresentaram amplificação para os fragmentos dos genes *E1* e *E2* e foram sequenciadas. Destas, 6 amostras foram utilizadas nas análises de diversidade genética aqui apresentadas (Figuras 10 e 11). Os resultados, com base no fragmento de 855 pares de base (pb) (423pb *E1* e 432pb *E2*), evidenciam que as amostras analisadas pertencem à linhagem ECSA do vírus.

O fragmento esperado de 1895pb não foi observado. Porém, o sequenciamento de apenas 855pb não comprometeu os resultados, uma vez que o menor *bootstrap* observado em uma das 3 linhagens foi de 77.

A caracterização molecular dos fragmentos das proteínas E1 e E2 não evidenciou as mutações adaptativas E1-K211E; E1-A226V; E2-L210Q e E2-I211T nas amostras analisadas (Figuras 12 e 13).

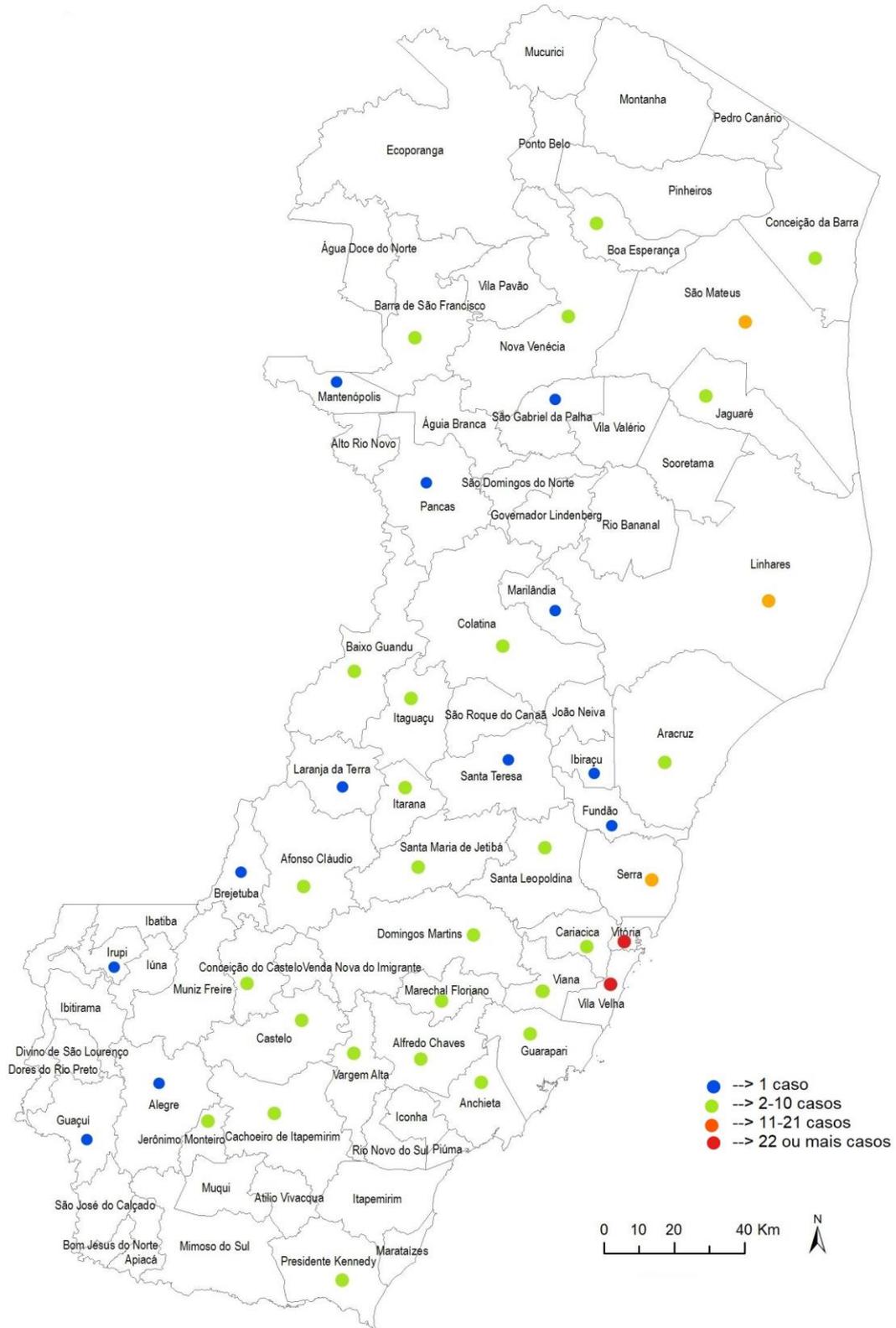


Figura 9. Distribuição geográfica dos casos confirmados da febre chikungunya no Espírito Santo. Os municípios que apresentaram apenas 1 caso da doença estão evidenciados em azul. Entre 2-10 casos, em verde. Entre 11-21 casos estão sinalizados em laranja. Cidades que reportaram acima de 22 casos da doença estão em vermelho.

