

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



RODRIGO DECEMBRINO VARGAS BRASIL

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IGA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO**

**Duque de Caxias
2025**

Rodrigo Decembrino Vargas Brasil

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IGA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Orientador: Dr. Sergian Vianna Cardozo

Co-orientador: Dr. Salvatore Giovanni De Simone

**Duque de Caxias
2025**

BIOTRANS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL
Mestrado e Doutorado



Afya UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

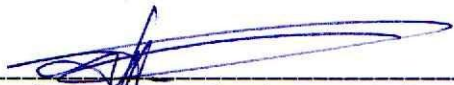


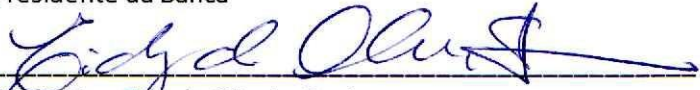
ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

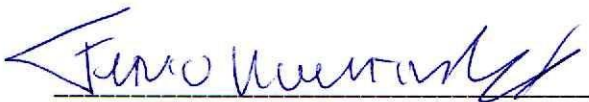
Às 9:30 horas, do dia 29 de setembro de 2025, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de apresentação de Tese do Doutorado versando sobre o projeto intitulado "MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IGA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA PARA O IMUNODIAGNÓSTICO E ANÁLISE DE REATIVIDADE CRUZADA COM OUTROS PATÓGENOS", de autoria de Rodrigo Decembrino Vargas Brasil, aluno do Doutorado Acadêmico, sob orientação do Professor Sergian Vianna Cardozo. A sessão foi aberta pelo Prof. Fábio da Silva de Azevedo Fortes, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Profa. Eidy de Oliveira Santos, Prof. Flávio Rocha da Silva e Prof. Guilherme Curty Lechuga. Em seguida, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores e suas respostas foram consideradas Satisfatórias.

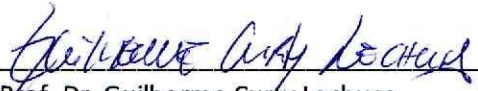
O presidente declarou o doutorando Rodrigo Decembrino Vargas Brasil Aprovado, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 29 de setembro de 2025.


Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Presidente da Banca


Profa. Dra. Eidy de Oliveira Santos
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ


Prof. Dr. Flávio Rocha da Silva
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ


Prof. Dr. Guilherme Curty Lechuga
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ


Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças, saúde e sabedoria para trilhar minha jornada acadêmica

Ao meu avô Nilson, que sempre foi e será meu maior exemplo de ser humano

A toda minha família, em especial minha mãe Tânia, meu pai Cláudio e meu irmão Rafael por sempre me apoiar e me ajudar em todos os momentos

A minha namorada Rayla por estar presente em todos os momentos que precisei e por todo amor e carinho

Ao meu orientador, professor Dr. Sergian Vianna Cardozo, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela paciência por todas as etapas do meu mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Salvatore Giovanni de Simone, pela oportunidade e disponibilidade de todo o laboratório e equipamentos para realizarmos a pesquisa da melhor forma possível.

A Dr^a Paloma Napoleão Pêgo por todo auxílio e ensinamento no que precisei, em conjunto com todos os membros do CDTS – Fiocruz/RJ.

A todos do Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas (NPDI) da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), que estiveram juntos em toda essa caminhada, principalmente os colegas de mestrado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPGBIOTRANS) que passaram por minha vida acadêmica, me tornando um melhor aluno, profissional e pessoa.

Aos colegas e alunos do PPGBIOTRANS - UNIGRANRIO.

A todos meus amigos, dos jogos online, da faculdade e da especialização que sempre me fizeram rir, me ajudaram e deram apoio durante a minha caminhada.

À FAPERJ, pela bolsa concedida

“Pois quem espera sempre alcança.”

Lamartine Babo

RESUMO

A circulação de arboviroses como a chikungunya representa um desafio significativo para a saúde pública, especialmente em áreas urbanas. A sobreposição de sintomas dificulta o diagnóstico clínico, ressaltando a necessidade de métodos laboratoriais confirmatórios. Este estudo teve como objetivo caracterizar imunológica e estruturalmente epítomos do vírus chikungunya para contribuir no desenvolvimento de um imunodiagnóstico de IgA anti-chikungunya mais fidedigno. Foram analisadas 175 amostras sanguíneas de pacientes com suspeita de arboviroses atendidos na Unidade de Pronto Atendimento de Beira Mar, Duque de Caxias, entre janeiro e junho de 2018. A prevalência de chikungunya foi de 53,71%, sugerindo um surto local. A idade mediana dos pacientes foi de 41 anos, com predominância do sexo feminino (52,07%). Clinicamente, pacientes com infectados apresentaram alta frequência de artralgia moderada a intensa (96,8%) e artrite (81,9%). O mapeamento de epítomos lineares foi realizado por síntese de peptídeos em membrana de celulose e *immunoblotting* com soros de pacientes positivos para o vírus da chikungunya, identificando regiões imunorreativas em proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, E1 e 6K) e em proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4). A análise *in silico* por *Basic Local Alignment Search Tool* identificou seis epítomos específicos do vírus sem reatividade cruzada com outros patógenos humanos: LLSKVPKTDL (nsP1), FGAPNETFPITFGDF (nsP3), LKKLQESASM (nsP4), SAVNKLTMRAVPQQK, PRRNRKNKKQ e PKQKKQPPQKKPAQK (todos do capsídeo). A predição da estrutura terciária revelou que esses epítomos estão em regiões acessíveis e potencialmente imunogênicas. Ensaio imunoenzimáticos mostraram que os peptídeos 313 e 318 apresentaram a melhor capacidade discriminatória, com Área sobre curva de 0,6825 e 0,6926, respectivamente, e p-valores significativos. Ambos demonstraram um bom equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, e um Valor Preditivo Negativo forte, indicando potencial para descarte da doença. Os peptídeos 314 e 315, por sua vez, tiveram desempenho limitado. Este estudo contribui para o desenvolvimento de um imunodiagnóstico mais sensível e específico para CHIK, destacando o potencial de epítomos específicos de IgA em proteínas estruturais e não estruturais.

Palavras-chave: Chikungunya, Epítomos, IgA, Imunodiagnóstico, Reatividade Cruzada.

ABSTRACT

The circulation of arboviruses like Chikungunya presents a significant public health challenge, especially in urban areas, where overlapping symptoms complicate clinical diagnosis, highlighting the need for confirmatory laboratory methods. This study aimed to immunologically and structurally characterize chikungunya virus epitopes to develop a more reliable anti-CHIKV IgA immunodiagnostic. To achieve this, 175 blood samples were analyzed from patients with suspected arboviral infections who attended the Urgent Care Center of Beira Mar in Duque de Caxias, Brazil, between January and June 2018. The prevalence of chikungunya was 53.71%, suggesting a local outbreak in the region; the median age of patients was 41 years, with a female predominance (52.07%), and clinically, patients showed a high frequency of moderate to intense arthralgia (96.8%) and arthritis (81.9%). Linear epitope mapping was performed by synthesizing peptides on a cellulose membrane and conducting immunoblotting with sera from chikungunya virus-positive patients, identifying immunoreactive regions in both structural proteins (capsid, E3, E2, E1, and 6K) and non-structural proteins (nsP1 to nsP4). *In silico* analysis using *Basic Local Alignment Search Tool* identified six CHIKV-specific epitopes with no cross-reactivity to other human pathogens: LLSKVPKTDL (nsP1), FGAPNETFPITFGDF (nsP3), LKKLQESASM (nsP4), SAVNKLTMRAPQK, PRRNRKNKKQ, and PKQKKQPPQKKPAQK (all from the capsid protein). Tertiary structure prediction revealed that these epitopes are located in accessible and potentially immunogenic regions. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay assays using these peptides showed that peptides 313 and 318 exhibited the best discriminatory capacity, with Areas under the curve of 0.6825 and 0.6926, respectively, and significant p-values. Both demonstrated a good balance between sensitivity and specificity and a strong Negative Predictive Value, indicating their potential for ruling out the disease, while peptides 314 and 315 showed limited performance. This study significantly contributes to the development of a more sensitive and specific immunodiagnostic, particularly in contexts of viral co-circulation, by highlighting the potential of specific IgA epitopes in both structural and non-structural proteins.

Keywords: Chikungunya, Epitopes, IgA, Immunodiagnosis, Cross-reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Linha temporal da disseminação global do vírus chikungunya.....	05
Figura 2.	Casos prováveis de arboviroses por ano.....	10
Figura 3.	Taxa de letalidade por DEN, CHIK e ZIK no Brasil, 2008 a 2019.....	10
Figura 4.	Número de óbitos por CHIK, segundo faixa etária e sexo, Brasil, 2015 a 2019.....	12
Figura 5.	Taxa de letalidade de CHIK por faixa etária, 2015 a 2019.....	12
Figura 6.	Mediana de idade dos óbitos de CHIK, 2015 a 2019.....	13
Figura 7.	Comorbidades nos óbitos de CHIK, por grupos etários no Brasil, 2015 a 2019....	14
Figura 8.	Curva epidêmica dos casos prováveis de CHIK.	14
Figura 9.	Curva epidêmica dos casos prováveis de CHIK, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, 2019 a 2022.	17
Figura 10.	Taxa de Incidência de CHIK durante a SE 35 no ano de 2022.....	18
Figura 11.	Estrutura Física e Genética do vírus chikungunya	20
Figura 12.	Proteínas Estruturais e Não Estruturais do vírus Chikungunya.....	21
Figura 13.	Ciclo do vírus da chikungunya.....	24
Figura 14.	Evolução Clínica e Sorologia da CHIK.....	28
Figura 15.	Fluxograma da metodologia realizada.....	50
Figura 16.	Interação da IgA humana com as diferentes proteínas estruturais do vírus da	

	chikungunya durante o processo de síntese de peptídeos em membrana de celulose.....	55
Figura 17.	Interação da IgA humana com as diferentes proteínas não estruturais do vírus da chikungunya durante o processo de síntese de peptídeos em membrana de celulose.....	56
Figura 18.	Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp1.....	62
Figura 19.	Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp3.....	62
Figura 20.	Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp4.....	63
Figura 21.	Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína estrutural do Capsídeo.....	63
Figura 22.	Gráficos de box-plot (A-F) que comparam os Índices de Reatividade.....	65
Figura 23.	Gráficos de Curva de Característica de Operação do Receptor (ROC - Receiver Operating Characteristic) individuais (A-F)	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Distribuição dos óbitos confirmados de CHIK por região no Brasil.....	11
Quadro 2.	Comparação do coeficiente de mortalidade de CHIK entre grupos etários (<60 anos e > ou = 60 anos), por ano no Brasil, de 2015 a 2019.....	13
Quadro 3.	Número de casos prováveis e taxa de incidência (/100 mil hab), de DEN, CHIK até a SE 51, e ZIK, por Região e UF no Brasil, 2021.....	16
Quadro 4.	Número de casos prováveis, taxa de incidência (/100 mil hab) e variação de DEN e CHIK até a SE 35 e ZIK até a SE 32, por região e UF, Brasil, 2022.....	19
Quadro 5.	Mediadores imunes associados com a CHIK em humanos.....	31
Tabela 1.	Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK.....	42
Tabela 2.	Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de janeiro a junho/2018.....	53
Tabela 3.	BLAST P (Ferramenta de Busca por Alinhamento Local Básico)	57
Tabela 4.	Resultados estatísticos dos peptídeos analisados.....	73

LISTA DE ABREVIACÕES

95% CI	Intervalo de Confiança de 95%
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
Arbovírus	Arthropod-borne viruses (vírus transmitidos por artrópodes)
AUC	Área Sob a Curva (da Curva ROC)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDTS	Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz
CEP-Unigranrio	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DEN	Dengue
DENV	Vírus da Dengue
DIC	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N'-Dimetilformamida
DO	Densidade Óptica
ECDC	Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
ECSA	Leste e Central Sul Africano (genótipo do CHIKV)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos Positivos
Hab	Habitantes (habitants)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (human virus immunodeficiency)
HOBt	Hidroxibenzotriazol
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDHM	Índice de Desenvolvimento Humano Municipal

IFN-I	Intérferon tipo I
IFN- α	Intérferon alfa
IFN- γ	Interféron gama (Interféron gamma)
IgA	Imunoglobulina A
IgA	Imunoglobulina A (immunoglobulin A)
IgG	Imunoglobulina G
IgG	Imunoglobulina G (immunoglobulin G)
IgM	Imunoglobulina M
IgM	Imunoglobulina M (immunoglobulin M)
IL-10	Interleucina 10 (Interleukin 10)
IL-17	Interleucina 17 (Interleukin 17)
IL-1ra	Receptor Antagonista da interleucina 1 (interleukin-1 receptor antagonist)
IL-1 β	Interleucina 1 beta (Interleukin 1 beta)
IL-2	Interleucina 2 (Interleukin 2)
IL-6	Interleucina 6 (Interleukin 6)
IL-7	Interleucina 7 (Interleukin 7)
IL-8	Interleucina 8 (Interleukin 8)
IOL	Asiático (genótipo do CHIKV)
IR	Índice de Reatividade
LABGEN	Laboratório de Genética da UNIGRANRIO
LBA	Lavado broncoalveolar (bronchoalveolar lavage)
LDH	Desidrogenase Láctica (lactic dehydrogenase)
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos (monocyte chemoattractant protein 1)
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio (Middle East Respiratory Syndrome)
MHCII	Moléculas do complexo de histocompatibilidade 2 (histocompatibility complex 2 molecules)
MIP-1 α	Proteínas Inflamatórias dos Macrófagos 1 alfa (Macrophage Inflammatory Proteins alfa)
MIP-1 β	Proteínas Inflamatórias dos Macrófagos 1 beta
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NHPs	Modelos primatas não humanos
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS-T	Solução de lavagem e bloqueio em ensaios de ELISA
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas (técnica confirmatória para diagnóstico)
PROSUP-CAPES	Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase
SES	Secretaria do Estado de Saúde
Std. Error	Erro Padrão
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCD4+	Linfócito T do grupamento de diferenciação 4 (cluster of differentiation 4 T lymphocyte)
TCD8+	Linfócito T do grupamento de diferenciação 8 (cluster of differentiation 8 T lymphocyte)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
UNIGRANRIO	Universidade do Grande Rio
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
VN	Verdadeiros Negativos
VP	Verdadeiros Positivos
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WA	Oeste Africano (genótipo do CHIKV)
ZIKV	Vírus da Zika

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. HISTÓRICO	4
2.2. EPIDEMIOLOGIA	6
1.1.2.2.1. No mundo	6
1.2.2.2.2. No Brasil	8
2.3. AGENTE ETIOLÓGICO E REPLICAÇÃO VIRAL	20
2.4. CICLO DE TRANSMISSÃO E VETORES	24
2.5. SINAIS, SINTOMAS E EVOLUÇÃO CLÍNICA	27
2.6. FISIOPATOLOGIA E RESPOSTA IMUNE	30
2.7. DIAGNÓSTICO	33
2.8. ANTICORPOS	35
2.9. PROFILAXIA	36
2.10. TRATAMENTO	37
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. ÉTICA DA PESQUISA	41
4.2. ÁREA DO ESTUDO	41
4.3. TRIAGEM CLÍNICA	41
4.4. AMOSTRAS	43
4.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANA E ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	43
4.6. QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DO SINAL	44
4.7. ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> DE REATIVIDADE CRUZADA	44
4.8. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS	45
4.9. PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA	45
4.10. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS	46
4.11. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	44
4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
4.12.1. PREPARAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE COMPARATIVA	47
4.12.2. TESTE DE NORMALIDADE (SHAPIRO-WILK)	47
4.12.3. TESTE NÃO PARAMÉTRICO (MANN-WHITNEY)	47

4.12.4. ANÁLISE DA CURVA ROC.....	48
4.12.5. SELEÇÃO DO PONTO DE CORTE IDEAL	48
4.12.6. CÁLCULO DETALHADO DAS MÉTRICAS DE DESEMPENHO....	48
4.13. VÍNCULO DA PESQUISA	49
5. RESULTADOS	52
5.1. ANÁLISE CLÍNICA	52
5.2. IMMUNOBLOTTING.....	54
5.3. BLAST P.....	57
5.4. ESTRUTURA TERCIÁRIA	62
6. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA).....	63
7. TESTES ESTATÍSTICOS.....	66
7.1. PEPTÍDEO 313	66
7.2. PEPTÍDEO 314	67
7.3. PEPTÍDEO 315	68
7.4. PEPTÍDEO 316.....	70
7.5. PEPTÍDEO 317	71
7.6. PEPTÍDEO 318.....	72
8. DISCUSSÃO	75
9. CONCLUSÕES	80
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
11. ANEXOS	97
11.1 ANEXO I: Adendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) sob CAAE 70324417.1.0000.528 ..	97
11.2. ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) referente à pesquisa proposta.	98
11.3. ANEXO III: Produção Bibliográfica e Artigos Científicos com Participação do Autor.....	100
11.4. ANEXO IV: Programação dos epítomos de aminoácidos para o processo de mapeamento dos epítomos reagentes.....	104
11.5. ANEXO V: Alinhamento das sequências de aminoácidos do CHIKV com vírus do gênero Alphavirus e Flavivírus com utilização do CLUSTAL W.....	110

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus conhecidos como arbovírus (*Arthropod-borne viruses*), termo criado em 1942 para se referir a vírus transmitidos pela saliva contaminada de artrópodes durante o repasto sanguíneo em humanos ou animais. Os arbovírus capazes de infectar humanos pertencem, majoritariamente, a cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. Embora mais de 545 espécies de arbovírus sejam conhecidas, cerca de 150 são sabidamente patogênicas para humanos (LOPES *et al.* 2014; DONALISIO *et al.* 2017; IANI, 2021).