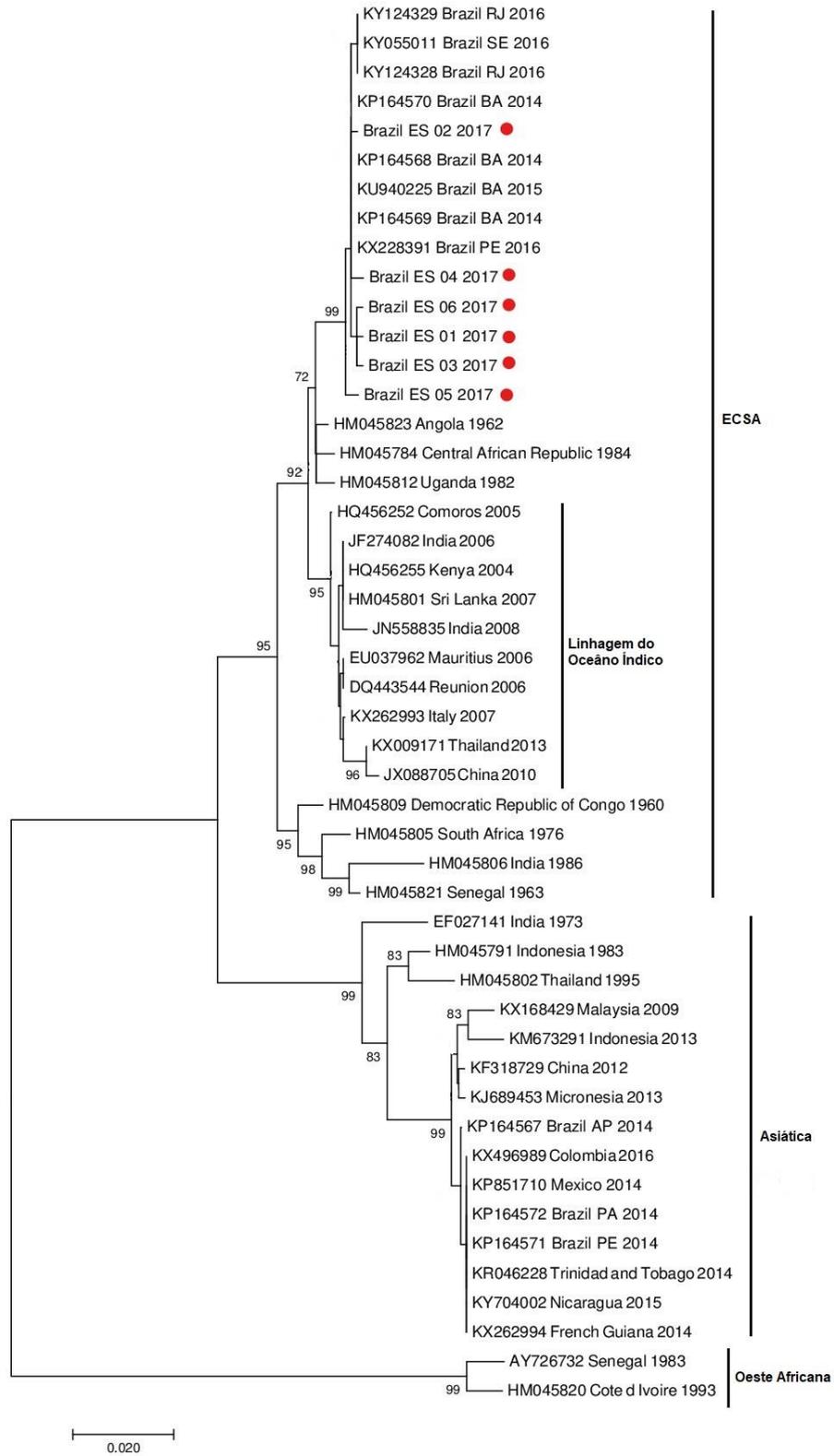


Figura 10. Filogenia do vírus Chikungunya, com distinção das três grandes linhagens. Amostras estudadas (n=6) estão em evidência. Filogenia realizada no programa *MEGA 7* pelo método *Neighbor-Joining* e *Kimura-2-parâmetros*, como modelo de substituição. Foi utilizado um *bootstrap* de 1000 replicações. Valores acima de 70 são mostrados.

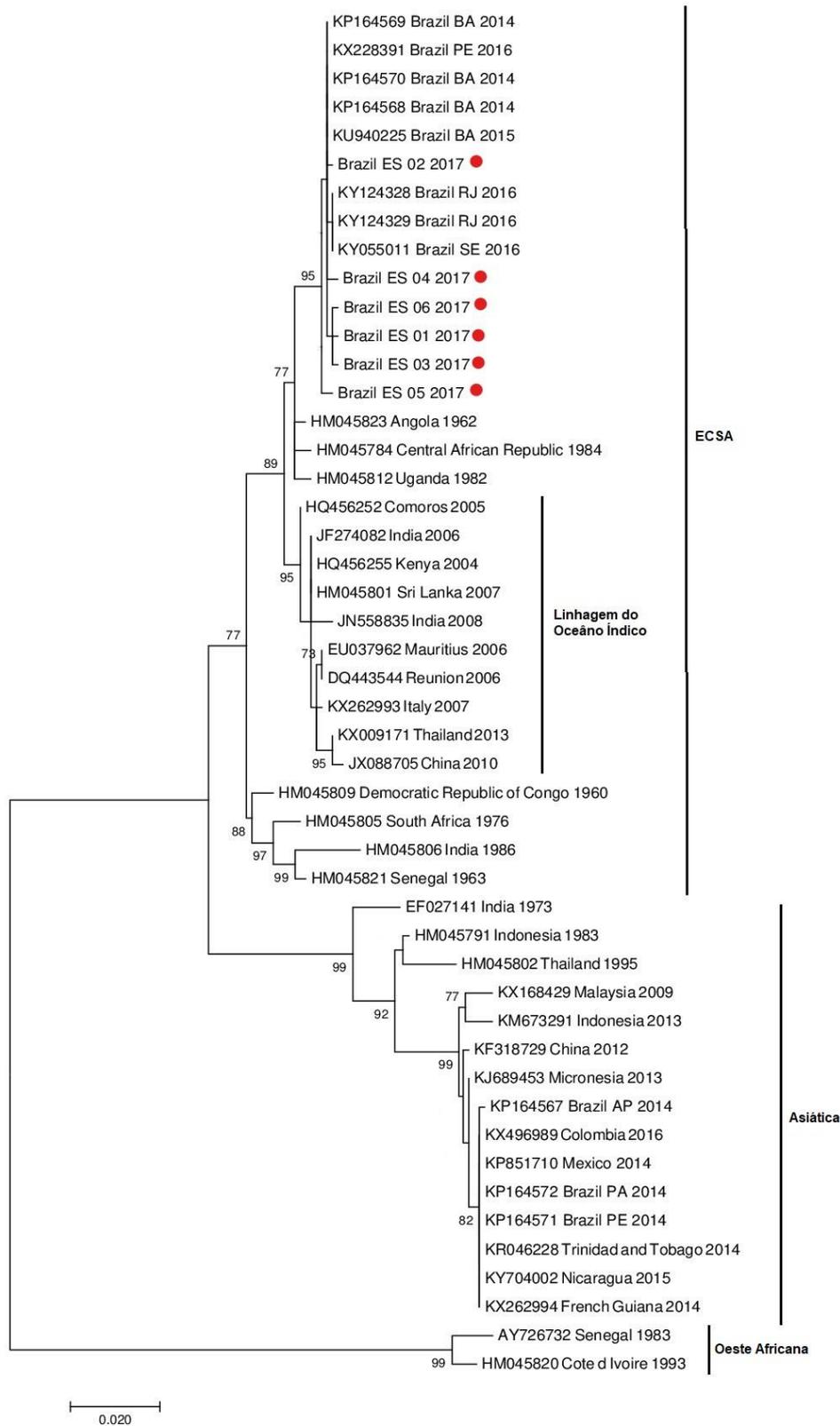


Figura 11. Filogenia do vírus Chikungunya, com distinção das três grandes linhagens. Amostras estudadas (n=6) estão em evidência. Filogenia realizada no programa *MEGA 7* pelo método *Maximum Likelihood* e *Kimura-2-parâmetros*, como modelo de substituição. Foi utilizado um *bootstrap* de 1000 replicações. Valores acima de 70 são mostrados.

6 DISCUSSÃO

Este estudo fornece dados epidemiológicos sobre a frequência e distribuição geográfica da CHIKF em amostras referenciadas ao LACEN/ES, além de reportar pela primeira vez a presença da linhagem ECSA do CHIKV no Espírito Santo.

6.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Dentre os 2.021 casos suspeitos da CHIKF entre 2016-2017 no ES, referenciados ao LACEN/ES, 412 (20,38%) foram confirmados.

Gregriani *et al.* 2017 analisaram 1276 casos suspeitos no estado do Rio Grande do Sul (RS), referenciados ao LACEN/RS entre 2014-2016, contudo apenas 101 (7,91%) foram confirmados. Em colaboração com o LACEN/BA, Cardoso *et al.* (2017) analisaram 3.042 casos suspeitos da CHIKF entre 2014-2016. Destas, 456 (16,7%) atestaram positivo. Nesse período, o estado da BA enfrentava uma grande epidemia de zika, chegando a reportar 17 mil casos da doença em menos de 10 semanas. (CARDOSO *et al.*, 2017). A frequência elevada de casos de zika em relação aos casos da CHIKF não foi observada no surto reportado no ES.

Cunha *et al.* (2017b) analisaram 142 pacientes que apresentaram sintomas característicos da CHIKF em fevereiro de 2016 no estado do SE. Destes, 107 (75,35%) foram confirmados. A disparidade entre a frequência constatada no estudo de Cunha *et al.* (2017b) e o presente estudo pode ser explicada pelo tamanho amostral. Além disso, a equipe técnica do LACEN/ES analisou todas as amostras referentes a diversos municípios do ES entre 2016-2017, sendo os casos suspeitos selecionados por profissionais de saúde.

Por outro lado, a equipe de pesquisadores no estudo de Cunha *et al.* (2017b), selecionou pacientes atendidos em unidades básicas de saúde e que evidenciavam sintomas da CHIKF. Desse modo, a seleção feita pelos pesquisadores no estudo de

Cunha *et al.* (2017b) possivelmente foi mais criteriosa, refletindo em uma frequência mais elevada de casos confirmados em comparação ao estudo em questão.

Entre os anos de 2015 e 2016 Magalhães *et al.* (2017) analisaram o sangue de 236 pacientes na cidade de Recife – Pernambuco (PE), confirmando 132 (50%) infecções por CHIKV. A discrepância entre a frequência obtida no estudo de Magalhães *et al.* (2017) e o presente estudo pode ter relação com a diferença temporal; número amostral e cidades abordadas.

Magalhães *et al.* (2017) aponta que durante o período analisado, foi constatado um grande surto de infecções por CHIKV em Recife. Desse modo, os casos confirmados na cidade seriam elevados. Além disso, em nosso estudo, a equipe técnica do LACEN/ES analisou amostras oriundas de diversas cidades do ES, constatando um número amostral quase 9 vezes maior do que o utilizado por Magalhães *et al.* (2017) e mais espaçado geograficamente (não apenas de uma cidade). Assim, a discrepância entre as frequências de casos confirmados em ambos os estudos pode ser justificável.