De modo geral, as arboviroses são zoonoses que ocorrem em ambientes silvestres, com maior risco de infecção em indivíduos que mantêm contato direto com os focos naturais desses vírus. Contudo, essas doenças vêm se tornando cada vez mais prevalentes em áreas urbanas. A Dengue (DEN), por exemplo, destaca-se por sua ampla distribuição, recorrência de surtos e associação à introdução de novos sorotipos ou variantes de sorotipos já existentes, o que se apresenta como um caminho similar para a chikungunya (TONELLI e FREIRE, 2000). O crescimento global na incidência de arboviroses tem sido impulsionado pela expansão dos sistemas de transporte, adaptação dos mosquitos vetores ao ambiente urbano, mudanças climáticas e aumento da densidade populacional de vetores e somado a esses fatores, temos a cocirculação de arbovírus (ALVES *et al.* 2025; TEICH *et al.* 2017).

Seus vetores são primariamente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* e sua distribuição geográfica é fortemente influenciada pelo clima local, mas alterações climáticas globais têm potencial para expandir essas áreas de ocorrência, contribuindo para a disseminação das doenças (ALBARRÁN *et al.* 2025). Casos de chikungunya foram relatados em países tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Estudos indicam que a região mais afetada é o Sudeste Asiático, seguido pelo África e as Américas. Nesse cenário, o Brasil configura-se como ambiente propício à presença e à proliferação de mosquitos vetores, o que favorece a circulação contínua de arbovírus (DOS SANTOS *et al.* 2025).

Atualmente, os principais arbovírus em circulação no Brasil são os vírus chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) e zika (ZIKV). O CHIKV pertence à família *Togaviridae*, enquanto o DENV e o ZIKV pertencem à família *Flaviviridae* (GREGIANINI *et al.*, 2017; DONALISIO *et al.*, 2017).

Essas arboviroses representam um importante desafio para a saúde pública, impactando significativamente os sistemas de vigilância e assistência. Os surtos recentes evidenciam a fragilidade das estruturas sanitárias e a insuficiência das medidas de prevenção e controle, demandando investimentos urgentes em estratégias de combate, recursos financeiros e ferramentas diagnósticas adequadas (QUEIROZ *et al.*, 2020).

Os sintomas das arboviroses variam de manifestações leves, como febre, até quadros graves, incluindo complicações hemorrágicas, neurológicas e articulares. A cocirculação de diferentes arbovírus em uma mesma região dificulta o diagnóstico clínico diferencial, sendo comum que casos graves só sejam reconhecidos após ampla disseminação do agente viral. Isso reforça a necessidade de métodos diagnósticos sensíveis e específicos (COSTA *et al.* 2017; CHAHAR *et al.* 2009). O impacto socioeconômico dessas doenças é relevante, principalmente no caso da febre chikungunya (CHIK), cujos sintomas articulares podem persistir por semanas ou meses, comprometendo a capacidade laboral dos indivíduos (SANTANA *et al.* 2021).

O CHIKV é um *Alphavirus* de RNA de fita simples, com genoma de aproximadamente 12 kb, reconhecido por sua capacidade artrítogênica. Sua transmissão ocorre por meio dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. O termo “Chikungunya” deriva de uma língua da Tanzânia e significa “aqueles que se dobram”, em alusão à postura curvada dos pacientes durante a epidemia ocorrida entre 1950 e 1953 (FIOCRUZ, 2015; DE SOUZA, 2019; AGARWAL *et al.* 2025).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de CHIK foram registrados em 2014, nas regiões Norte e Nordeste, configurando um cenário epidemiológico complexo, marcado pela circulação simultânea de DEN, CHIK e ZIK. Essa situação reforça a necessidade de estratégias integradas de vigilância, combate vetorial e diagnóstico eficaz (DA SILVA *et al.* 2018). Três genótipos de CHIK foram identificados no país: Leste, Central e Sul-Africano (ECSA), Asiático e do Oceano Índico (IOL). Os genótipos do oeste africano (WA) e ECSA são endêmicos na África Subsaariana, enquanto o IOL circula em regiões da Ásia e das Américas (SILVA, 2018).

Apesar da reconhecida diversidade genética do vírus chikungunya (CHIKV), até o momento, os estudos científicos não demonstram que os diferentes genótipos da chikungunya causem quadros sintomáticos distintos. A apresentação clínica da doença é amplamente consistente entre as linhagens virais. a principal implicação das variações

genotípicas reside na susceptibilidade e na eficiência de transmissão viral em vetores. A mutação na proteína E1-A226V, presente no genótipo ECSA, é um exemplo primordial dessa adaptação, pois confere ao vírus uma maior capacidade de infecção e disseminação. Essa adaptação vetorial tem sido crucial para a expansão geográfica do CHIKV e a ocorrência de grandes epidemias, mas não implica em uma alteração do perfil sintomático da doença em pacientes humanos (RESCK *et al.*, 2024).

O diagnóstico das arboviroses pode ser realizado por meio da detecção direta do vírus, de seus componentes ou de anticorpos específicos. As metodologias mais empregadas incluem a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), considerada o padrão ouro, e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Apesar da existência de técnicas específicas, o elevado custo e a demanda por testes durante os surtos frequentemente tornam o diagnóstico clínico a principal abordagem (LACEN, 2017; COSTA *et al.* 2017; LICÍNIO e AYRES, 2021).

Os testes sorológicos mais utilizados detectam anticorpos das classes IgM e IgG, indicativos das fases aguda e tardia da infecção, respectivamente. A IgM aparece logo após o início dos sintomas e pode permanecer detectável por semanas ou meses, enquanto a IgG surge posteriormente e pode persistir por anos. No entanto, a imunoglobulina A (IgA) tem se mostrado uma alternativa promissora para o diagnóstico precoce e específico das arboviroses, uma vez que pode ser detectada de forma mais rápida que a IgM e está presente na fase aguda da doença (MORALES *et al.* 2021).

Estudos recentes, como o de Silva *et al.* (2018), investigam o uso de epítomos sintéticos do CHIKV para aprimorar a acurácia dos testes sorológicos, promovendo maior especificidade no diagnóstico diferencial em relação a outras arboviroses. De forma complementar, a pesquisa de De Simone *et al.* (2023) reforça a importância desses epítomos como ferramentas diagnósticas e epidemiológicas.

O aumento da incidência das arboviroses no Brasil tem mobilizado esforços significativos por parte de estados e municípios. Nesse contexto, a investigação científica contínua e o desenvolvimento de exames diagnósticos rápidos, acessíveis e específicos são essenciais para o enfrentamento de novas emergências epidemiológicas. Este estudo propõe a investigação do uso de epítomos sintéticos imunológicos para a detecção de anticorpos anti-CHIKV, com ênfase na IgA, como alternativa diagnóstica mais precisa e eficiente para a saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

O CHIK foi isolado pela primeira vez em 1953, durante um surto inicialmente classificado como DEN, ocorrido na Tanzânia. Desde os primeiros registros, foram identificados dois padrões de transmissão da CHIK: um silvestre, com origem africana e transmissão por mosquitos do gênero *Aedes albopictus*, e outro urbano, predominante na Ásia, com transmissão realizada por *Ae. aegypti*. Dentro desses contextos de transmissão, quatro genótipos de relevância epidemiológica foram descritos: o genótipo da África Oriental, Central e do Sul (ECSA), o genótipo da África Ocidental (WA), genótipo Asiático e do Oceano Índico (IOL) (DONALISIO *et al.* 2015).

Após o isolamento inicial, diversos surtos foram documentados em regiões da África e Ásia, inclusive no subcontinente indiano. A partir de 2004, o CHIKV causou epidemias relevantes no Quênia, nas Ilhas Comores e em La Réunion. Em 2005, o vírus expandiu-se da África Oriental para ilhas do Oceano Índico, importantes destinos turísticos, onde desencadeou grandes surtos urbanos. Ao final desse ano, o CHIKV atingiu o subcontinente indiano, com milhões de pessoas infectadas. Já em 2006, observou-se o início da dispersão viral para outras regiões do globo, como Europa e Américas, por meio de viajantes virêmicos, sendo registrado, por exemplo, um surto na Itália, associado a um viajante procedente da Índia (REZZA *et al.* 2007; VOLK *et al.* 2010).

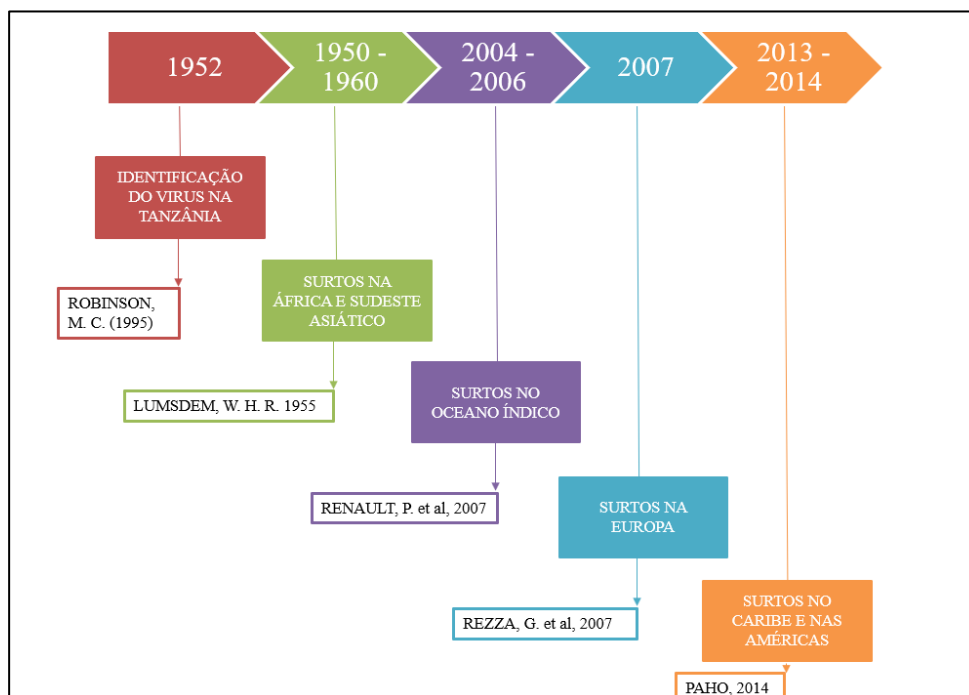
Durante a epidemia nas ilhas do Oceano Índico, muitos turistas infectados retornaram a seus países de origem, contribuindo para a introdução do CHIKV em diversas regiões, incluindo Itália e França. Em alguns desses países, como a Itália, o vetor *Ae. albopictus*, já estava estabelecido há vários anos, com alta densidade populacional. Essa situação gerou preocupação, pois foi demonstrado que a cepa do CHIKV circulante no Oceano Índico apresentava mutações na proteína E1 do envelope viral, no genótipo ECSA, que favoreceram a adaptação ao *Ae. albopictus*. Essa mutação contribuiu para a rápida disseminação do vírus no Oceano Índico e, posteriormente, na Ásia e Europa, desencadeando uma epidemia global sem precedentes (REZZA *et al.* 2007). A introdução do CHIKV nas Américas foi documentada em 2013, com registro de transmissão autóctone no Caribe, mais especificamente na Ilha de Saint Martin. Ainda em dezembro daquele ano, a Ilha da Martinica relatou cerca de 50 casos autóctones.

Em 2014, a transmissão expandiu-se para outras regiões, como Guadalupe, São Bartolomeu, Dominica e Ilhas Virgens Britânicas (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014).

No Brasil, os primeiros casos autóctones da CHIK foram confirmados em 2014, nos municípios de Oiapoque (Amapá) e Feira de Santana (Bahia). A análise genética das amostras identificou duas linhagens distintas: a asiática no Amapá e a ECSA na Bahia (DA SILVA, 2018). Ao final de 2014, foram confirmados 2.772 casos de infecção por CHIKV, distribuídos entre seis Unidades Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1) (HONÓRIO *et al.* 2015).

Durante o período de 2015 a 2018, o Brasil enfrentou um cenário epidemiológico complexo em relação à chikungunya, destacando a co-circulação das linhagens Asiática e ECSA do vírus. O ano de 2016 foi marcado como o pico da epidemia nacional, registrando um número substancial de casos, especialmente na região Nordeste do país. Nesse período, a doença se espalhou rapidamente, afetando diversas áreas e impondo um grande desafio para a saúde pública brasileira, com a linhagem ECSA-Americana demonstrando uma notável expansão para todas as cinco regiões geográficas do Brasil, indicando uma grande problemática relacionada a morbidade e a vigilância epidemiológica em todo o território nacional (MOREIRA *et. Al*, 2023).

Figura 1: Linha temporal da disseminação global do vírus chikungunya



A figura 1 ilustra a progressão temporal e geográfica dos principais eventos de identificação e surtos do vírus Chikungunya (CHIKV) ao longo das décadas. O marco inicial em 1952 assinala a identificação do vírus na Tanzânia (Robinson, M. C., 1955). Nos anos 1950-1960, observa-se a ocorrência de surtos na África e Sudeste Asiático (Lumsden, W. H. 1955). Entre 2004 e 2006, a doença se espalha para o Oceano Índico (Renault, P. *et al*, 2007). A partir de 2007, surtos são registrados na Europa (Rezza, G. *et al*, 2007), culminando, entre 2013 e 2014, em sua disseminação para o Caribe e as Américas (PAHO, 2014).

Após a pandemia de COVID-19, as arboviroses, de maneira geral, perderam ainda mais visibilidade, tanto por parte dos gestores de saúde quanto da população. Este cenário representa um risco significativo, especialmente no contexto brasileiro, em que as ações de controle vetorial, campanhas de prevenção e medidas de vigilância epidemiológica já ocorriam com limitações e baixos investimentos. Com a pandemia, tais atividades foram ainda mais reduzidas. Somando-se a isso as condições climáticas e os períodos chuvosos, há maior risco de reemergência dos surtos, seja pelo aumento real de casos, seja pelo incremento nas notificações, que haviam diminuído em função das restrições sanitárias (CAVALCANTE *et al*. 2025).

Diante desse panorama, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de métodos diagnósticos rápidos, sensíveis, específicos e de menor custo, que possam ser amplamente utilizados em serviços de saúde, contribuindo para o enfrentamento oportuno e eficaz da CHIK.

2.2. EPIDEMIOLOGIA

2.2.1. No mundo

A epidemiologia da CHIK no cenário global é frequentemente apresentada em forma de histórico, dada a dificuldade de acesso a dados atualizados e, possivelmente, pela subnotificação associada à negligência por parte de autoridades e unidades de saúde. A literatura registra os primeiros surtos da CHIK entre 1952 e 1953, na Tanzânia, com recorrência de epidemias nas cinco décadas seguintes em regiões da África e Ásia. A partir de 2004, um surto no Quênia propagou-se rapidamente para ilhas do Oceano Índico. Nos dois anos subsequentes, mais de 500 mil casos foram notificados na Ilha da Reunião, onde mais de um terço da população foi infectada. A epidemia então se espalhou por outras regiões, com destaque para a Índia, onde aproximadamente 1,5 milhão de pessoas foram acometidas. A transmissão também foi registrada em países como Indonésia,

Maldivas, Sri Lanka, Mianmar e Tailândia (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, RESCK *et al.* 2024).

Em 2007, foi registrado o primeiro surto da CHIK na Europa, com cerca de 197 casos no nordeste da Itália, confirmando a capacidade de transmissão do vírus pelo vetor *Ae. albopictus* no continente. Em 2010, o vírus seguiu sua expansão, atingindo novos territórios como Taiwan e Estados Unidos, além de causar surtos recorrentes no Sudeste Asiático e na Ilha da Reunião (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, LINDH *et al.* 2018).

O primeiro caso de transmissão autóctone nas Américas foi documentado em 2013, na ilha de Saint Martin. Nesse mesmo ano, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) notificou 72 casos em países como França, Reino Unido e Alemanha. Em 2014, a Europa vivenciou seu maior surto histórico da CHIK, com quase 1.500 casos, principalmente na França e no Reino Unido. A França registrou, ainda, quatro casos de transmissão local no sul do país. Simultaneamente, vários surtos foram relatados em ilhas do Pacífico, como Ilhas Cook, Ilhas Marshall, Samoa, Samoa Americana, Polinésia Francesa e Kiribati. Ao final daquele ano, mais de 1 milhão de casos suspeitos haviam sido notificados à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, DE SOUZA *et al.* 2024).

Em 2015, o ECDC relatou uma redução no número de casos de CHIK na Europa (624 casos), em comparação com 2014. No Senegal, onde não havia registros desde 2010, a circulação ativa do vírus foi confirmada pelo Escritório Regional Africano da OMS (AFRO). Nas Américas, foram notificados 693.489 casos suspeitos e 37.480 casos confirmados, com destaque para a Colômbia, que concentrou 359.079 casos suspeitos, número inferior ao ano anterior (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, LIU *et al.* 2025).