Observou-se que estudos que possuem parceria com LACENs apresentam grande quantidade de casos suspeitos, porém, poucos são confirmados. Uma explicação plausível para diferentes estados reportarem baixa frequência é a similaridade entre os sintomas de zika, dengue e CHIKF. Diversos pacientes podem não apresentar a manifestação clínica característica de uma das arboviroses, como a poliartralgia, no caso da CHIKF (BURT *et al.*, 2012). Assim, o diagnóstico com base apenas nos sintomas não é recomendado, sendo necessária a aplicação de exames laboratoriais para a confirmação da doença (CHIPWAZA *et al.*, 2014). Desse modo, a baixa frequência de confirmação da CHIKF observada no ES, RS e BA é algo esperado, pois muitos casos, provavelmente, são de zika ou dengue.

Em contrapartida, estudos desvinculados a LACENs evidenciam um número amostral menor, contudo, apresentam uma frequência maior de casos confirmados. Com um número amostral menor, possivelmente tais estudos investem em um diagnóstico diferencial e criterioso realizado por uma equipe de pesquisadores, a fim de que a maioria dos casos selecionados, sejam casos confirmados da CHIKF.

A distribuição geográfica dos casos confirmados para a CHIKF no ES evidencia que, dentre os 78 municípios, 43 reportaram a doença. Cunha *et al.* (2017b) sugerem que o CHIKV apresenta alto poder de dispersão, sendo constatado em 11 das 13 cidades analisadas pelo grupo.

A ampla distribuição da CHIKF no ES provavelmente possui relação com a dimensão do estado, um dos menores do Brasil. Além disso, grande parte da população costuma realizar pequenas viagens ao interior do estado para visitar parentes ou a trabalho, o que auxilia na dispersão vírus.

Dentre os 412 casos confirmados em nosso estudo, mais da metade foram relatados em Vitória ou Vila Velha. Devido à grande importância econômica e turística, esses são os municípios mais visitados do ES, o que acarreta em um fluxo contínuo de viajantes. Além disso, é cultura no estado do ES jovens cursarem universidade/faculdade na capital (Vitória) ou em localidades próximas (Vila Velha), o que aumenta a população das referidas cidades.

Na estimativa do IBGE (2017), Vila Velha e Vitória possuem 486.388 e 363.140 habitantes, respectivamente. Cunha *et al.* (2017b) e Pham *et al.* (2017) observaram que cidades mais populosas tendem a apresentar maior quantidade de casos da CHIKF. Assim, o fluxo contínuo de pessoas somado à grande população de ambas as cidades podem explicar o porquê de Vitória e Vila Velha evidenciarem mais de 50% dos casos da CHIKF no ES.

Um fator a se considerar, como já dito, é que muitas pessoas que residem na capital ou em cidades vizinhas, trabalham ou viajam periodicamente para o interior do estado. Assim, a preocupação com a disseminação da CHIKF em localidades ainda não atingidas, vem à tona. Desse modo, é importante que exista uma constante vigilância epidemiológica a fim de prevenir a disseminação da CHIKF em localidades livres do vírus no estado.

6.2 RESULTADOS FILOGENÉTICOS

A escolha em utilizar os genes *E1* e *E2* como alvos nos estudos filogenéticos foi devido ao fato de ambos apresentarem uma alta variabilidade genética, o que distingue de maneira satisfatória as 3 grandes linhagens de CHIKV (SOUZA *et al.*, 2017). Além disso, levou-se em consideração que as proteínas codificadas por esses genes apresentam papel crucial na entrada viral na célula alvo e na replicação do vírus (LUM e NG, 2015). Em adição, estudos sugerem que mutações ocasionadas nessas proteínas estão envolvidas em uma maior infectividade viral nos vetores (AGARWAL *et al.*, 2016; TSERTSAKIN e WEAVER, 2011), tornando-as assim, bons marcadores para filogenia em CHIKV.

Infelizmente, o fragmento esperado de 1895pb (958pb gene *E1* e 937pb gene *E2*) não foi alcançado devido a problemas no sequenciamento das amostras. Estudos como os de Nyvas *et al.* (2010); Souza *et al.* (2017) e Phommanivong *et al.* (2016) investigaram apenas um gene e utilizaram fragmentos menores que 600pb para analisar a diversidade genética de CHIKV. Desse modo, o fragmento alcançado de 855pb (423pb *E1* e 432pb *E2*) não comprometeu os resultados obtidos e pode distinguir de forma satisfatória as 3 grandes linhagens do vírus (Figura 10 e 11).

A análise filogenética, a partir de 855pb referentes aos genes *E1* e *E2* de 6 pacientes com a CHIKF durante o surto ocorrido entre 2016-2017 no ES, evidenciou claramente que o CHIKV circulante no estado pertence ao genótipo ECSA. Essa linhagem já foi reportada em diversas localidades da Ásia e da África, sendo ainda responsável pelo surgimento da CHIKF na Europa (2007) (WAHID *et al.*, 2017).

Nunes *et al.* (2015) foram a primeira equipe a relatar a presença da linhagem ECSA nas Américas e em território brasileiro (Feira de Santana-BA) em setembro de 2014, e sugerem que a introdução tenha ocorrido através da presença de um cidadão brasileiro contaminado que trabalhava em Angola e visitava sua família na BA (NUNES *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2015). Após este estudo, trabalhos realizados principalmente na região nordeste do país, também constataram a presença desta linhagem (COSTA-DA-SILVA *et al.* 2017; COSTA *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2017b).

Até então, apenas dois estudos relataram a presença do genótipo ECSA na região sudeste do país (CUNHA *et al.*, 2017a; SOUZA *et al.*, 2017).

Do mesmo modo, existem poucos trabalhos que apontam a presença da linhagem Asiática no Brasil. No mesmo estudo, Nunes *et al.* (2015) reportaram pela primeira vez a presença do genótipo Asiático no país (Oiapoque-AP, 2014). Os autores sugerem que este caso no estado do AP tenha relação com o surto ocorrido na mesma época na Guiana Francesa (NUNES *et al.*, 2015). Desde então, apenas Conteville *et al.* (2016) observaram a presença do genótipo Asiático em território brasileiro.

O presente estudo juntamente aos trabalhos de Souza *et al.* (2017) e Cunha *et al.* (2017a) constatou a importância epidemiológica da linhagem ECSA na região sudeste do Brasil. Do mesmo modo, de acordo com Cunha *et al.* (2017b) o genótipo ECSA também está associado ao surgimento e persistência dos casos de CHIKF na região nordeste do Brasil.

Diversos estudos apresentam a relevância do genótipo ECSA e sua relação com a epidemiologia da CHIKF (AMRAOUI e FAILLOUX, 2016). Sugere-se que surgimento do subgrupo "IOL", pertencente a linhagem ECSA, está relacionado à mutação E1-A226V, a qual aumenta em 40 vezes a replicação viral em *A. albopictus* (TSETSARKIN e WEAVER, 2011). Além disso, AGARWAL *et al.* (2016), TSETSARKIN *et al.* (2009) e TSETSARKIN e WEAVER (2011) apresentam que as variantes E1-K211E, E2-L210Q e E2-I211T também estão relacionadas a uma maior replicação viral nos vetores, o que conseqüentemente aumenta a dispersão do vírus em humanos.

O estudo de TSETSARKIN *et al.* (2009) mostra que a mutação E2-I211T aumenta a infectividade do CHIKV em *A. albopictus*, quando a mesma está em presença da mutação E1-A226V. Isso sugere que a mutação E2-I211T pode exibir efeito na modulação da infectividade de CHIKV em *A. albopictus* (TSETSARKIN *et al.*, 2009).

A caracterização molecular dos fragmentos das proteínas E1 e E2 no presente estudo não evidenciou nenhuma das mutações adaptativas abordadas. Desse modo, sugere-se que o vírus circulante no ES apresenta um potencial de

disseminação menor em comparação aos vírus circulantes em grandes epidemias mundiais recentes.

O presente estudo também não constatou a mutação E1-K211T descrita por Souza *et al.* (2017). A variação em questão também não é observada na cepa circulante em Feira de Santana-BA (2014). Tal substituição parece estar relacionada exclusivamente ao genótipo ECSA circulante no estado do RJ, haja vista que Cunha *et al.* (2017a) também reportaram a mesma alteração em seu trabalho. Assim, pode-se sugerir que a linhagem circulante no ES está mais próxima filogeneticamente à circulante nos estados do nordeste do Brasil, os quais não evidenciam essa mutação. Souza *et al.* (2017) apontam que mais estudos são necessários para esclarecer as consequências desta substituição, tanto na aptidão do vetor em transmitir a doença, quanto sua relação com o sistema imune humano.

Em seu trabalho, Nunes *et al.* (2015) expõe a preocupação com a disseminação da linhagem ECSA por todo o território brasileiro. Chen *et al.* (2016) infere a relevância do genótipo ECSA em epidemias da CHIKF, sendo relacionado a surtos ocorridos em Camarões, Gabão e Congo, por exemplo. O poder de dispersão do vírus pode ter relação com diversos fatores tais como, adequação do vetor ao ambiente e altos níveis de mobilidade humana em regiões endêmicas (COSTA *et al.*, 2017).

Atualmente, quase 3 anos após o estudo de Nunes *et al.* (2015), pode-se confirmar que o genótipo ECSA exibe grande capacidade de disseminação, sendo atualmente constatado em diversos estados do nordeste, RJ e no ES. Desse modo, estudos filogenéticos em diferentes localidades do Brasil auxiliam no acompanhamento da dispersão do genótipo no país.

O estudo conduzido por Sahadeo *et al.* (2017) aponta a improbabilidade do genótipo ECSA tornar-se endêmico em ilhas da América Central e no EUA. O grupo sugere que, mesmo após a introdução do genótipo em Feira de Santana-BA em 2014, surtos relatados em ilhas caribenhas apontam apenas a presença da linhagem Asiática do vírus. Assim, é provável que a imunidade adquirida pela população dessas regiões impeça a dispersão do genótipo ECSA nessas localidades (SAHADEO *et al.*, 2017).

Atualmente, a linhagem ECSA é encontrada apenas em *A. aegypti* nas Américas (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2017), contudo o estudo de Vega-Rua *et al.* (2014) evidencia que *A. albopictus* também apresenta alta capacidade em carregar este genótipo. Com isso, levanta-se a preocupação do vírus adquirir a mutação E1-A226V, o que acarretaria em grandes epidemias da CHIKF em todo o Brasil, aumentando a possibilidade de disseminação do vírus à países vizinhos como Argentina, Uruguai e Paraguai (NUNES *et al.*, 2015).