Em 2016, a OPAS recebeu notificações de 349.936 casos suspeitos e 146.914 confirmados laboratorialmente, sendo o Brasil, Bolívia e Colômbia os países com maior número de casos, totalizando cerca de 300 mil casos suspeitos. A Argentina relatou sua primeira transmissão autóctone de CHIK, com mais de mil casos suspeitos. No Quênia, um surto atingiu cerca de 1.700 pessoas. Na Índia, foram registrados aproximadamente 65 mil casos, enquanto na Europa os números permaneceram abaixo de 500 (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, LIU *et al.* 2025).

Em 2017, o ECDC relatou ocorrências da CHIK em 10 países, com aproximadamente 548 casos, dos quais 84% foram confirmados. França e Itália voltaram

a apresentar transmissão autóctone, reforçando a relevância epidemiológica da doença nesses países. A Ásia e as Américas seguiram como as regiões mais afetadas. O Paquistão enfrentou um surto com cerca de 9 mil casos, e a Índia, cerca de 62 mil. Nas Américas e Caribe, foram notificados 185 mil casos, dos quais mais de 90% ocorreram no Brasil, o que acendeu um alerta nacional para o risco de novos surtos. Entre 2018 e 2020, surtos de CHIK foram registrados no Sudão (2018), Iêmen (2019), Camboja e Chade (2020) (OMS, 2020; IREKEOLA *et al.* 2022, LINDH *et al.*, 2018).

Os dados, de outubro de 2022, apontam 338.592 casos e 70 óbitos. O Brasil foi responsável por 240.344 casos, seguido pela Índia (93.113), Guatemala (1.434), Tailândia (775) e Malásia (662). Quanto aos óbitos, 68 foram registrados no Brasil, 1 no Quênia e 1 nas Filipinas. Em relação à última atualização, houve um acréscimo de aproximadamente 35 mil casos e 10 mortes, indicando uma tendência de novos surtos, sobretudo no Brasil (ECDC, 2022).

2.2.2. No Brasil

No Brasil, o CHIKV é transmitido principalmente pelo vetor *Ae. aegypti*, típico de ambientes urbanos nas regiões tropicais do país. No entanto, há relatos de transmissão também pelo *Ae. albopictus*, especialmente em áreas rurais. Esse vetor tem demonstrado crescente adaptação a ambientes urbanos e periurbanos, o que eleva significativamente o risco de novos surtos de CHIK (CUNHA e TRINTA, 2017).

Como mencionado anteriormente, os primeiros casos da CHIK no Brasil ocorreram no município de Oiapoque, no estado do Amapá, sucedendo a epidemia registrada no Caribe em 2013. Estudos demonstram que duas cepas distintas foram introduzidas no país: a cepa asiática, detectada inicialmente em Oiapoque, e a cepa africana do genótipo ECSA, identificada em um surto ocorrido em Feira de Santana, Bahia (MARTINS *et al.* 2020).

Durante o ano de 2014, foram confirmados 2.772 casos de infecção pelo CHIKV, distribuídos em seis Unidades Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). Ao final desse ano, o Ministério da Saúde já havia registrado 3.657 casos autóctones (HONÓRIO *et al.* 2015). Em 2015, foram notificados aproximadamente 17.765 casos autóctones, sendo 735 no Amapá, relacionados à linhagem asiática, e 778 na Bahia, relacionados à linhagem africana (BRASIL, 2015).

No ano de 2016, o Brasil registrou 271.824 casos prováveis da CHIK, com uma taxa de incidência de 133,0 casos por 100 mil habitantes; desses, 151.318 (55,7%) foram confirmados. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (415,7/100 mil hab.), com destaque para os estados do Rio Grande do Norte (723,1), Ceará (537,7), Pernambuco (522,3), Alagoas (514,8) e Paraíba (503,0). Até o final desse ano, foram confirmados 196 óbitos por CHIK, distribuídos entre os seguintes estados: Pernambuco (58), Rio Grande do Norte (37), Paraíba (34), Ceará (26), Rio de Janeiro (13), Alagoas (10), Maranhão (8), Bahia (5), Sergipe (2), Piauí (1), Amapá (1) e Distrito Federal (1) (BRASIL, 2016).

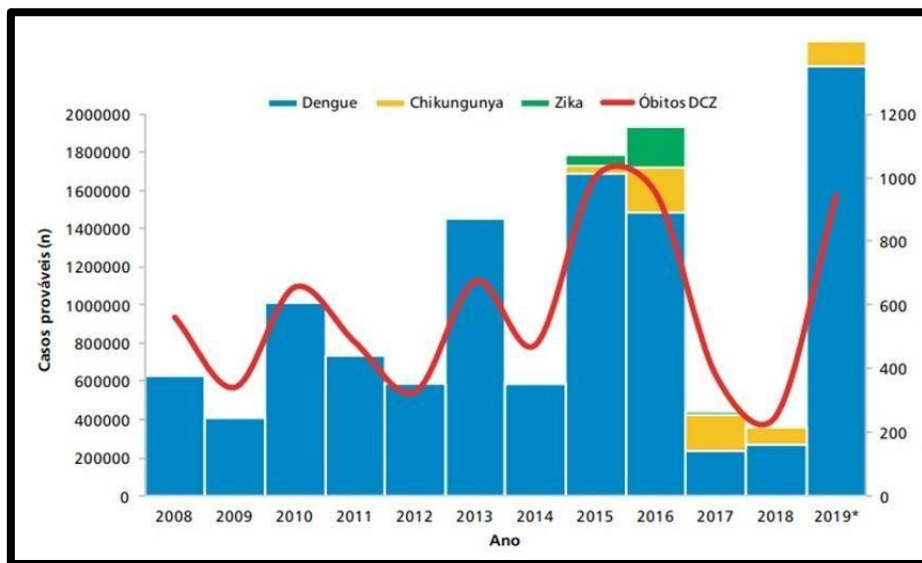
Em 2017, a região Nordeste manteve o maior número de casos prováveis (130.910; 76,1%), seguida pelas regiões Sudeste (22.789; 13,3%), Norte (14.888; 8,7%), Centro-Oeste (3.081; 1,8%) e Sul (262; 0,2%). No mesmo ano, destacaram-se o Ceará (1.187,4 casos/100 mil hab.) e Roraima (673,2 casos/100 mil hab.) em termos de incidência. Houve também a confirmação de 99 óbitos por CHIK, com maior concentração nos meses de abril (25,3%) e maio (34,3%) (BRASIL, 2017).

Já em 2018, a região Sudeste concentrou a maioria dos casos prováveis (38.661; 59,1%), seguida pelas regiões Centro-Oeste (13.450; 20,6%), Nordeste (8.488; 13,0%), Norte (4.570; 7,0%) e Sul (226; 0,3%) (BRASIL, 2018).

Em 2019, ano marcado pelo início da pandemia de COVID-19, foram notificados 129.349 casos prováveis de CHIK no país, com uma taxa de incidência de 61,6 casos por 100 mil habitantes. As regiões Sudeste e Nordeste foram as mais afetadas (SES, 2019).

As arboviroses têm se consolidado como um dos principais desafios de saúde pública no Brasil. O cenário epidemiológico nacional é marcado pela circulação simultânea dos quatro sorotipos do DENV, além da cocirculação do CHIKV (a partir de 2014) e do ZIKV (a partir de 2015), contribuindo para o aumento da morbimortalidade associada a essas infecções. De acordo com o Boletim Epidemiológico nº 33, entre 2008 e 2019 foram notificados mais de 11,6 milhões de casos de arboviroses no Brasil, com mais de 7 mil óbitos confirmados. Embora a DEN represente a maior carga de casos, não se pode negligenciar o impacto de CHIK e ZIK, especialmente em virtude das complicações tardias que podem ser observadas, como será discutido neste estudo. Conforme apresentado na Figura 2, os anos com maior número de casos de arboviroses foram 2015, 2016 e 2019 (BRASIL, 2020).

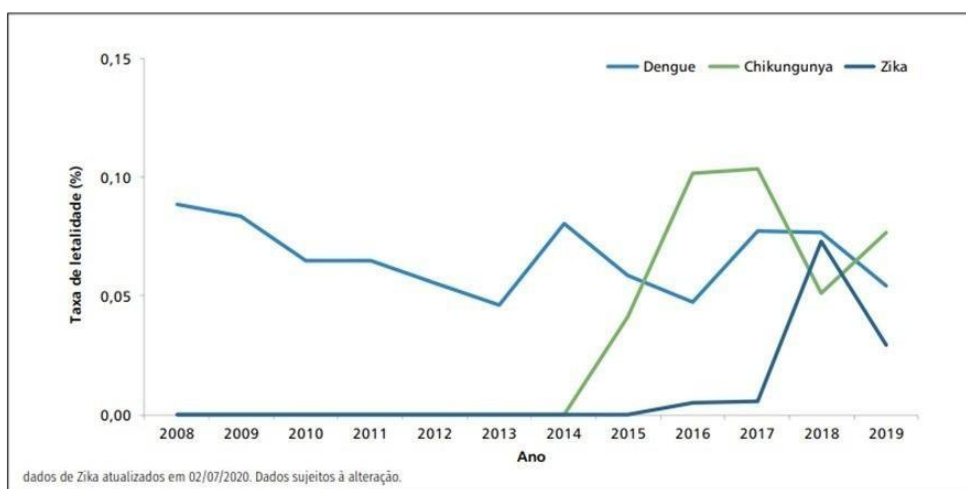
Figura 2. Casos prováveis de arboviroses por ano.



Fonte: Sinan Net e Online/ IBGE – atualizado em 02/07/2022.

De acordo com a Figura 3, observa-se que as maiores taxas de letalidade por CHIK ocorreram nos anos de 2016 e 2017. Para o cálculo da letalidade, foi considerada a proporção entre o número de óbitos confirmados e o total de casos prováveis notificados (BRASIL, 2020).

Figura 3. Taxa de letalidade por DEN, CHIK e ZIK no Brasil, 2008 a 2019.



Fonte: Sinan Net e Online/IBGE – atualizado em 02/07/2020.

Entre 2015 e 2019, foram confirmados 593 óbitos por CHIK com base em critério laboratorial. Em 2019, os óbitos foram confirmados tanto por critérios laboratoriais quanto clínico-epidemiológicos. Embora casos tenham sido registrados em todas as regiões do país, 96% dos óbitos ocorreram nas regiões Nordeste e Sudeste (Quadro 1) (BRASIL, 2020).

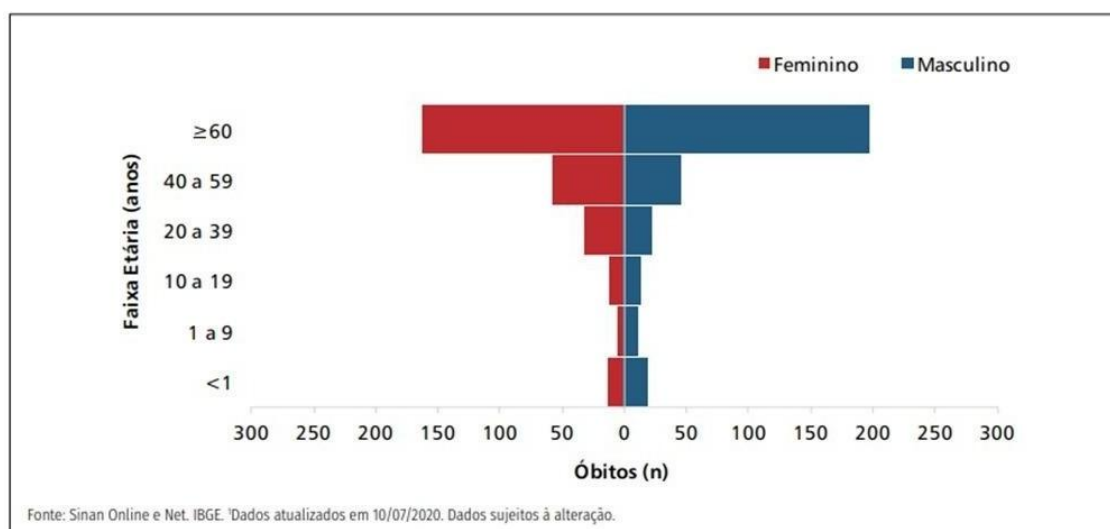
Quadro 1: Distribuição dos óbitos confirmados de CHIK por região no Brasil.

Região	Óbitos confirmados					Total
	2015	2016	2017	2018	2019	
Norte	0	1	7	1	0	9
Nordeste	11	219	162	13	30	435
Sudeste	5	17	21	22	70	135
Sul	0	0	0	1	0	1
Centro Oeste	0	2	2	8	1	13
Brasil	16	239	192	45	101	593

Fonte: Sinan Net e Online – atualizado em 10/07/2020

Entre 2015 e 2019, foram confirmados 593 óbitos por CHIK. Esses óbitos ocorreram em indivíduos de ambos os sexos, com 51% no sexo masculino e 49% no sexo feminino, indicando a ausência de predileção viral por gênero. A análise estratificada por faixa etária e sexo revelou distribuição dos óbitos em todas as faixas etárias, com maior concentração entre indivíduos de 40 a 59 anos e com 60 anos ou mais. Nas faixas de 20 a 39 anos e de 40 a 59 anos, observou-se ligeira predominância do sexo feminino. Tal padrão pode estar relacionado a fatores comportamentais, como o uso de vestimentas mais expostas em regiões de clima quente, o que aumenta a suscetibilidade à picada do vetor (Figura 4) (BRASIL, 2020).

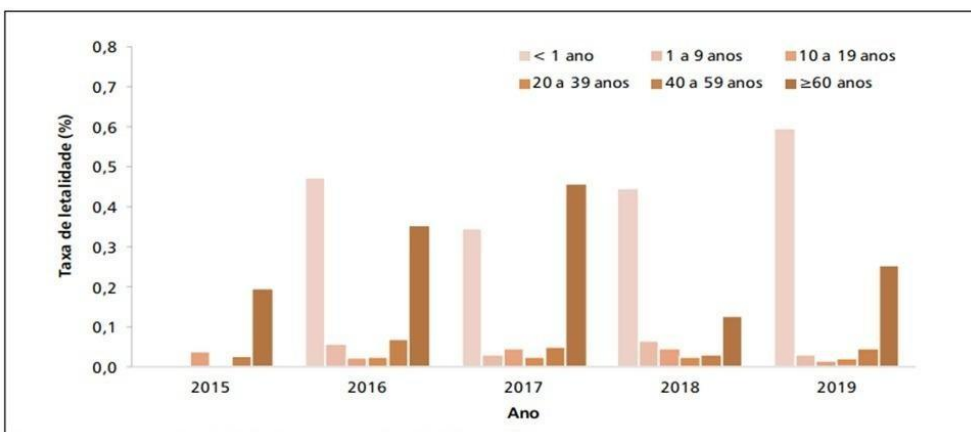
Figura 4: Número de óbitos por CHIK, segundo faixa etária e sexo, Brasil, 2015 a 2019.



Fonte: Sinan Online e Net/IBGE – atualizado em 10/07/2020.

Em relação à taxa de letalidade causada pela CHIK, observa-se maior letalidade em crianças menores de 1 ano e em indivíduos com 60 anos ou mais, em todos os anos analisados até 2019 (Figura 5) (BRASIL, 2020). O coeficiente de mortalidade também foi consistentemente mais elevado na população com 60 anos ou mais ao longo de todo o período. Ao comparar o risco de morte por CHIK entre indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos e aqueles com menos de 60 anos, verifica-se que o risco relativo foi maior no grupo mais idoso em todos os anos avaliados, sendo 2015 o ano com o maior risco registrado (Quadro 2) (BRASIL, 2020).

Figura 5. Taxa de letalidade de CHIK por faixa etária, 2015 a 2019



Fonte: Sinan Online e Net/IBGE – atualizados em 10/07/2020.

Quadro 2. Comparação do coeficiente de mortalidade de CHIK entre grupos etários (<60 anos e > ou = 60 anos), por ano no Brasil, de 2015 a 2019.

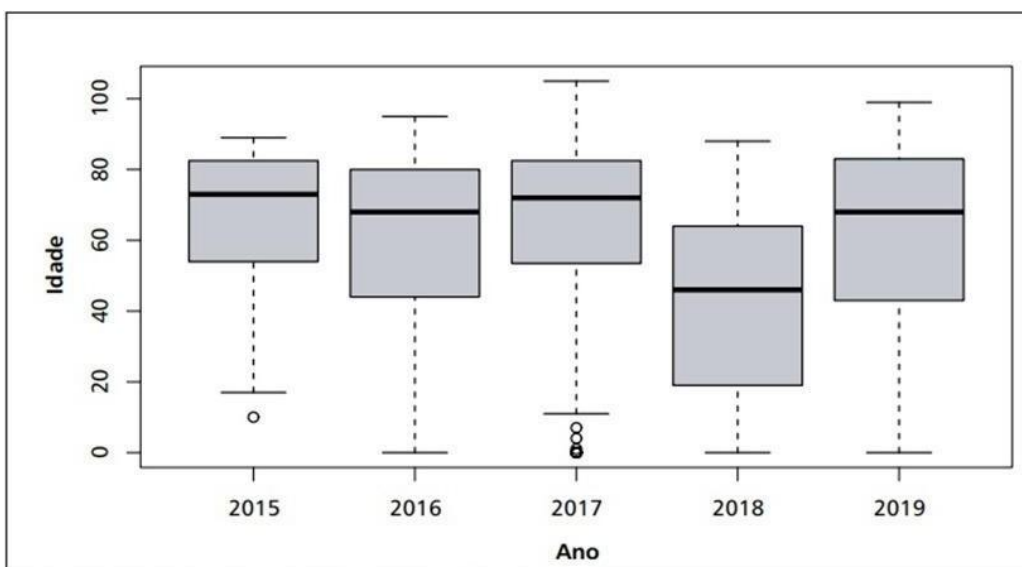
Ano	<60 anos		≥ 60 anos		RR
	Óbitos confirmados	Coef. de mortalidade	Óbitos confirmados	Coef. de mortalidade	
2015	4	0,00	11	0,05	20,7
2016	98	0,05	142	0,57	10,5
2017	63	0,03	129	0,50	14,3
2018	27	0,01	18	0,07	4,5
2019	41	0,02	60	0,21	9,5

Mortalidade (número de óbitos confirmados dividido pela população x 100.000).
Risco Relativo (razão entre os coeficientes de mortalidade ≥60 anos e <60 anos).

Fonte: Sinan Online e Net/IBGE – atualizados em 10/07/2020

A mediana de idade dos óbitos por CHIK no Brasil variou ao longo do período analisado, mantendo-se, na maioria dos anos, acima de 65 anos. A exceção foi observada em 2018, quando a mediana de idade dos óbitos foi de 46 anos (Figura 6) (BRASIL, 2020).

Figura 6: Mediana de idade dos óbitos de CHIK, 2015 a 2019.

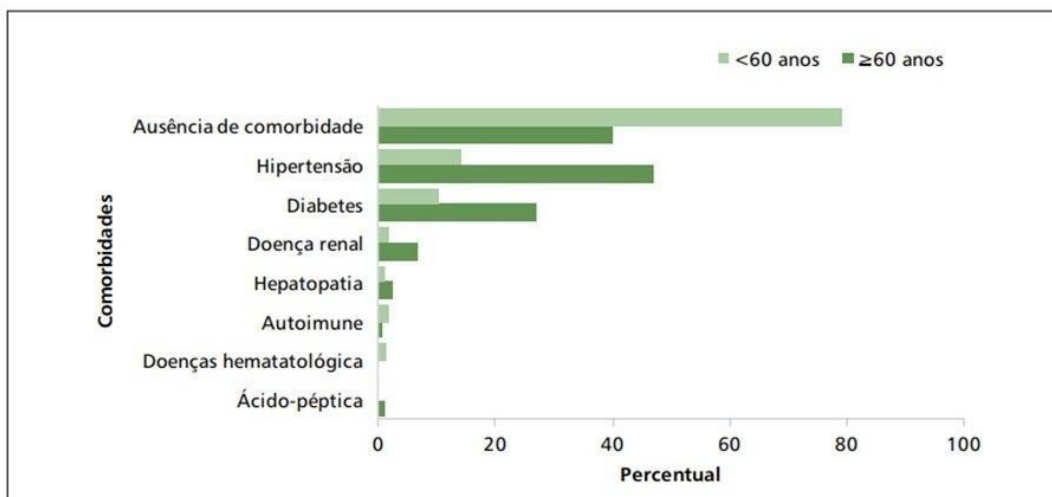


Fonte: Fonte: Sinan Online e Net/IBGE – atualizados em 10/07/2020.

Para finalizar a análise do período de 2014 a 2019, observa-se que as comorbidades mais frequentemente associadas aos óbitos por CHIK foram hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus. Contudo, a ausência de comorbidades foi registrada em 79% dos óbitos de indivíduos com menos de 60 anos e em 40% daqueles com 60 anos

ou mais. Esses dados sugerem que, embora as comorbidades possam representar fatores de risco adicionais, a CHIK apresenta potencial letal mesmo na ausência de condições clínicas preexistentes (Figura 7) (BRASIL, 2020).

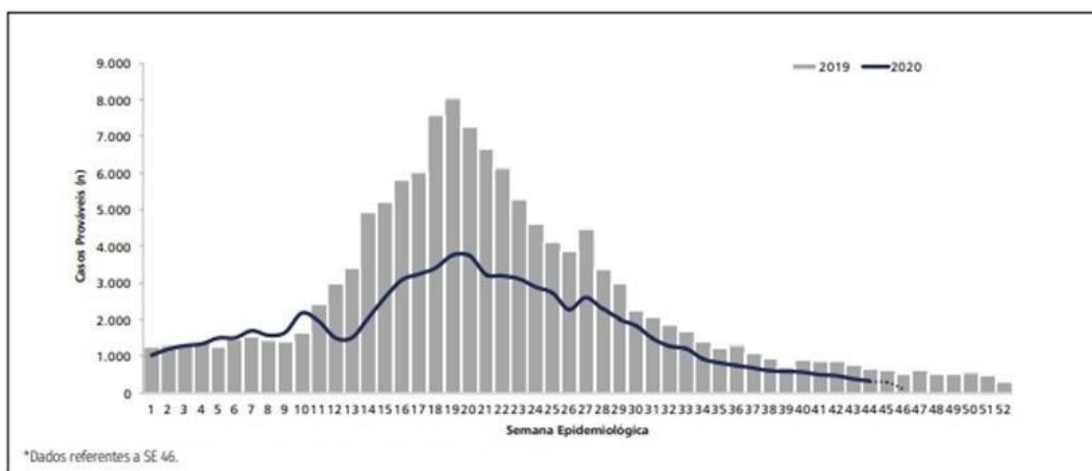
Figura 7. Comorbidades nos óbitos de CHIK, por grupos etários no Brasil, 2015 a 2019.



Fonte: Sinan Online e Net/IBGE – atualizados em 10/07/2020

Até a semana epidemiológica (SE) 46 de 2020, foram notificados 78.808 casos prováveis de CHIK no Brasil, correspondendo a uma taxa de incidência de 37,5 casos por 100 mil habitantes. As regiões Nordeste e Sudeste apresentaram novamente as maiores taxas de incidência, com 99,4 e 22,7 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (Figura 8) (SVS, 2020).

Figura 8: Curva epidêmica dos casos prováveis de CHIK.



Fonte: Sinan Online – atualizado em 11/11/2020.

Em 2020, foram confirmados 25 óbitos por CHIK por critério laboratorial e 19 por critério clínico. Até a SE 26, 18 óbitos (72%) haviam sido confirmados, com distribuição nos estados da Bahia, Paraíba, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Mato Grosso.

Em 2021, foram registrados 95.852 casos prováveis de CHIK no Brasil, resultando em uma taxa de incidência de 44,9 casos por 100 mil habitantes, o que representa um aumento de 32,6% em relação ao ano anterior. A Região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (115,2 casos/100 mil habitantes), seguida das regiões Sudeste (29,3 casos/100 mil habitantes) e Centro-Oeste (7,6 casos/100 mil habitantes) (Quadro 3) (BRASIL, 2021).

Quadro 3. Número de casos prováveis e taxa de incidência (/100 mil hab), de DEN, CHIK até a SE 51, e ZIK, por Região e UF no Brasil, 2021.

Região/UF	Dengue SE 51		Chikungunya SE 51		Zika SE 47	
	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)
Norte	38.768	205,0	1.298	6,9	663	3,51
Rondônia	2.185	120,4	144	7,9	59	3,3
Acre	14.456	1.594,0	246	27,1	266	29,3
Amazonas	8.478	198,5	168	3,9	108	2,5
Roraima	131	20,1	47	7,2	28	4,3
Pará	4.650	53,0	256	2,9	50	0,6
Amapá	270	30,8	81	9,2	51	5,8
Tocantins	8.598	534,9	356	22,1	101	6,3
Nordeste	132.877	230,4	66.430	115,2	4.536	7,9
Maranhão	1.269	17,7	197	2,8	70	1,0
Piauí	3.534	107,4	228	6,9	56	1,7
Ceará	36.005	389,6	1.308	14,2	387	4,2
Rio Grande do Norte	4.276	120,1	4.744	133,2	408	11,5
Paraíba	15.922	392,2	10.374	255,5	1.448	35,7
Pernambuco	38.679	399,8	31.828	329,0	566	5,9
Alagoas	7.268	216,0	492	14,6	196	5,8
Sergipe	1.339	57,3	3.363	143,8	452	19,3
Bahia	24.585	164,1	13.896	92,7	953	6,4
Sudeste	192.988	215,3	26.231	29,3	510	0,6
Minas Gerais	23.046	107,6	5.640	26,3	97	0,5
Espírito Santo ¹	8.263	201,1	1.630	39,7	276	6,7
Rio de Janeiro	2.843	16,3	549	3,1	58	0,3
São Paulo	158.836	340,5	18.412	39,5	79	0,2
Sul	67.066	220,6	627	2,1	110	0,4
Paraná	36.693	316,4	193	1,7	14	0,1
Santa Catarina	19.886	271,0	116	1,6	28	0,4
Rio Grande do Sul	10.487	91,5	318	2,8	68	0,6
Centro-Oeste	103.044	616,8	1.266	7,6	324	1,9
Mato Grosso do Sul	11.193	394,2	181	6,4	57	2,0
Mato Grosso	21.150	592,9	195	5,5	222	6,2
Goiás	55.504	770,2	680	9,4	33	0,5
Distrito Federal	15.197	491,1	210	6,8	12	0,4
Brasil	534.743	250,7	95.852	44,9	6.143	2,9

Fonte: Sinan Online – atualizado em 27/12/2021.

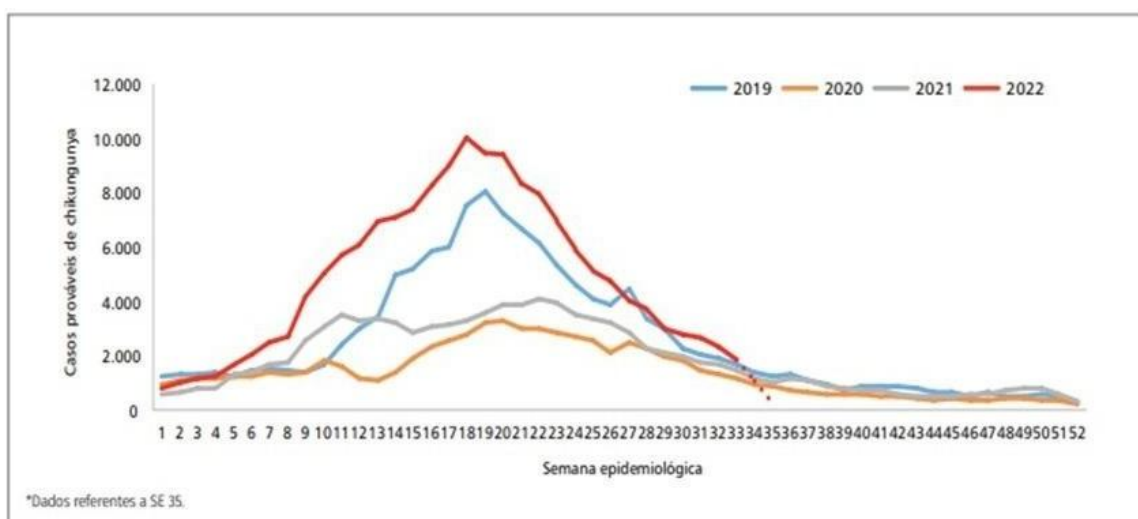
Até a SE 35 de 2022, foram notificados 162.407 casos prováveis de CHIK no Brasil, correspondendo a uma taxa de incidência de 76,1 casos por 100 mil habitantes. Em comparação ao mesmo período de 2019, observou-se um aumento de 35,8% no número de casos, e, em relação a 2021, o aumento foi de 89,4% (Figura 9). No ano de 2022, a Região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência (243,7 casos/100 mil

habitantes), seguida pelas regiões Centro-Oeste (34,2 casos/100 mil habitantes) e Norte (25,3 casos/100 mil habitantes).

Os municípios com os maiores registros de casos prováveis de CHIK até a respectiva semana foram: Fortaleza/CE, com 18.375 casos (679,7 casos/100 mil habitantes); Maceió/AL, com 4.331 casos (419,8 casos/100 mil habitantes); Brejo Santo/CE, com 3.625 casos (7.221,8 casos/100 mil habitantes); Crato/CE, com 3.389 casos (2.530,7 casos/100 mil habitantes); Salgueiro/PE, com 3.006 casos (4.883,0 casos/100 mil habitantes); Juazeiro do Norte/CE, com 2.885 casos (1.036,8 casos/100 mil habitantes); e Petrolina/PE, com 2.741 casos (762,7 casos/100 mil habitantes).

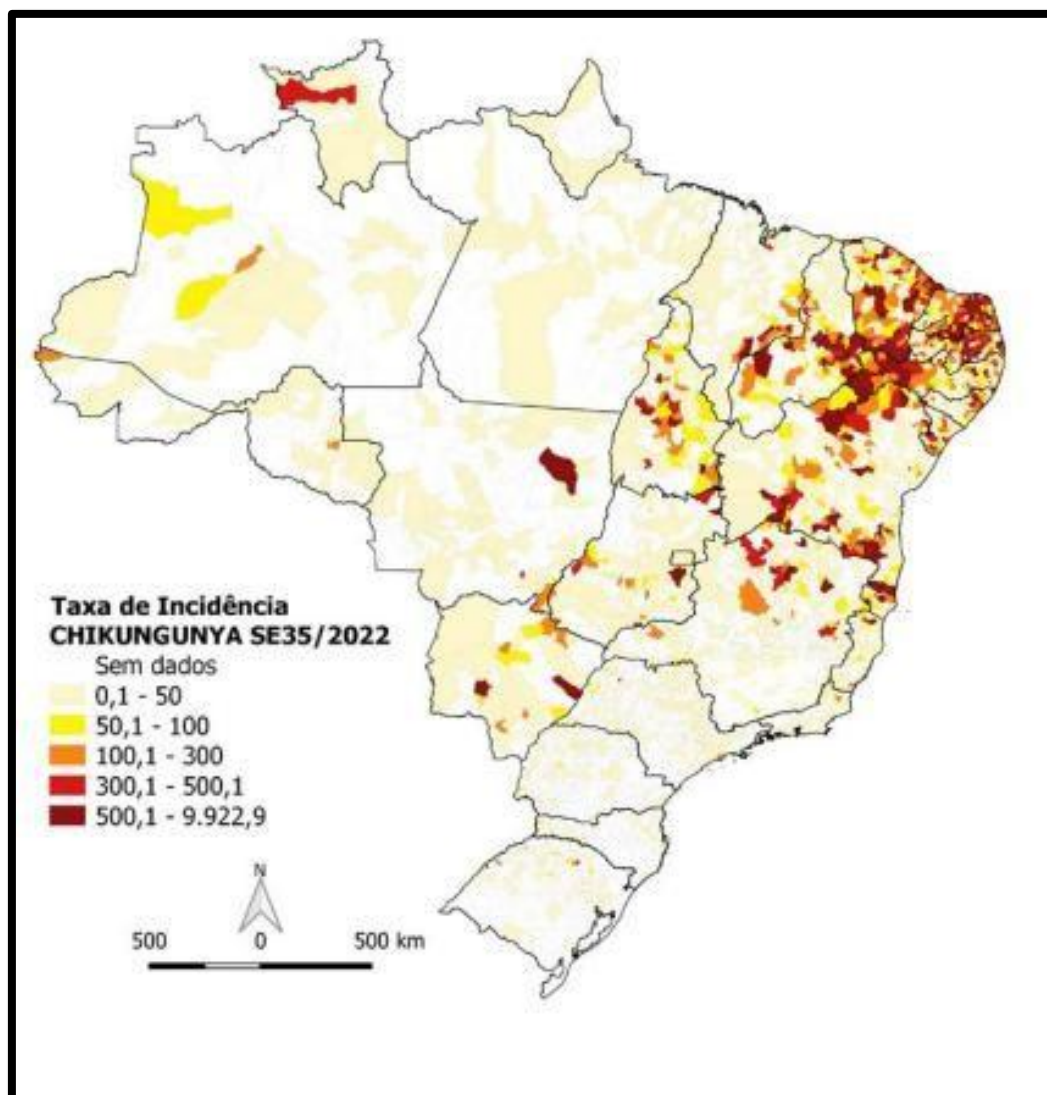
Até o momento, foram confirmados 64 óbitos por CHIK no país, sendo que o estado do Ceará concentrou 46% (30) desses óbitos. Ressalta-se que 45 óbitos permanecem em investigação (Figura 10 e Quadro 4) (BRASIL, 2022).

Figura 9. Curva epidêmica dos casos prováveis de CHIK, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, 2019 a 2022.



Fonte: Sinan Online – atualizado em 05/09/2022.

Figura 10. Taxa de Incidência de CHIK durante a SE 35 no ano de 2022



Fonte: Sinan Online - atualizado em 05/09/2022.

Quadro 4. Número de casos prováveis, taxa de incidência (/100 mil hab) e variação de DEN e CHIK até a SE 35 e ZIK até a SE 32, por região e UF, Brasil, 2022.