De acordo com Wahid *et al.* (2017) a expansão global de casos da CHIKF é alarmante e o potencial de dispersão da doença em áreas que não reportam a presença de CHIKV está associado à presença de turistas contaminados. Do mesmo modo, a expansão do vírus é evidente em território brasileiro, sendo necessário medidas que diminuam os casos da doença. Contudo, atualmente não existe vacina, programa de controle vetorial ou um tratamento específico para CHIKF. Nesse cenário, sobre a diversidade genética de CHIKV podem servir como base no desenvolvimento de vacinas, bioprodutos, insumos e alvos terapêuticos para o controle da doença no Brasil e no ES.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que a frequência da infecção pelo CHIKV, em relação ao número de amostras referenciadas ao LACEN/ES com suspeita da CHIKF, pode ser considerada baixa. No entanto, constatou-se que a CHIKF apresenta relevância epidemiológica e grande distribuição no estado do ES, sendo que cidades mais populosas evidenciaram uma maior quantidade de casos da doença. Desse modo, é importante que exista uma constante vigilância epidemiológica a fim de prevenir a disseminação da CHIKF em localidades livres do vírus no estado.

Após análises filogenéticas, foi constatado que o vírus circulante no ES é pertencente à linhagem ECSA, a qual é responsável por surtos na Europa, Ásia, África e em países banhados pelo Oceano Índico. Observou-se também, que o vírus presente no ES é próximo filogeneticamente a outros de mesmo genótipo circulantes no Brasil.

A caracterização molecular dos fragmentos das proteínas E1 e E2 no presente estudo nos permite sugerir que o vírus circulante no ES apresenta um poder de dispersão menor em comparação aos CHIKV relatados em grandes epidemias mundiais recentes, devido à ausência das mutações adaptativas abordadas.

Além disso, o estudo em questão também auxilia na expansão da base de dados genotípica do CHIKV, o que permite melhor entendimento sobre a epidemiologia da doença em todo Brasil.

Em resumo, devido à falta de uma vacina e dificuldade no controle populacional do mosquito vetor, estudos sobre a diversidade genética tornam-se alternativas viáveis em busca de um melhor entendimento e controle da CHIKF no Brasil e no ES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABI, R. et al. Antiviral treatment efficiently inhibits chikungunya virus infection in the joints of mice during the acute but not during the chronic phase of infection. **Antiviral Res.** v.149, p. 113-17, 2018.

AGARWAL, A. et al. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. **Virology**, v. 497, p. 59-68, 2016.

ALLA, S.; COMBE, B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 3, p. 337-46, 2011.

AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A. B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **Curr Opin Virol**, v. 21, p. 146-150, 2016.

AZEVEDO RDO, S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. Chikungunya risk for Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 49, p. 58, 2015.

BERNARD, E. et al. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11479, 2010.

BOUQUILLARD, E.; COMBE, B. Rheumatoid arthritis after Chikungunya fever: a prospective follow-up study of 21 cases. **Ann Rheum Dis.** v. 68, n. 9, p. 1505-6, 2009.

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

CARDOSO, C. W. et al. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 1, p. e0005334, 2017.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurol India**, v. 57, n. 2, p. 177-80, 2009.

CHEN, R. et al. Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. **J Virol**, v. 90, n. 23, p. 10600-10611, 2016.

CHARREL, R. N.; LAMBALLERIE, X.; RAOULT, D. Chikungunya outbreaks—the globalization of vectorborne diseases. **N Engl J Med**. v. 22, n. 356, p. 769-71, 2007.

CHIPWAZA, B. et al. Dengue and Chikungunya fever among viral diseases in outpatient febrile children in Kilosa district hospital, Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3335, 2014.

CONTEVILLE, L. C. et al. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2015. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 347-8, 2016.

COSTA, C. A. et al. Spread of chikungunya virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 23n n. 10, p. 1742-44, 2017.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, p. e0005630, 2017.

CUNHA, M. S. et al. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerg Infect Dis.** v. 23, n. 10, p.1737-9, 2017a.

CUNHA, M. D. P. et al. Outbreak of chikungunya virus in a vulnerable population of Sergipe, Brazil-A molecular and serological survey. **J Clin Virol**, v. 97, p. 44-49, 2017b.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycle. **Am J Trop Med Hyg**, v.60, n. 2, p. 281-85, 1999.

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

FOURIE, E. D.; MORRISON, J. G. Rheumatoid arthritic syndrome after chikungunya fever. **S Afr Med J.** v. 28, n. 56, p. 130-2, 1979.

GERARDIN, P. et al. Predictors of Chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 1, p. R9, 2013.

GERARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS Med.** v. 18, n. 5, p. e60, 2008.

GREGIANINI, T. S. et al. Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016. **Rev Med Virol**, v. 27, n. 6, 2017.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 15, n. 4, p. 231-40, 2015.

HUA, C.; COMBE, B. Chikungunya Virus-Associated Disease. **Curr Rheumatol Rep**, v. 19, n. 11, p. 69, 2017.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J Gen Virol**, v. 83, n. 12, p. 3075-84, 2002.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics**, v. 23, n. 10, p. 1289-91, 2007.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **J Gen Virol**, v. 89, n. 8, p. 1945-8, 2008.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-4, 2016.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 764-7, 2007.

LANCIOTTI, R. S.; LAMBERT, A. J. Phylogenetic Analysis of Chikungunya Virus Strains Circulating in the Western Hemisphere. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 4, p. 800-3, 2016.

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

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

LO PRESTI, A. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. **Infect Genet Evol**, v. 41, p. 270-8, 2016.

LUM, F. M.; NG, L. F. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Res**, v. 120, p. 165-74, 2015.

MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 11, p. e0006055, 2017.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 834371, 2015.