Região/UF	Dengue SE 35		Chikungunya SE 35		Zika SE 32	
	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)
Norte	43.037	227,6	4.784	25,3	561	2,97
Rondônia	10.408	573,4	163	9,0	35	1,9
Acre	2.868	316,3	61	6,7	8	0,9
Amazonas	2.734	64,0	147	3,4	199	4,7
Roraima	41	6,3	80	12,3	6	0,9
Pará	5.651	64,4	299	3,4	73	0,8
Amapá	192	21,9	29	3,3	19	2,2
Tocantins	21.143	1.315,4	4.005	249,2	221	13,7
Nordeste	229.778	398,5	140.513	243,7	8.411	14,6
Maranhão	6.403	89,5	2.044	28,6	327	4,6
Piauí	24.626	748,7	8.996	273,5	205	6,2
Ceará	42.972	465,0	49.307	533,6	663	7,2
Rio Grande do Norte	40.039	1.124,4	13.530	380,0	4.018	112,8
Paraíba	27.950	688,4	18.131	446,6	881	21,7
Pernambuco	21.950	226,9	19.889	205,6	510	5,3
Alagoas	28.084	834,5	8.165	242,6	681	20,2
Sergipe	5.019	214,6	3.512	150,2	148	6,3
Bahia	32.735	218,4	16.939	113,0	978	6,5
Sudeste	443.101	494,4	10.731	12,0	452	0,5
Minas Gerais	85.502	399,3	7.218	33,7	78	0,4
Espírito Santo ¹	7.618	185,4	1.085	26,4	250	6,1
Rio de Janeiro	10.112	57,9	607	3,5	34	0,2
São Paulo	339.869	728,6	1.821	3,9	90	0,2
Sul	309.513	1.018,0	659	2,2	226	0,7
Paraná	156.699	1.351,1	280	2,4	19	0,2
Santa Catarina	86.286	1.175,8	148	2,0	50	0,7
Rio Grande do Sul	66.528	580,2	231	2,0	157	1,4
Centro-Oeste	311.984	1.867,3	5.720	34,2	266	1,6
Mato Grosso do Sul	21.763	766,5	741	26,1	42	1,5
Mato Grosso	32.754	918,2	303	8,5	140	3,9
Goiás	195.202	2.708,7	4.131	57,3	70	1,0
Distrito Federal	62.265	2.012,2	545	17,6	14	0,5
Brasil	1.337.413	627,0	162.407	76,1	9.916	4,6

Fonte: Sinan Online - atualizado em 05/09/2022.

Os dados mais recentes evidenciam um aumento progressivo no número de casos de CHIK em comparação aos anos anteriores, especialmente durante o período da pandemia de COVID-19. Esse cenário sugere que a emergência sanitária global contribuiu para a negligência no enfrentamento das arboviroses, com impacto direto na

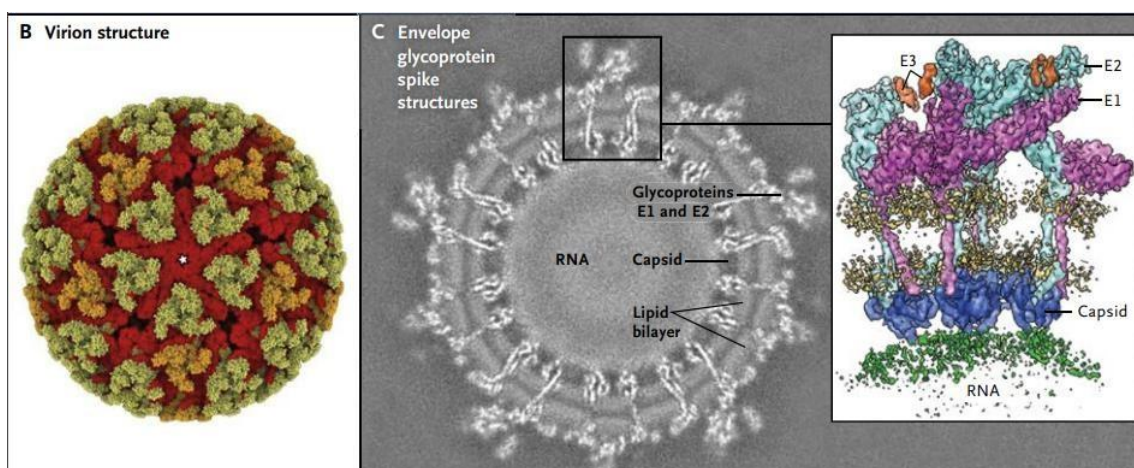
vigilância, prevenção e controle dessas doenças. A redução nas ações de combate ao +vetor, a diminuição das estratégias preventivas e as falhas nos sistemas de notificação podem ter favorecido esse aumento expressivo de casos, acendendo um alerta não apenas para o ano de 2022, mas também para os anos subsequentes.

2.3. AGENTE ETIOLÓGICO E REPLICAÇÃO VIRAL

O CHIKV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, e integra o complexo antigênico da Floresta Semliki, que inclui outros vírus como Mayaro, O'Nyong-nyong e Ross River, todos com potencial para causar infecções em humanos (CUNHA e TRINTA, 2017). O CHIKV apresenta genoma de RNA de fita simples com sentido positivo (+ssRNA) e é classificado como um vírus de pequeno porte, com diâmetro variando entre 60 e 70 nm. A partícula viral possui morfologia esférica, composta por 240 cópias de proteínas do capsídeo e envolta por um envelope lipídico.

O genoma do CHIKV possui cerca de 11 kb de comprimento, sendo aproximadamente 7 kb responsáveis pela codificação de quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), envolvidas na replicação viral, e cerca de 4 kb destinados à codificação de cinco proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope 1 (E1), envelope 2 (E2), E3 e 6K (NGUYEN *et al.* 2015) (Figura 11).

Figura 11. Estrutura Física e Genética do vírus chikungunya



Fonte: WEAVER e LECUIT (2015).

Dessa forma, aproximadamente dois terços do genoma do CHIKV, localizados na extremidade 5', apresentam uma estrutura de capeamento de RNA composta por uma 7-

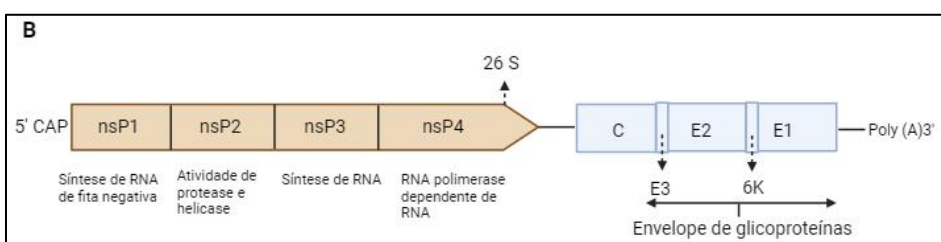
metilguanossina (cap 5'), que precede a região codificadora de uma poliproteína precursora não estrutural. Esta poliproteína é posteriormente clivada em quatro proteínas não estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (Figura 11), todas diretamente envolvidas nos processos de replicação viral.

A proteína nsP1 atua como uma enzima citoplasmática com atividade de capeamento do RNA viral e participa na síntese da fita negativa durante a replicação. A nsP2 possui dois domínios funcionais, com atividades de helicase e protease, além de desempenhar papel crucial no desligamento da transcrição da célula hospedeira. A nsP3 é essencial para a síntese de RNA de fita negativa, e a nsP4 atua como uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), catalisando a replicação do genoma viral.

Na extremidade 3' do genoma, encontra-se uma cauda de poliadenilato (poli-A), precedida por um subgenoma que dá origem ao mRNA 26S, responsável pela tradução das proteínas estruturais do CHIK (Figura 12). Esse mRNA codifica a poliproteína estrutural, posteriormente processada em cinco componentes: as glicoproteínas de envelope E1 e E2, a proteína do capsídeo (C) e os peptídeos menores E3 e 6K. A superfície viral é caracterizada por espículas (picos) compostas por trímeros de heterodímeros formados pelas glicoproteínas E1 e E2, ancoradas na bicamada lipídica do envelope viral. A glicoproteína E2 está exposta na superfície viral e desempenha papel central na interação com receptores celulares, promovendo a adesão do vírus à célula hospedeira. Já a E1 atua como proteína de fusão, facilitando a entrada do vírus por meio da fusão da membrana viral com a membrana da célula alvo.

Importante destacar que a glicoproteína E2 contém epítomos imunogênicos reconhecidos por anticorpos neutralizantes durante a infecção. Dessa forma, os epítomos localizados na E2 têm sido amplamente investigados como potenciais alvos para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e de vacinas contra o CHIK (DEEBA *et al.*, 2016).

Figura 12: Proteínas Estruturais e Não Estruturais do vírus chikungunya.



Fonte: WEAVER & LECUIT (2015).

Diversos tipos celulares podem ser infectados pelo CHIKV, incluindo células endoteliais, epiteliais, macrófagos derivados de monócitos e fibroblastos primários. O ciclo de replicação viral tem início com a entrada do vírus na célula hospedeira por meio de endocitose mediada por receptores de membrana. A acidificação do endossomo induz alterações conformacionais nas proteínas do envelope viral, promovendo a fusão da membrana do CHIKV com a membrana endossomal e permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma.

A replicação do genoma viral se inicia com a tradução de um RNA mensageiro (mRNA) que origina uma poliproteína não estrutural, posteriormente clivada nas proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. Estas proteínas formam o complexo de replicação viral, responsável pela síntese de uma fita de RNA negativa que servirá como molde para a produção dos RNAs genômico (49S) e subgenômico (26S). O RNA subgenômico é responsável por direcionar a tradução da poliproteína estrutural (C-E3-pE2-6K-E1), que é processada por uma serina protease autolítica para gerar as proteínas estruturais do vírus.

A montagem do nucleocapsídeo ocorre no citoplasma, com associação entre a proteína C e o RNA genômico. As proteínas do envelope viral são processadas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde sofrem modificações pós-traducionais e são transportadas até a membrana plasmática da célula hospedeira. Nesse local, a pE2 é clivada em E2 e E3. A E2 é responsável pela ligação do vírus ao receptor celular, enquanto a E3 atua na correta conformação da pE2 e na sua associação com a E1.

A montagem final do vírion ocorre na membrana plasmática, onde o nucleocapsídeo se associa às glicoproteínas de envelope, adquirindo a bicamada lipídica e formando espículas compostas por heterodímeros das proteínas E1 e E2. A liberação das partículas virais ocorre por brotamento, permitindo que novos vírions infectem outras células e perpetuem o ciclo replicativo. A estrutura madura do envelope viral é essencial para o reconhecimento pelo sistema imune, sendo as glicoproteínas E1 e E2 alvos importantes para respostas neutralizantes (LUM e NG, 2015; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SILVA, 2018).

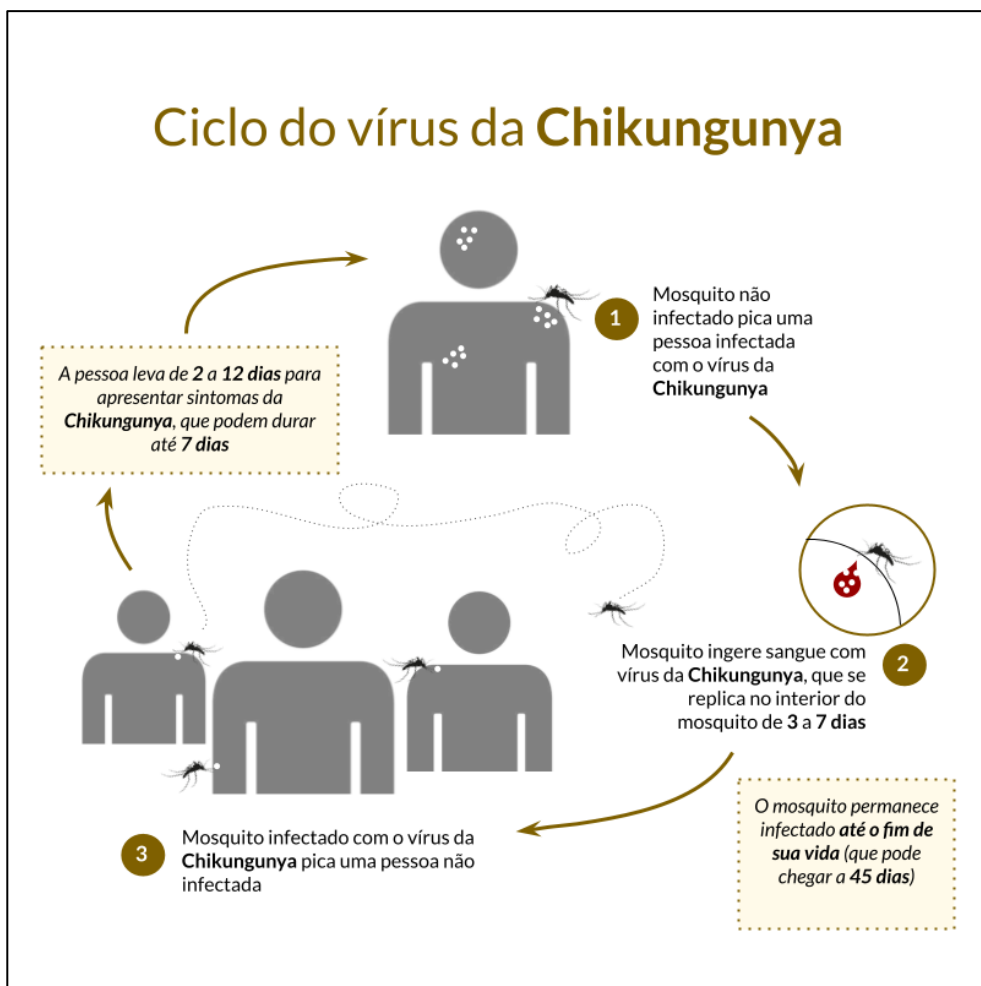
De forma resumida, a arquitetura molecular CHIKV é coordenada por um conjunto de proteínas não estruturais (nsPs) e estruturais, cujas funções sinérgicas

garantem o sucesso do ciclo replicativo. O complexo de replicação é ancorado inicialmente pela nsP1, responsável pelo capeamento do RNA viral e pela síntese da fita negativa, enquanto a nsP2 desempenha papéis cruciais de helicase (desenovelamento de fitas duplas) e protease, processando a poliproteína precursora. A estabilidade deste complexo depende da nsP3, que atua como um andaime regulatório essencial para que a nsP4 possa exercer sua atividade catalítica na replicação genômica. Paralelamente, a fase de morfogênese e entrada celular é mediada pelas proteínas estruturais: a proteína C (capsídeo) se organiza em uma estrutura icosaédrica para proteger o RNA, enquanto as glicoproteínas de envelope E1 e E2 coordenam, respectivamente, a fusão com a membrana da célula alvo e a interação específica com os receptores celulares. Esse processo de maturação superficial é facilitado pela E3, que garante o dobramento correto dos heterodímeros E1-E2, e pela pequena proteína 6K, um canal iônico que regula a integridade da membrana e a liberação eficiente das novas progênes virais (LUM e NG, 2015; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SILVA, 2018).

2.4. CICLO DE TRANSMISSÃO E VETORES

A transmissão do CHIKV configura um ciclo biológico (figura 13) de interdependência entre o vetor e o hospedeiro humano, onde a precisão temporal dita o ritmo da propagação. Se inicia quando um mosquito fêmea do gênero *Aedes*, realiza a hematofagia uma pessoa em fase de viremia, ingerindo o sangue contaminado. A partir desse momento, o vírus inicia um processo de replicação interna no inseto que dura de 3 a 7 dias, tornando-o um vetor permanente pelo restante de sua vida (que pode chegar a 45 dias). Ao buscar novo repasto sanguíneo, esse mosquito transmite o vírus a indivíduos saudáveis, que enfrentam um período de incubação silencioso de 2 a 12 dias antes que os sintomas se manifestem por cerca de uma semana, fechando um elo epidemiológico que sustenta a circulação da doença em áreas endêmicas.

Figura 13. Ciclo do vírus da chikungunya



Fonte: Secretaria de Saúde, 2024.

A transmissão dos quatro genótipos circulantes do vírus CHIK no mundo: Oeste Africano (WA), Leste, Centro e Sul-Africano (ECSA), Asiático e do Oceano Índico (IOL), ocorre por meio da hematofagia de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, podendo apresentar dois ciclos distintos. O ciclo urbano, predominante em áreas densamente povoadas, envolve exclusivamente hospedeiros humanos. Já o ciclo silvestre, característico de regiões rurais e florestais, envolve primatas não humanos como principais hospedeiros (COFFEY *et al.* 2014).

No continente africano, predomina o ciclo silvestre, com os mosquitos *Aedes africanus*, *Ae. furcifer-taylori* e *Ae. dalzielli* atuando como vetores principais. Em contrapartida, nas regiões asiáticas e nas Américas, a transmissão ocorre majoritariamente pelo ciclo urbano, sendo o *Ae. aegypti* o principal vetor, e o *Ae. albopictus* um vetor secundário, mais comum em áreas rurais (VU, JUNGKIND e LABEAUD, 2017).

A prevalência de clima quente e úmido, com precipitação regular, favorece a proliferação desses vetores. Regiões tropicais são especialmente vulneráveis devido à instabilidade climática e à combinação de fatores como desmatamento, queimadas, migração populacional, urbanização desordenada e ausência de saneamento básico. Essas condições resultam no aumento da densidade vetorial e, conseqüentemente, na intensificação das epidemias de CHIK. A alteração ambiental provocada por queimadas e desflorestamento também favorece a migração de vetores silvestres para ambientes urbanos e periurbanos. Por exemplo, a exploração de áreas rurais pode induzir a adaptação do *Ae. albopictus* a ambientes urbanos, intensificando a transmissão não apenas de CHIK, mas também de outras arboviroses como DEN e ZIK (LOPES, NAZAWA e LINHARES, 2014).

O *Ae. aegypti* é considerado o vetor mais eficiente na transmissão de arboviroses devido à sua elevada antropofilia e ampla distribuição em áreas habitadas por humanos. O *Ae. albopictus* é o segundo principal vetor do CHIKV. Uma mutação pontual na glicoproteína de envelope do vírus (E1-A226V) conferiu maior adaptabilidade ao vetor *Ae. albopictus*, aumentando sua competência vetorial. Essa mutação foi observada durante o surto ocorrido nas ilhas do Oceano Índico (TSETSARKIN *et al.* 2007). Outros mosquitos também podem transmitir o CHIKV, incluindo *Eretmapodites chrysogaster*, *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles stephensi* e *Opifex fuscus*, a

depende da distribuição geográfica e do ciclo (silvestre ou urbano) envolvido (COFFEY *et al.* 2014).

A expansão de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* para além de suas áreas nativas ocorreu principalmente via comércio e pela resistência dos ovos à dessecação. O *Ae. aegypti* substituiu amplamente o *Ae. albopictus* nas cidades do Sudeste Asiático na primeira metade do século XX. Inversamente, a introdução do *Ae. albopictus* nas Américas na década de 1980 foi associada à redução da população de *Ae. aegypti* em algumas regiões, fenômeno também observado em partes da África Central e nas ilhas do Oceano Índico. A disseminação a longas distâncias desses vetores – cujo voo natural não ultrapassa alguns quilômetros – ocorre principalmente via transporte de ovos e larvas. Esse processo foi intensificado pela urbanização acelerada e por sistemas de transporte cada vez mais rápidos. O aquecimento global contribuiu ainda mais para a expansão vetorial, promovendo ondas sucessivas de invasão e estabelecimento desses mosquitos nos centros urbanos, mantendo os ciclos de transmissão de CHIK ativos até os dias atuais (COFFEY *et al.* 2014; LOUNIBOS, 2002).

Além da via vetorial, a transmissão vertical de CHIK – da mãe para o feto durante a gestação, parto ou amamentação – também é relevante. Os primeiros casos foram relatados em 2006 durante um surto na Ilha da Reunião (França), onde 160 gestantes infectadas foram acompanhadas. Entre elas, três de nove abortos foram atribuídos ao CHIK. Das 151 gestantes com suspeita clínica, 118 apresentaram viremia negativa no momento do parto e nenhuma transmissão vertical foi registrada. No entanto, das 33 com viremia positiva, 16 neonatos foram infectados. Embora infecções antes das 22 semanas de gestação sejam raras, os efeitos podem ser graves (LENGLET *et al.* 2006).

Desde então, a transmissão vertical passou a receber maior atenção, sobretudo em áreas endêmicas. Estudos indicam que cerca de 50% das gestantes com viremia transmitem o vírus aos seus filhos, sendo que aproximadamente 12% dos neonatos infectados desenvolvem sintomas clínicos. Dentre os casos sintomáticos, são descritas manifestações graves, como hemorragias, alterações cardíacas, envolvimento do sistema nervoso central e risco aumentado de sequelas neurológicas a longo prazo (CONTOPOULOS-IOANNIDIS *et al.* 2018; SOUZA, 2021).

Em 2016, um estudo conduzido em um hospital universitário avaliou neonatos com infecção vertical por CHIK, identificando sintomas como artrite, febre,

hiperpigmentação cutânea, lesões bolhosas, convulsões, irritabilidade e microcefalia. Os autores destacam que os casos recentes revelam um novo perfil clínico da transmissão vertical, caracterizado por maior morbidade neonatal e impacto na saúde pública. Ainda que manifestações como encefalite, lesões dermatológicas e alterações hematológicas sejam recorrentes, a fisiopatologia da transmissão vertical permanece pouco elucidada, sendo necessário aprofundar as investigações. Da mesma forma, os efeitos a longo prazo ainda são incertos, o que reforça a importância do acompanhamento clínico dessas crianças e da intensificação das estratégias de prevenção, com foco no controle vetorial e na reabilitação dos neonatos infectados (LEITÃO *et al.* 2019).

2.5. SINAIS, SINTOMAS E EVOLUÇÃO CLÍNICA

O diagnóstico clínico das arboviroses constitui uma ferramenta essencial no enfrentamento de doenças negligenciadas, especialmente em regiões onde as unidades de saúde carecem de infraestrutura e equipamentos adequados para a realização de testes laboratoriais. Nesses contextos, a avaliação da sintomatologia torna-se, muitas vezes, o único recurso diagnóstico disponível, sobretudo durante surtos, quando há sobrecarga dos serviços de saúde. Assim, torna-se crucial a definição acurada dos sinais e sintomas característicos de cada arbovirose.

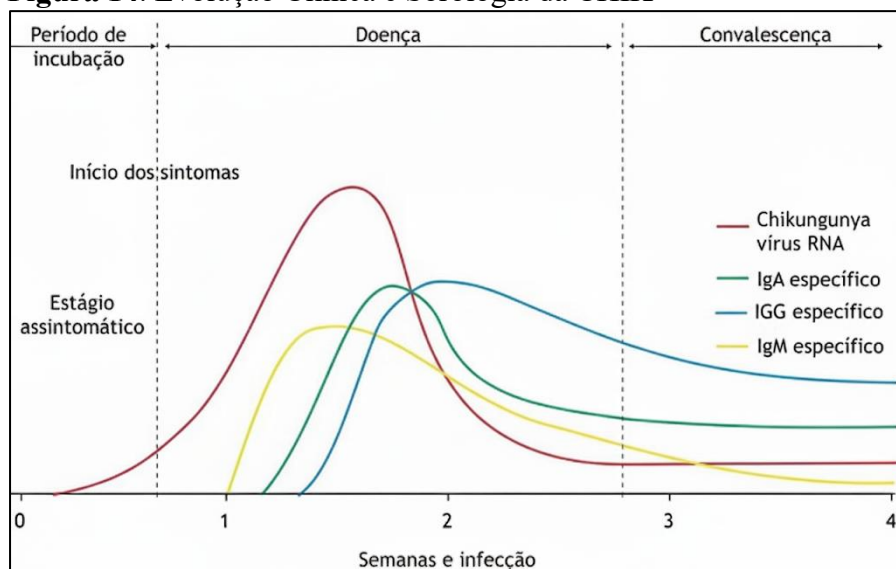
A infecção pelo CHIK caracteriza-se por uma doença musculoesquelética que afeta predominantemente as articulações periféricas. Os sintomas podem persistir por meses ou até anos, dependendo da gravidade do quadro clínico (MARTINS, 2020). Diferentemente de outras arboviroses, como DEN e ZIK, que apresentam alta proporção de infecções assintomáticas, a CHIK manifesta-se sintomaticamente em mais de 85% dos casos, o que favorece o diagnóstico clínico, apesar da sobreposição de sintomas entre essas infecções.

O período de incubação da CHIK varia entre 4 e 7 dias, sendo seguido por uma fase aguda com duração de 5 a 14 dias (Figura 14). Essa fase se inicia abruptamente, geralmente com febre alta (>39 °C), acompanhada de mialgia, cefaleia, lombalgia, erupções cutâneas (rash), que acometem até 90% da superfície corporal – podendo ser bolhosas em casos raros ou apresentar-se de forma maculopapular – e, principalmente, artralgia. A dor articular, intensa e incapacitante, representa o sintoma de maior relevância clínica. Outros sintomas menos frequentes incluem uveíte, episclerite, conjuntivite,

retinite, prurido, anorexia, fadiga e linfadenopatia (MORRISON, 2014; BURT *et al.* 2017).

Na maioria dos pacientes, os sintomas articulares regridem após a primeira semana. No entanto, em uma parcela dos casos, observam-se inchaço e rigidez matinal persistentes, que podem perdurar por meses ou até aproximadamente três anos. A partir de três meses do início dos sintomas, considera-se o início da fase crônica da doença (Figura 14). Estima-se que entre 50% e 60% dos indivíduos apresentem recuperação completa, enquanto os demais evoluem para formas crônicas, com sintomas persistentes e debilitantes. Essa fase é marcada por artrite inflamatória crônica, acompanhada de fadiga e sintomas depressivos, sobretudo em pacientes com histórico de doenças reumáticas. A dor articular é geralmente simétrica e afeta punhos, quadris, ombros, tornozelos, joelhos, pés e pequenas articulações das mãos, sendo as extremidades distais as mais acometidas (ZAID *et al.* 2018).

Figura 14. Evolução Clínica e Sorologia da CHIK



Fonte: HUA e COMBE (2017) Adaptado com GEMINI.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, pacientes infectados pelo CHIK podem desenvolver manifestações atípicas em diversos sistemas, incluindo nervoso, cardiovascular, renal, tegumentar, entre outros. No sistema nervoso, podem ocorrer

meningoencefalite, encefalopatia, convulsões, síndrome de Guillain-Barré, síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias; nos olhos, neurite óptica; no sistema cardiovascular, miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmias e instabilidade hemodinâmica. Lesões cutâneas incluem hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses e ulcerações aftosas. Comprometimento renal pode se manifestar por nefrite ou insuficiência renal aguda. Outras manifestações incluem discrasias sanguíneas, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético e insuficiência adrenal (RAJAPAKSE *et al.* 2010). Apesar desse espectro clínico amplo, a maioria dos casos apresenta evolução leve.

Embora a taxa de mortalidade por CHIK seja baixa, grupos como idosos, crianças e indivíduos com comorbidades apresentam maior risco para formas graves da doença, que podem evoluir para óbito. Entre as formas graves, destacam-se encefalite, miocardite e hepatite fulminante. A encefalite é particularmente observada em neonatos com infecção adquirida por transmissão vertical, sendo associada a quadros como encefalopatia e febre hemorrágica. Estudos indicam maior risco de aborto quando a infecção ocorre no primeiro trimestre gestacional (BURT *et al.* 2017; AZEVEDO *et al.* 2015).

Outro importante desfecho clínico associado à infecção por CHIK é o desenvolvimento de doenças reumáticas. Entre os fatores de risco para essa evolução estão o sexo feminino, idade superior a 45 anos, dor articular intensa no início da infecção, lesões articulares pré-existentes e altos níveis de IgG. Um estudo conduzido na França identificou uma forte associação entre idade avançada e gravidade do reumatismo crônico induzido por CHIK. No entanto, os mecanismos imunopatológicos subjacentes a essa evolução crônica ainda não estão completamente esclarecidos, sendo necessária a ampliação de estudos sobre a resposta imune e os fatores envolvidos na transição entre os estágios agudo e crônico da infecção (HUA e COMBE, 2017).

Além do aprofundamento no conhecimento da patogênese da doença, é fundamental a implementação de ações efetivas voltadas à prevenção e à mitigação dos casos de CHIK. Isso inclui o controle vetorial, campanhas de conscientização social e o desenvolvimento de terapias antivirais e imunossupressoras para o tratamento de manifestações crônicas. Apesar da baixa letalidade, a CHIK impõe elevada carga de morbidade, com impactos econômicos e sociais significativos nas regiões endêmicas. A necessidade de afastamento laboral e a limitação funcional decorrente da dor crônica

interferem diretamente na qualidade de vida dos pacientes e aumentam a demanda por serviços públicos de saúde (HUA e COMBE, 2017; HOSSAIN *et al.* 2018).

2.6. FISIOPATOLOGIA E RESPOSTA IMUNE

A patogênese das artrites induzidas por arboviroses permanece pouco elucidada na literatura, sendo um campo que carece de maior aprofundamento. No início da infecção pelo CHIK, a carga viral no sangue pode atingir níveis extremamente elevados, da ordem de 10^{10} partículas virais por mililitro. Essa viremia acentuada facilita não apenas a instalação da infecção no hospedeiro, como também a reinfeção de vetores hematófagos, contribuindo para a perpetuação do ciclo de transmissão.

Após a inoculação viral, seja por via hematogênica ou por penetração em mucosas, o CHIK infecta suas células-alvo, iniciando o processo de replicação viral. Os principais alvos incluem fibroblastos e, possivelmente, macrófagos. O vírus também demonstra tropismo por células dendríticas, células endoteliais hepáticas e células epiteliais e endoteliais do sistema nervoso central. CC Essa disseminação facilita a migração viral para outros sítios permissivos à replicação, como órgãos linfoides (baço e linfonodos), pele e tecidos associados às manifestações clínicas mais marcantes da doença – articulações periféricas, músculos e tendões. Além disso, órgãos como cérebro e fígado também podem ser acometidos, o que está relacionado ao tropismo celular previamente descrito (SILVA e DERMODY, 2017; HUA e COMBE, 2017).

Como consequência desse processo disseminado, instala-se um período de incubação de aproximadamente 2 a 4 dias, seguido pelo início da fase sintomática aguda da infecção. Nesse estágio, observa-se a ativação de uma resposta imune inata robusta, caracterizada por altos níveis de interferons do tipo I (IFN-I), além de quantidades elevadas de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como fatores de crescimento (Quadro 5). A sinalização mediada por IFN-I desempenha papel central no controle da replicação viral e na modulação da patogênese durante a fase aguda da infecção.

Em seres humanos, o IFN- α é detectado precocemente e apresenta correlação direta com a carga viral. O aumento concomitante da viremia e da resposta mediada por IFN- α coincide com o surgimento abrupto dos sintomas clínicos, observados na maioria dos pacientes. Em contraste, a proporção de indivíduos que permanecem assintomáticos

é consideravelmente menor, variando entre 5% e 28% dos casos descritos (SILVA e DERMODY, 2017).

Quadro 5. Mediadores imunes associados com a CHIK em humanos

Disease	Acute ^A	Severe ^B	Chronic ^C
Proinflammatory cytokines			
IFN- α^D	+		+
IFN- γ^D	+		+
IL-1 β		+ ^E	+
IL-2	+		
IL-2R	+		
IL-6	+	+ ^E	+ ^E
IL-7	+		
IL-8 ^D			+
IL-12	+		+
IL-15 ^D	+		
IL-17 ^D	+		+
IL-18	+		
TNF- α^D			+
Antiinflammatory cytokines			
IL-1Ra	+		+
IL-4	+		
IL-10 ^D	+		+
Chemokines			
G-CSF	+		
GM-CSF ^D			+ ^E
IP-10	+	+	
MCP-1	+	+ ^E	+
MIG		+	
MIP-1 α	+		+
MIP-1 β	+		+
Growth factors			
bFGF	+		

Fonte: SILVA e DERMODY, 2017.

Estudos em modelos animais demonstram que as respostas imunes inatas ativadas pela replicação do CHIK promovem o recrutamento de células inflamatórias aos tecidos musculoesqueléticos infectados, o que explica os sintomas clínicos de artralgia e mialgia observados em pacientes. Ao longo da primeira semana de infecção, ocorre declínio progressivo da viremia concomitante ao estabelecimento da resposta imune adaptativa específica contra o vírus. Embora a viremia seja, na maioria dos casos, eliminada entre 5 e 7 dias após o início dos sintomas, e a maioria dos sinais clínicos se resolva em até 14

dias, cerca de 48% dos pacientes apresentam sintomas persistentes por meses ou anos (SILVA e DERMODY, 2017).

A infecção pelo CHIK é citopática e induz apoptose celular, resultando em lesão tecidual direta. Diversas linhagens celulares são suscetíveis à infecção, incluindo condrócitos, fibroblastos, hepatócitos, células endoteliais, macrófagos, monócitos, células satélites musculares, miócitos e osteoblastos, o que justifica o amplo espectro de sintomas clínicos. Perfis de citocinas e quimiocinas foram associados à gravidade e cronicidade da doença. Níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) correlacionaram-se com formas graves da infecção, enquanto concentrações elevadas de IL-6 e GM-CSF foram observadas em pacientes com artralgia persistente (SILVA e DERMODY, 2017).

Em amostras de fase subaguda, pacientes com suspeita clínica para CHIK apresentaram elevada expressão de IL-1 (β e ra), TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-4 e IL-5, indicando uma possível transição para a cronicidade. Adicionalmente, a expressão aumentada da quimiocina CXCL10/IP-10 foi associada a elevadas cargas virais e à gravidade clínica durante a fase aguda. A IL-6, com função pirógena, foi associada à febre elevada e viremia, enquanto IL-15 e MCP-1, detectadas em amostras de fase aguda, foram relacionadas a respostas imunes inatas em pacientes com inflamação articular inicial (MARTINS, 2020). Esses dados evidenciam que desequilíbrios na regulação de mediadores inflamatórios podem comprometer a eficácia da resposta antiviral e contribuir para a patogênese da doença.