MANIMUNDA, S. P. et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 6, p. 392-9, 2010.

MAVALANKAR, D.; SHASTRI, P.; RAMAN, P. Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 306-307, 2007.

MUNHOZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: Un arbovirus reemergente in Venezuela y Latinoamérica. **Biomedica**. v. 32, p. 286-02, 2012.

MS – Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45, 2017.**

Diponível em: <
http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/PDF/2017/novembro/28/2017_039.pdf>.
 Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

NIYAS, K. P. et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. **Virology**, v. 7, p. 189, 2010.

NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Med**, v. 13, p. 102, 2015.

PAHO – Pan American Health Organization. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory. 2017**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43198&lang=en>. Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

PHAM, P. N. et al. Epidemiology of Chikungunya fever outbreak in Western Jamaica during July-December 2014. **Res Rep Trop Med**, v. 8, p. 7-16, 2017.

PHOMMANIVONG, V. et al. Co-circulation of the dengue with chikungunya virus during the 2013 outbreak in the southern part of Lao PDR. **Trop Med Health**, v. 44, p. 24, 2016.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**. v. 81, p. 471-9, 2000.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-7, 2007.

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

ROBIN, S. et al. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **J Child Neurol**, v. 23, n. 9, p. 1028-35, 2008.

ROBINSON, M.C. Na epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

SAHADEO, N. S. D. et al. Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences. **Virus Evol**, v. 3, n. 1, p. vex010, 2017.

SARDI, S. I. et al. Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 9, p. 2348-53, 2016.

SINGH, S. S. et al. Four cases of acute flaccid paralysis associated with chikungunya virus infection. **Epidemiol Infect**, v. 136, n. 9, p. 1277-80, 2008.

SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 3, p. e389, 2009.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-97, 2009.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **Plos Pathog**. v. 3, n. 6, p. e89, 2007.

SOUZA, T. M. et al. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Curr**, v. 9, 2017.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South African Genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerg Infect Dis**. v. 21, n. 5, p. 906-7, 2015.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res**, v. 99, n. 3, p. 345-70, 2013.

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

TSETSARKIN, K. A. et al. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6835, 2009.

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

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Curr Opin Virol**, v. 16, p. 143-150, 2016.

TOMASINI, N. et al. MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms. **Infect Genet Evol**, v. 20, p. 188-96, 2013.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

VANLANDINGHAM, D. L. et al. Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg**. v. 74, n. 4, p. 663-9, 2006.

VEGA-RUA, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **J Virol**, v. 88, n. 11, p. 6294-306, 2014.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **J Virol**, v. 84, n. 13, p. 6497-504, 2010.

WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **Int J Infect Dis**, v. 58, p. 69-76, 2017.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 13, p. 1231-9, 2015.

WIN, M. K. et al. Chikungunya fever in Singapore: acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. **J Clin Virol**, v. 49, n. 2, p. 111-4, 2010.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **J Infect Dis**, v. 214, n. suppl 5, p. S441-S445, 2016.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA - UFES

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da diversidade genética e do efeito do Zika virus no desenvolvimento de transtornos neurológicos

Pesquisador: Michelle de Oliveira e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58753216.4.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.819.673

Apresentação do Projeto:

Este estudo consta de duas etapas:

A proposta da primeira fase do presente projeto de pesquisa inclui a realização de um estudo com abordagem epidemiológica e filogenética a nível populacional com objetivo de analisar a prevalência das distintas arboviroses, e as relações filogenéticas das cepas de ZIKA identificadas com sequências virais disponíveis em bancos de dados. Essa análise permitira a identificação de novos marcadores moleculares e a inferência dos possíveis processos demográficos envolvidos na introdução do vírus no estado do ES. A partir dos dados obtidos nessa etapa, pretendemos na segunda fase deste projeto, realizar um estudo caso controle sobre o efeito do ZIKV no risco de desenvolvimento de transtornos neurológicos congênitos, assim como a interação desse vírus com fatores epidemiológicos, ambientais e genéticos.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o autor:

Objetivo Primário:

Analisar a distribuição geográfica e a diversidade genética das arboviroses Zika, Dengue e Chikungunya e estudar o efeito do ZIKV no desenvolvimento de transtornos neurológicos

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.819.673

congenitos no estado do ES.

Objetivo Secundario:

- Estimar a frequencia das diferentes arboviroses (Zika, Dengue e Chikungunya) em amostras biologicas referenciadas ao Lacen;
- Comparar a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos e negativos dos testes recomendados para a identificacao das arboviroses pelo Ministerio da Saude com a tecnologia MultiFLEX™ (GenArray™, USA);
- Analisar filogeneticamente as cepas detectadas nas amostras biologicas positivas para ZIKV;
- Estimar os possiveis processos demograficos envolvidos na introducao do ZIKV no estado do ES;
- Realizar o sequenciamento do genoma completo do ZIKV em material biologico positivo viral isolado a partir de maes e/ou bebes disponiveis no Lacen, para os casos de grave acometimento neurologico congenito e casos de exposicao ao virus sem acometimento neurologico;
- Analisar o efeito do ZIKV no risco de desenvolvimento de transtornos neurologicos congenitos, assim como a interacao desse virus com fatores geneticos, moleculares, epidemiologicos, ambientais e clinicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esta pesquisa oferece baixos riscos tanto aos individuos que participarem deste estudo quanto aos pesquisadores envolvidos, pois inclui a utilizacao de material biologico coletado previamente seguindo todas as rigorosas normas de biosseguranca atualmente implementadas pelo LACEN.