Apesar de a infecção ser amplamente controlada por mecanismos imunes inatos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, os alvos celulares-chave que coordenam a resposta imune *in vivo* ainda são pouco compreendidos. Os macrófagos são células infiltrativas predominantes nos tecidos infectados e, em estudos com camundongos, sua depleção resultou em redução da sintomatologia musculoesquelética, embora tenha prolongado a viremia. Esses achados sugerem que os macrófagos podem funcionar como reservatórios virais e contribuir para a persistência da artropatia associada ao CHIK. Outras células como dendríticas plasmocitóides, neutrófilos e células NK também infiltram os tecidos durante a infecção aguda, mas seus papéis específicos no controle viral ainda não estão bem definidos. Em humanos, a fase aguda da infecção é caracterizada pela proliferação de linfócitos T CD8⁺, enquanto na fase crônica observa-

se predomínio de células T CD4⁺ ativadas (HUA e COMBE, 2017; LONG e HEISE, 2016).

A imunidade adaptativa envolve tanto respostas celulares quanto humorais. Embora o papel dos linfócitos T e B na infecção por CHIK ainda esteja em investigação, dados indicam que aproximadamente 80% dos pacientes desenvolvem linfopenia, provavelmente como efeito secundário da ação do IFN tipo I, uma vez que o vírus não infecta diretamente essas células. A ativação predominante envolve linfócitos T CD8⁺ com ação citotóxica, embora também seja evidente a participação de células T CD4⁺ efetoras, especialmente da subpopulação Th1, responsáveis pela secreção de citocinas como IL-2, IL-3, TNF- α e IFN- γ . A exacerbação da resposta Th1, associada ao aumento de IFN- γ e IL-2, foi relacionada à persistência da dor crônica, ao passo que uma resposta Th2 predominante, com elevação de IL-4 e IL-10, foi associada à remissão dos sintomas clínicos (OCÉA, 2020).

A resposta humoral, por sua vez, é essencial para o controle da viremia. Humanos, primatas não humanos (NHPs) e camundongos infectados pelo CHIK desenvolvem anticorpos neutralizantes das classes IgM e IgG. A IgM é detectável por volta do 7º dia após o início dos sintomas, com pico nas semanas seguintes e declínio gradual nos meses posteriores. A resposta IgG, geralmente detectada entre o 7º e o 10º dia, torna-se mais evidente após a queda da viremia. Os anticorpos neutralizantes mais eficazes têm como principais alvos os domínios A e B da glicoproteína E2 do CHIKV. Em modelos murinos deficientes em células B, a viremia persiste, o que reforça a importância dos anticorpos na contenção da infecção e atenuação da sintomatologia (HUA e COMBE, 2017; LONG e HEISE, 2016).

2.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico preciso da infecção pelo CHIK é essencial tanto para o manejo clínico adequado dos pacientes quanto para o controle da disseminação viral em áreas endêmicas. Diversas abordagens diagnósticas estão disponíveis, abrangendo métodos laboratoriais e clínicos, que possibilitam a detecção direta do vírus ou a identificação da resposta imune do hospedeiro. Entre os métodos laboratoriais, destacam-se a detecção do RNA viral por técnicas moleculares e a sorologia para anticorpos específicos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR), especialmente na modalidade em tempo real (RT-PCR), é a técnica mais amplamente utilizada para a detecção do CHIK. Essa

metodologia permite a amplificação e detecção de RNA viral em amostras clínicas como sangue, soro, plasma e líquido cefalorraquidiano, sendo altamente sensível e específica durante os estágios iniciais da infecção (PONGSIRI *et al.* 2018; SISSOKO *et al.* 2014). A RT-PCR é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico nas fases agudas da doença, geralmente nos primeiros 5 a 7 dias após o início dos sintomas, período em que a carga viral ainda é detectável.

Esse método, contudo, requer laboratórios especializados, equipamentos específicos e pessoal treinado. O procedimento envolve a extração do RNA viral, seguido por ciclos de amplificação térmica, que permitem a identificação precisa do material genético viral (SISSOKO *et al.* 2014). A confiabilidade e precisão da RT-PCR têm sido amplamente documentadas, consolidando-a como ferramenta de referência para o diagnóstico precoce da CHIK.

Além das técnicas moleculares, os ensaios sorológicos desempenham papel crucial na detecção de anticorpos específicos produzidos em resposta à infecção pelo CHIK. Esses métodos são especialmente úteis a partir da segunda semana de sintomas, quando os níveis de anticorpos começam a se elevar. O teste de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) é amplamente utilizado para a detecção de imunoglobulinas das classes IgM, IgG e, mais recentemente, IgA (NG *et al.* 2015; ROLPH *et al.* 2019). A IgM é detectável cerca de 4 a 5 dias após o início dos sintomas, enquanto a IgG aparece por volta do sétimo dia, podendo persistir por anos.

O ELISA destaca-se por seu custo relativamente baixo, elevada sensibilidade e especificidade – próximas de 100% em muitos estudos –, além de sua aplicabilidade em cenários de vigilância epidemiológica, particularmente em surtos e regiões com infraestrutura laboratorial limitada.

Outro método sorológico de destaque é o ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT), considerado o mais específico para confirmação diagnóstica. Essa técnica permite a detecção de anticorpos neutralizantes, confirmando a exposição ao vírus. No entanto, o PRNT é laborioso, demanda infraestrutura de biossegurança elevada e técnicos especializados, o que restringe seu uso a centros de referência (ROLPH *et al.*, 2019).

As técnicas sorológicas não apenas auxiliam no diagnóstico individual, mas também são fundamentais para o monitoramento epidemiológico, permitindo estimativas

de prevalência da infecção, detecção de surtos e avaliação da resposta imune coletiva de populações expostas (NG *et al.* 2015; ROLPH *et al.* 2019).

Complementarmente, o diagnóstico clínico desempenha papel essencial, sobretudo em áreas com acesso limitado a testes laboratoriais. A avaliação clínica baseia-se na presença de sintomas característicos como febre alta de início súbito, poliartralgia (dor em múltiplas articulações), mialgia, exantema e fadiga. A associação desses sinais com histórico de exposição em áreas endêmicas ou contato com casos confirmados pode ser altamente sugestiva de infecção por CHIK (PIALOUX *et al.* 2007; CLETON *et al.* 2012).

Estudos indicam que a febre acompanhada de artralgia intensa é uma das manifestações mais distintivas da CHIK em relação a outras arboviroses como DEN e ZIK. Dessa forma, o diagnóstico clínico, embora não definitivo, é frequentemente o primeiro passo na triagem de pacientes suspeitos, sendo de extrema importância que os profissionais de saúde estejam atentos às manifestações clínicas típicas da doença para orientar a conduta terapêutica e epidemiológica adequada.

2.8. ANTICORPOS

A detecção de anticorpos específicos é fundamental para o diagnóstico e o monitoramento de arboviroses, incluindo a infecção por CHIK. Eles representam as principais ferramentas da imunidade adaptativa humoral, sendo amplamente explorados na biotecnologia diagnóstica. Ensaio imunoenzimático (ELISAs) têm sido empregados para detectar anticorpos da classe IgA, uma das principais imunoglobulinas secretadas nas mucosas, em amostras de soro e fluidos biológicos. Esses ensaios oferecem uma abordagem sensível e específica, útil tanto para o diagnóstico precoce quanto para a vigilância sorológica dessas infecções (CUNHA *et al.* 2019).

Devido a ampla utilização das imunoglobulinas IgM e IgG no imunodiagnóstico, por uma titulação bem definida como mostra a figura 14 desse trabalho, a IgA tem sido frequentemente negligenciada, mesmo com evidências crescentes sobre seu valor em infecções virais, como observado durante a pandemia de COVID-19. No contexto da CHIK, estudos indicam que a detecção de IgA pode ser um marcador sensível para infecções agudas e recentes, frequentemente detectável antes mesmo da resposta IgM. Isso torna sua identificação particularmente útil para o diagnóstico rápido e preciso, permitindo a adoção oportuna de medidas de controle e prevenção (BLACKMORE *et al.* 2012).

Além de sua aplicação diagnóstica, a dosagem de anticorpos IgA pode contribuir para a compreensão da resposta imune humoral ao CHIK e sua patogênese. Investigações têm explorado a presença e persistência de IgA em diferentes estágios da doença, fornecendo informações relevantes sobre a dinâmica da resposta imunológica e a progressão da infecção (PRAMANICK *et al.* 2018).

Adicionalmente, a detecção de anticorpos IgA pode representar uma ferramenta valiosa no diagnóstico diferencial entre infecções causadas por diferentes arbovírus, que frequentemente compartilham sintomas clínicos semelhantes. A utilização de epítomos imunológicos específicos para IgA tem o potencial de reduzir a reatividade cruzada entre vírus antígenicamente relacionados, como DEN e ZIK, aumentando a acurácia dos ensaios (PAZ-BAILEY *et al.* 2018).

2.9. PROFILAXIA

A profilaxia desempenha um papel fundamental no controle da CHIK, sobretudo diante da inexistência de uma vacina específica para prevenção da doença. Diversas estratégias têm sido estudadas e implementadas com o objetivo de reduzir a transmissão do vírus e minimizar o risco de infecção (DUBRULLE *et al.* 2018; GÉRARDIN *et al.* 2019; DUTRA *et al.* 2020). Entre essas estratégias, a principal medida preventiva consiste na proteção contra a picada dos mosquitos vetores, sobretudo *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*. O controle vetorial, por meio da eliminação de criadouros, é essencial para a redução das populações desses mosquitos e, conseqüentemente, da circulação viral (GÉRARDIN *et al.* 2019).

Além do controle ambiental, ações de educação em saúde e conscientização da população são cruciais para incentivar o uso de medidas individuais de proteção. Entre essas medidas, destacam-se o uso de repelentes, o uso de roupas que cubram a maior parte do corpo (como camisas de manga longa e calças), e a instalação de telas de proteção em portas e janelas (DUBRULLE *et al.* 2018; DUTRA *et al.* 2020). A aplicação de inseticidas também faz parte das estratégias de controle vetorial, sendo utilizada para diminuir a densidade populacional dos mosquitos, especialmente em áreas endêmicas (DUBRULLE *et al.* 2018; GÉRARDIN *et al.* 2019). Para que tais ações sejam efetivas, é fundamental que sejam implementadas de forma integrada e sustentável, com a participação ativa da comunidade e apoio coordenado dos serviços de saúde pública.

Adicionalmente, novas abordagens vêm sendo investigadas como alternativas ou complementos às medidas tradicionais de controle. Dentre essas, destaca-se a liberação de mosquitos geneticamente modificados ou infectados por *Wolbachia*, com o intuito de reduzir a competência vetorial e, portanto, a capacidade de transmissão do CHIKV (DUBRULLE *et al.* 2018; DUTRA *et al.* 2020). Essas estratégias inovadoras apresentam potencial promissor no fortalecimento da profilaxia da CHIK, especialmente em cenários de elevada endemicidade e resistência aos métodos convencionais.

2.10. TRATAMENTO

O tratamento da CHIK é essencialmente sintomático, visando o alívio dos sintomas e o manejo das complicações, uma vez que não há antiviral específico disponível. Diversas abordagens terapêuticas vêm sendo estudadas com o objetivo de melhorar os desfechos clínicos (BOUQUILLARD e COMBE, 2008; CHOPRA *et al.* 2014; SIMON *et al.* 2018; LUM e NG, 2019). A utilização de analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como paracetamol e ibuprofeno, constitui a principal estratégia para controlar a febre, a dor articular e a inflamação no período agudo da doença.

Nos casos em que evolui para artrite crônica, com sintomas persistentes por semanas ou meses, terapias adicionais tornam-se necessárias. O uso de corticosteroides, como a prednisona, tem demonstrado eficácia no controle da inflamação articular e na redução da dor crônica (BOUQUILLARD e COMBE, 2008; LUM e NG, 2019). Nesses pacientes, o tratamento deve ser monitorado cuidadosamente, considerando os riscos associados ao uso prolongado desses medicamentos.

Além da farmacoterapia convencional, terapias alternativas e complementares têm sido investigadas. Compostos naturais, como extratos de *Aloe vera* e curcumina, apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que podem contribuir para o alívio sintomático (CHOPRA *et al.* 2014; SIMON *et al.* 2018). A fisioterapia também desempenha papel fundamental, especialmente em pacientes com artrite crônica, contribuindo para a recuperação da função articular por meio de exercícios de fortalecimento muscular, alongamento e mobilização (CHOPRA *et al.* 2014; LUM e NG, 2019).

A prevenção de complicações deve ser parte integrante da abordagem terapêutica. Monitorar a hidratação, promover repouso adequado e fornecer suporte clínico aos grupos

de risco, como idosos e indivíduos com comorbidades, são medidas essenciais para evitar agravamentos, como desidratação e disfunções orgânicas (BOUQUILLARD e COMBE, 2008; SIMON *et al.* 2018).

A artrite crônica pós-CHIK é uma das principais sequelas da infecção, podendo comprometer significativamente a qualidade de vida dos pacientes. Estudos demonstram que, além dos corticosteroides, agentes imunossupressores como o metotrexato têm se mostrado eficazes na redução da inflamação e melhora da função articular. Pacientes tratados com metotrexato relataram alívio da dor, recuperação funcional e melhora na qualidade de vida (RAMACHANDRAN *et al.* 2011).

A fisioterapia continua sendo componente indispensável no manejo da artrite crônica, com benefícios documentados na redução da rigidez, na restauração da mobilidade e na diminuição da dor (CHOPRA *et al.* 2012). Outras intervenções complementares, como acupuntura, massoterapia e uso de plantas medicinais, também têm sido exploradas. Embora os resultados sejam promissores, ainda são necessárias mais evidências científicas para validar a eficácia dessas práticas (PONGPIRUL *et al.* 2015).

O tratamento da artrite crônica associada à CHIK requer uma abordagem multidisciplinar, individualizada e contínua. A combinação de terapias farmacológicas, fisioterápicas e complementares, adaptadas às necessidades clínicas e funcionais de cada paciente, pode otimizar os resultados terapêuticos e melhorar o prognóstico (WAHID *et al.* 2020).

Com base na revisão de literatura realizada, fica evidente a crescente complexidade das arboviroses no cenário global e, em particular, no Brasil, impulsionada pela cocirculação de DENV, CHIK e ZIK e pelos desafios diagnósticos inerentes à sobreposição sintomática. A chikungunya, objeto central deste estudo, demonstrou ser uma preocupação significativa de saúde pública, com um histórico de surtos recorrentes, alta morbidade associada a manifestações articulares crônicas e um impacto socioeconômico considerável. A análise aprofundada do agente etiológico, sua replicação viral, mecanismos de transmissão e a complexa fisiopatologia revelaram múltiplos alvos potenciais para intervenção. A resposta imune, em especial a detecção de anticorpos IgA e o reconhecimento de epítopos específicos em proteínas estruturais e não estruturais do CHIKV, surge como uma estratégia promissora para o aprimoramento diagnóstico. Contudo, as limitações dos métodos diagnósticos atuais e a ausência de tratamentos

antivirais específicos ou vacinas amplamente disponíveis reforçam a urgência de pesquisas que visem ao desenvolvimento de ferramentas mais rápidas, sensíveis e específicas. Nesse contexto, a identificação e caracterização de epítopos sintéticos com baixa reatividade cruzada, conforme explorado neste trabalho, representam um passo fundamental para o avanço no imunodiagnóstico, facilitando a vigilância epidemiológica e o manejo clínico da CHIK.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o desenvolvimento de um imunodiagnóstico mais específico e sensível para a detecção de anticorpos IgA anti-CHIK, por meio da caracterização imunológica e estrutural dos principais epítomos das proteínas virais do CHIK, utilizando amostras de soro de pacientes atendidos no Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo, no município de Duque de Caxias (RJ).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma análise epidemiológica da área em que o estudo foi realizado.
- Mapear os principais epítomos imunológicos das proteínas virais do CHIK
- Realizar análises *in silico* para prever a reatividade dos epítomos com anticorpos da classe IgA, bem como sua possível reatividade cruzada com anticorpos gerados por outros patógenos humanos.
- Selecionar e sintetizar os epítomos com maior potencial de aplicação no imunodiagnóstico da infecção por CHIK.
- Detectar, por meio de ensaio imunológico (ELISA), anticorpos da classe IgA em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de CHIK, atendidos no Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo (Duque de Caxias, RJ).
- Determinar a acurácia, sensibilidade, especificidade, eficácia, valores preditivos positivo e negativo, e demais parâmetros estatísticos relevantes para avaliação do desempenho diagnóstico dos epítomos selecionados.
- Analisar e comparar os resultados obtidos por meio do ensaio imunológico (ELISA-IgA) entre os diferentes peptídeos testados e avaliar a concordância com outros kits descritos na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÉTICA DA PESQUISA

Esta pesquisa, no conjunto dos trabalhos em andamento na Linha de Pesquisa de Biomarcadores, foi submetida como adendo ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) e aprovada sob o CAAE 70324417.1.0000.5283 como consta no Anexo 1. Todos os participantes da pesquisa tomaram ciência, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi disponibilizado antes do procedimento de coleta de sangue dos mesmos (Anexo 2).

4.2. ÁREA DO ESTUDO

Na década de 1950, o município de Duque de Caxias foi dividido em dois distritos: Duque de Caxias e Imbariê. Mais tarde, foram criados os distritos de Campos Elíseos e Xerém, ambos desmembrados do distrito de Imbariê e anexados ao município de Duque de Caxias. Atualmente é formado por quatro distritos: Duque de Caxias, Campos Elíseos, Imbariê e Xerém.