Os riscos deste projeto estão relacionados ao contato com materiais biologicos possivelmente contaminados e reagentes quimicos durante o processamento das amostras. A fim de minimizar qualquer dano, todas as etapas da pesquisa seguirao rigorosos protocolos de biosseguranca, assegurando todos os participantes e pesquisadores envolvidos no estudo.. Reiteramos que somente os membros envolvidos no projeto terão acesso aos dados obtidos a partir de exames e questionário realizados para este estudo. Dessa forma, prezamos evitar sua exposição pessoal, assim como de seus dados evitando possíveis constrangimentos.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.819.673

Benefícios:

A realização deste estudo permitirá o levantamento de dados ainda não avaliados para a população do estado do Espírito Santo acerca da frequência das três arboviroses de maior importância atual na saúde pública: Zika, Dengue e Chikungunya. Além disso, os fatores epidemiológicos, moleculares, virais e imunológicas congênitas, a fim de contribuir para o conhecimento regional e internacional por meio da publicação de artigos científicos em revistas indexadas. Na segunda etapa do projeto, na qual o estudo caso-controle será que consentirem participar serão beneficiadas por um acompanhamento gestacional priorizado, com maior disponibilidade de exames tanto quanto forem necessários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante cientificamente

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto apresentada e adequada

Projeto original apresentado e adequado

Cartas de sigilo e confidencialidade apresentadas e adequadas

Riscos e Benefícios apresentados e em conformidade com a resolução 466/2012

TCLE apresentado e em conformidade com a resolução 466/2012

Regulamento Biorepositório apresentado e ok

Cronograma apresentado e adequado

Recomendações:

Toda pesquisa deve seguir a resolução 466/2012 do CNS para conferência utilize o manual de pendências contido no site do CEP - <http://www.ccs.ufes.br/cep>

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES**



Continuação do Parecer: 1.819.673

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772770.pdf | 31/10/2016 16:04:46 | | Aceito |
| Folha de Rosto | folha_rosto_CORRIGIDA.pdf | 31/10/2016 15:58:42 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | ANEXOS_TCLE_Quest.pdf | 31/10/2016 15:48:15 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Outros | Resposta_CEPCCS.pdf | 26/10/2016 12:30:46 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Outros | Regulamento_biorrepositorioR441.pdf | 25/10/2016 20:48:17 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Outros | Anuencia_CamillaMazzoni.pdf | 25/10/2016 20:47:15 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Outros | Anuencia_LACEN.pdf | 25/10/2016 20:46:56 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Cronograma | Cronograma_Corrigido.pdf | 25/10/2016 20:45:35 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | DeclaracaoInfraCEP_ZIKV.pdf | 10/08/2016 01:26:22 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeRaquelReis.pdf | 10/08/2016 01:20:04 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeRaquel.pdf | 10/08/2016 01:19:03 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeLidiane.pdf | 10/08/2016 01:18:26 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeElaine.pdf | 10/08/2016 01:18:00 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeluri.pdf | 10/08/2016 01:17:31 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoConfidencialidadeMichelle.pdf | 10/08/2016 01:14:08 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoCEP_ZIKV_0908.pdf | 10/08/2016 01:11:05 | Michelle de Oliveira e Silva | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.819.673

VITORIA, 14 de Novembro de 2016

Assinado por:
Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

**ANEXO B – GENOMAS COMPLETOS UTILIZADOS NA FILOGENIA DO VÍRUS
CHIKUNGUNYA.**

| | |
|----------|-------------------------------|
| KX009171 | Thailand 2013 |
| JX088705 | China 2010 |
| KX262993 | Italy 2007 |
| HM045801 | Sri Lanka 2007 |
| JF274082 | India 2006 |
| JN558835 | India 2008 |
| HQ456255 | Kenya 2004 |
| HQ456252 | Comoros 2005 |
| EU037962 | Mauritius 2006 |
| DQ443544 | Reunion 2006 |
| DQ443544 | Brazil RJ 2016 |
| KY124329 | Brazil RJ 2016 |
| KU940225 | Brazil BA 2015 |
| KP164568 | Brazil BA 2014 |
| KP164570 | Brazil BA 2014 |
| KP164569 | Brazil BA 2014 |
| KX228391 | Brazil PE 2016 |
| KY055011 | Brazil SE 2016 |
| HM045823 | Angola 1962 |
| HM045784 | Central African Republic 1984 |
| HM045784 | Uganda 1982 |
| HM045784 | Congo 1960 |
| HM045784 | South Africa 1976 |
| HM045806 | India 1986 |
| HM045821 | Senegal 1963 |
| EF027141 | India 1973 |
| HM045791 | Indonesia 1983 |
| HM045802 | Thailand 1995 |
| KX168429 | Malaysia 2009 |
| KM673291 | Indonesia 2013 |
| KF318729 | China 2012 |
| KF318729 | Micronesia 2013 |
| KF318729 | Colombia 2016 |
| KP851710 | Mexico 2014 |
| KP164572 | Brazil PA 2014 |
| KP164571 | Brazil PE 2014 |
| KR046228 | Trinidad and Tobago 2014 |
| KP164567 | Brazil AP 2014 |
| KY704002 | Nicaragua 2015 |
| KX262994 | French Guiana 2014 |
| AY726732 | Senegal 1983 |
| HM045820 | Cote d' Ivoire 1993 |



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DIEGO DO PRADO VENTORIM

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE CHIKUNGUNYA NO ESTADO
DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA,ES

2018

PPG Biotecnologia

DIEGO DO PRADO VENTORIM

2018