Integrante da Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, Duque de Caxias é um município brasileiro do interior estado do Rio de Janeiro, situado na região da Baixada Fluminense, sendo o terceiro município mais populoso do estado, depois da capital e de São Gonçalo. Com uma população estimada de 914.383 habitantes, dividida em 443.974 (51.92%) mulheres e 411.074 (48.08%) homens (IBGE, 2018). O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) é de 0,711 (IBGE, 2010).

4.3. TRIAGEM CLÍNICA

Os pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK) foram provenientes da Unidade de Pronto atendimento (UPA) Beira Mar, localizada na mesma área do Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo, município de Duque de Caxias (RJ). Tal unidade de saúde é responsável pelo atendimento diário de cerca de 600 pacientes, funcionando 24 horas. Ao chegar na UPA Beira Mar o paciente foi encaminhado ao enfermeiro de triagem que tem a capacidade de assumir a responsabilidade pela avaliação inicial do paciente, iniciar a obtenção do diagnóstico e encaminhar o paciente dentro do departamento de emergência para a área clínica adequada. Em seguida, o paciente foi atendido pelo médico que identificava em seu

prontuário os sinais e sintomas observados e emitia um diagnóstico clínico, na maioria das vezes sugestivo.

A análise dos prontuários foi realizada de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), tendo um perfil de estudo quantitativo e descritivo. Os prontuários foram fotografados e armazenados em formato JPG e em seguida salvos em pastas com identificação das iniciais dos pacientes e por numeração para serem analisados *a posteriori* por meio de um formulário estruturado.

Aqueles prontuários que apresentaram sintomatologia que não direcionavam para uma das arboviroses estudadas foram alocados nas categorias DEN/ZIK e DEN/CHIK (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK

CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AVALIAÇÃO				
DEN	CHIK	ZIK	DEN/ZIK	DEN/CHIK
Discrasia	Artralgia moderada a intensa	Hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido	Dor nos olhos	Mal-estar
			Edema	
Eventos sistêmicos	Artrite	Exantema pruriginoso	Artralgia	Artralgia moderada/intensa
			Mialgia	
			Cefaleia	Exantema
			Evento sistêmico	Mialgia

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos prontuários médicos obtidos:

- Critérios de inclusão: pacientes, sem distinção de gênero e idade, que tenham diagnóstico clínico-epidemiológico de DEN, CHIK ou ZIK; pacientes que apresentem endereço de Duque de Caxias, RJ; pacientes atendidos de janeiro a junho de 2018.

- Critérios de exclusão: pacientes com sintomatologia que não caracterize as arboviroses (DEN, CHIK e ZIK); morador de área que não abranja aquela do presente estudo; pacientes cujos prontuários não tenham os dados avaliados no estudo preenchidos corretamente ou ilegíveis.

A coleta de dados foi realizada com base nas variáveis de caracterização amostral, tais como: idade, gênero e sintomas.

4.4. AMOSTRAS

A coleta de sangue total (10-15 mL) das 175 amostras foi feita através de venopuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, de acordo com as diretrizes de coleta de sangue da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). As amostras foram colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugadas para retirada do soro. Os soros foram identificados, aliquotados e transportados em recipientes com gelo seco para compor a soroteca do laboratório de pesquisa da UNIGRANRIO (LabGen), onde foram armazenados em tubos plásticos tipo Eppendorf e congelados em freezer a -80°C, permanecendo até a realização das análises imunodiagnósticas. É importante ressaltar que devido ao período em que a coleta foi realizada, as amostras coletadas foram correspondentes ao genótipo ECSA, circulante no momento realizado.

Em 2022 as amostras com diagnóstico clínico ou laboratorial positivos para CHIK foram encaminhadas ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (CDTS – FIOCRUZ) para realização da síntese de peptídeos e análises imunodiagnósticas.

4.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANA E ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

A biblioteca composta pelos peptídeos do CHIKV foi sintetizada, utilizando banco de dados como fonte, para cobrir as regiões das proteínas estruturais (E1, E2, E3, 6K e C) e não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) codificados pelo seu genoma. O banco de dados utilizado foi o UniProt com a identificação das poliproteínas da seguinte forma: POLN_CHIK3 Polyprotein P1234 OS=chikungunya virus (strain 37997) - Q5XXP4 e POLS_CHIK3 Structural polyprotein OS=chikungunya virus (strain 37997) - Q5XXP3 Foi realizado então o processo de síntese de peptídeos em membrana de celulose da sequência proteica em questão com o equipamento Mutipep 1, Intavis - Alemanha. A programação foi feita com o auxílio do Respep - módulo SPOT, onde os peptídeos foram distribuídos na matriz celulósica de 30x20. Cada peptídeo teve o tamanho determinado de 15 aminoácidos com sobreposição de 10 aminoácidos e a inserção de 5 novos aminoácidos a cada peptídeo.

As reações de acoplamento foram seguidas por acetilação com anidrido acético (4%, v/v) em N,N-dimetilformamida para tornar os peptídeos N-reativos durante os passos subsequentes. Após a acetilação, os grupos de proteção F-moc foram removidos pela adição de piperidina para tornar os peptídeos nascentes reativos. Os aminoácidos restantes foram adicionados por este mesmo processo de acoplamento, bloqueio e desproteção até que o peptídeo desejado fosse gerado. Após a adição do último aminoácido, as cadeias laterais dos aminoácidos foram desprotegidas utilizando uma solução de diclorometano-ácido trifluoroacético-triisopropilsilano (1:1:0,05, v/v/v) e lavadas com etanol.

Após a síntese a membrana celulósica foi lavada por 10 minutos com T-TBS (50 mM Tris, 0,05% Tween, 136 mM NaCl, 2 mM KCl) pH 7.4 e os sítios livres bloqueadas com T-TBS contendo 1,5% BSA por 12 horas 8°C. Após nova lavagem com T-TBS, as membranas foram incubadas por 90 minutos com o soro humano diluídos na proporção de 1:150 em T-TBS contendo 0,75% de BSA, após foram realizadas extensivas lavagens com T-TBS, seguido por mais 90 minutos de incubação com anti-IgA de humano e conjugado com fosfatase alcalina (Thermo Scientific), diluídos na proporção de 1/5.000 em solução de T-TBS contendo 0,75% de BSA (detalhes na sessão etapas complementares). Foram realizadas lavagens com T-TBS e em seguida o substrato para fosfatase alcalina quimioluminescente Tropix® foi adicionado. Controle negativo utilizado foi QERV – *Vaccinia virus*, os controles positivos utilizados foram GYPKDGNAFNNLDRI – *Clostridium tetani* e KEVPALTAVETGATN – *Poliovirus*.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA INTENSIDADE DO SINAL

A imagem da membrana foi obtida por meio da foto documentadora Odyssey FC, versão 1.0, da LI-COR Bioscience, sendo analisada por meio do programa TotalLabTL100, versão 2009, da Nonlinear Dynamics. Este programa possui uma busca de grade automática para 600 spots, resultando em intensidades de sinal referente a coloração de cada spot. Foram considerados para identificação de possíveis epítomos os spots que apresentaram uma intensidade de sinal (NS) maior ou igual de 30% do maior valor de sinal obtido em todos os spots da respectiva membrana.

4.7. ANÁLISE *IN SÍLICO* DE REATIVIDADE CRUZADA

A análise *in silico* de reatividade cruzada para CHIKV foi realizada após a seleção das sequências de aminoácidos das principais proteínas do vírus CHIKV (nsP1, nsP2,

nsP3, nsP4, E1, E2, E3, C e 6K), considerando a intensidade do sinal e a correspondência da sequência com peptídeos do CHIKV. Essas sequências foram analisadas quanto à possibilidade de reatividade cruzada com outros patógenos humanos, utilizando o amplamente conhecido algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O BLAST é uma ferramenta de bioinformática que compara sequências de aminoácidos, RNA ou DNA para identificar semelhanças e outras informações relevantes sobre a sequência em estudo.

No presente estudo, utilizamos o BLAST em duas bases de dados de proteínas, a UniProt e o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para coletar informações sobre possíveis reatividades cruzadas para cada sequência. Se, nos bancos de dados, outro patógeno além do CHIKV apresentasse no mínimo 5 aminoácidos em sequência idênticos à sequência selecionada, era considerado como um possível alvo de reação cruzada no imunodiagnóstico.

4.8. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS COMPLETAS DE AMINOÁCIDOS

Além da análise inicial por meio do BLAST, foi conduzido um alinhamento Clustal W do CHIK com outros arbovírus de importância nacional no Brasil pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* (ANEXO IV). Esse procedimento foi realizado com o intuito de fortalecer a investigação de possíveis similaridades ou discrepâncias nas sequências de aminoácidos das proteínas estruturais e não estruturais de cada vírus. Tal abordagem visa não apenas aprofundar a compreensão das características genômicas do CHIK, mas também destacar a viabilidade dos epítomos previamente selecionados, os quais demonstraram não apresentar reatividade cruzada com outros patógenos humanos durante a análise de BLAST. Esses passos metodológicos contribuem para uma investigação mais abrangente sobre a variabilidade genética e as possíveis interações virais, oferecendo insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e intervenção mais eficazes.

4.9. PREDIÇÃO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA

De forma complementar, foram analisadas as duas poliproteínas virais do CHIK, a poliproteína P1234 (strain 37997), - Q5XXP4 e poliproteína estrutural (strain 37997) - Q5XXP3. Foram marcados o início e o fim de cada proteína dentro dessas poliproteínas para realizar a predição gráfica da estrutura. Utilizamos o programa Robetta (<https://rosetta.bakerlab.org/>), que é uma plataforma amplamente reconhecida para

realizar esse tipo de predição. Dessa maneira foram gerados gráficos preditivos dos epítomos selecionados por não apresentar reatividade cruzada com outros patógenos do homem e editados para uma melhor visualização da posição na proteína.

4.10. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

A síntese dos peptídeos foi feita de acordo com o procedimento padronizado em nosso laboratório com o uso do equipamento Multipepl Intavis Bioanalytical Instruments. Inicialmente, foi usado um suporte polimérico do tipo Tentagel[®], que contém grupamento amino livre para a ligação de aminoácidos. A resina foi previamente solvatada em N, N'-Dimetilformamida (DMF), em seguida, para a construção da sequência peptídica Fmoc-aminoácidos foram solubilizados com os reagentes de acoplamento N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidrato de Hidroxibenzotriazol (HOBt), diluídos em DMF, e despejados na seringa contendo o suporte polimérico. Entre cada etapa de acoplamento foi realizado um tratamento nos aminoácidos com 4-metilpiperidina diluídos em DMF com objetivo de fazer a remoção dos grupamentos FMOC presentes nas regiões N-terminais destes, tornando-os viáveis a reação, além de um processo de acetilação na região amino terminal, usado Anidrido acético diluído em DMF para evitar a construção de sequencias truncadas.

O processo de síntese foi realizado seguindo os passos de remoção do grupo FMOC, acoplamento e acetilação até a formação completa da sequência e por último foram realizadas lavagens com diclorometano e secagem do complexo formado. Para o processo de desacoplamento do peptídeo do suporte, foi usado uma solução de Ácido trifluoroacético, triisopropilsilano e água MiliQ (92,5/5/2,5), logo após, foi adicionado Éter dietílico a solução contendo o peptídeo recém desacoplado e realizada uma centrifugação para o processo de precipitação. Por fim, o precipitado foi coletado, liofilizado, suspenso em água MiliQ e congelado para uso posterior.

4.11. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

As placas foram sensibilizadas overnight a 4°C com os peptídeos sintéticos para IgA CHIK. No dia seguinte foram lavadas três vezes seguidas com PBS e em seguida bloqueada com solução de caseína (1%) em PBS-TWEEN 20 – 0,05% (PBS-T) à 37 °C/1h. Em seguida novas lavagens foram realizadas e adicionados os soros dos pacientes (1:100) diluídos em PBS-TWEEN + BSA e incubados por 1h a 37°. Posteriormente, as placas foram lavadas e o anticorpo secundário (IgA de cabra anti IgA humana), conjugado

a fosfatase foi adicionado e, mais uma vez incubado por 1 hora a 37°C. Mais uma leva de lavagens foram realizadas e para revelar o ensaio foi utilizado nitrofenilfosfato (Pnpp, Sigma-Aldrich, USA) por 15 min, e em seguida adicionada a solução stop (HCl), para interromper a reação. Por fim, as placas foram lidas no leitor de ELISA – BIOTEK e as Densidades Ópticas foram avaliadas e utilizadas para cálculos estatísticos do trabalho.

4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.12.1. PREPARAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISE COMPARATIVA

Inicialmente, os dados de índice de reatividade (IR) foram obtidos através dos resultados da Densidade Óptica (DO) das amostras submetidas ao ELISA para cada um dos seis peptídeos (313 ao 318). Para estabelecer um limiar de reatividade (*cut-off*), foram utilizadas amostras negativas (controles negativos) as quais representavam a ausência de reação ou condição basal. As leituras de DO dessas amostras negativas foram utilizadas para calcular a média (μ) e o desvio padrão (σ). O *cut-off* foi determinado pela soma da média de DO dos controles negativos com três vezes o desvio padrão, conforme a Equação: $Cut-off = \mu_{negativos} + (3 \times \sigma_{negativos})$, dessa forma foi obtido o IR de cada amostra através da divisão da OD pelo *cut-off*. Em seguida foram planilhados e organizados em colunas distintas, separando os valores de indivíduos positivos (n=30) e negativos (n=63). Essa organização prévia foi fundamental para as análises subsequentes, permitindo a comparação direta da distribuição dos valores de IR entre os grupos, além de outros testes estatísticos.

4.12.2. TESTE DE NORMALIDADE (SHAPIRO-WILK):

Antes de proceder com os testes comparativos de mediana, foi realizado o teste de normalidade com objetivo de verificar a distribuição dos dados em cada grupo (positivos e negativos) para cada peptídeo. Para isso, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Este teste é crucial para determinar se os dados seguem uma distribuição gaussiana ou não. Dada a predominância de distribuições não normais em pelo menos um dos grupos para cada peptídeo, optou-se pela utilização de testes estatísticos não paramétricos para a comparação das medianas.

4.12.3. TESTE NÃO PARAMÉTRICO (MANN-WHITNEY):

Com base nos resultados dos testes de normalidade, o teste U de Mann-Whitney foi selecionado para comparar as medianas dos valores de IR entre os grupos de indivíduos positivos e negativos para cada peptídeo. Este teste é a escolha apropriada

quando os dados não seguem uma distribuição normal, garantindo a validade das comparações.

4.12.4. ANÁLISE DA CURVA ROC

Em seguida, a Curva ROC foi gerada para avaliar a capacidade diagnóstica de forma abrangente, analisando o desempenho do teste em todos os possíveis pontos de corte. A primeira informação crucial extraída foi a Área Sob a Curva (AUC), que funciona como uma medida global da capacidade discriminatória do peptídeo. A interpretação da AUC varia de 0.5, indicando um desempenho equivalente ao acaso, a 1.0, que representa uma capacidade de discriminação perfeita.

Em seguida, o Erro Padrão (*Std. Error*) foi calculado para indicar a precisão da estimativa da AUC. De forma complementar, o Intervalo de Confiança de 95% (95% CI) forneceu um intervalo para a verdadeira AUC populacional, com foco na inclusão ou não do valor de 0.5, o que indicaria se a capacidade discriminatória é superior ao acaso. Por fim, o P-valor foi determinado para verificar se a AUC era estatisticamente diferente de 0.50, confirmando assim se a capacidade de discriminação do peptídeo era de fato superior ao acaso.

4.12.5. SELEÇÃO DO PONTO DE CORTE IDEAL

A partir das tabelas de sensibilidade e especificidade geradas para cada peptídeo, o ponto de corte "ideal" foi selecionado. A prioridade foi dada ao ponto que apresentava o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, buscando minimizar a diferença entre esses dois parâmetros e, em alguns casos, maximizar o Índice de Youden (sensibilidade + especificidade - 1) para um desempenho geral otimizado.

4.12.6. CÁLCULO DETALHADO DAS MÉTRICAS DE DESEMPENHO

Após a seleção do ponto de corte ideal para cada peptídeo, foram feitos cálculos detalhados das seguintes métricas de desempenho, utilizando os dados brutos de IR das amostras testadas nos 6 peptídeos:

- **Verdadeiros Positivos (VP):** Número de pacientes doentes corretamente identificados.
- **Falsos Negativos (FN):** Número de pacientes incorretamente identificados como negativos.

- **Verdadeiros Negativos (VN):** Número de controles negativos corretamente identificados.
- **Falsos Positivos (FP):** Número de pacientes positivos incorretamente identificados como positivos.
- **Sensibilidade:** Proporção de VP em relação ao total de pacientes ($VP / (VP + FN)$).
- **Especificidade:** Proporção de TN em relação ao total de controles ($VN / (VN + FP)$).
- **Acurácia:** Proporção total de classificações corretas ($(VP + VN) / \text{Total de Amostras}$).
- **Valor Preditivo Positivo (VPP):** Probabilidade de um resultado positivo indicar a condição ($VP / (VP + FP)$).
- **Valor Preditivo Negativo (VPN):** Probabilidade de um resultado negativo descartar a condição ($VN / (VN + FN)$).

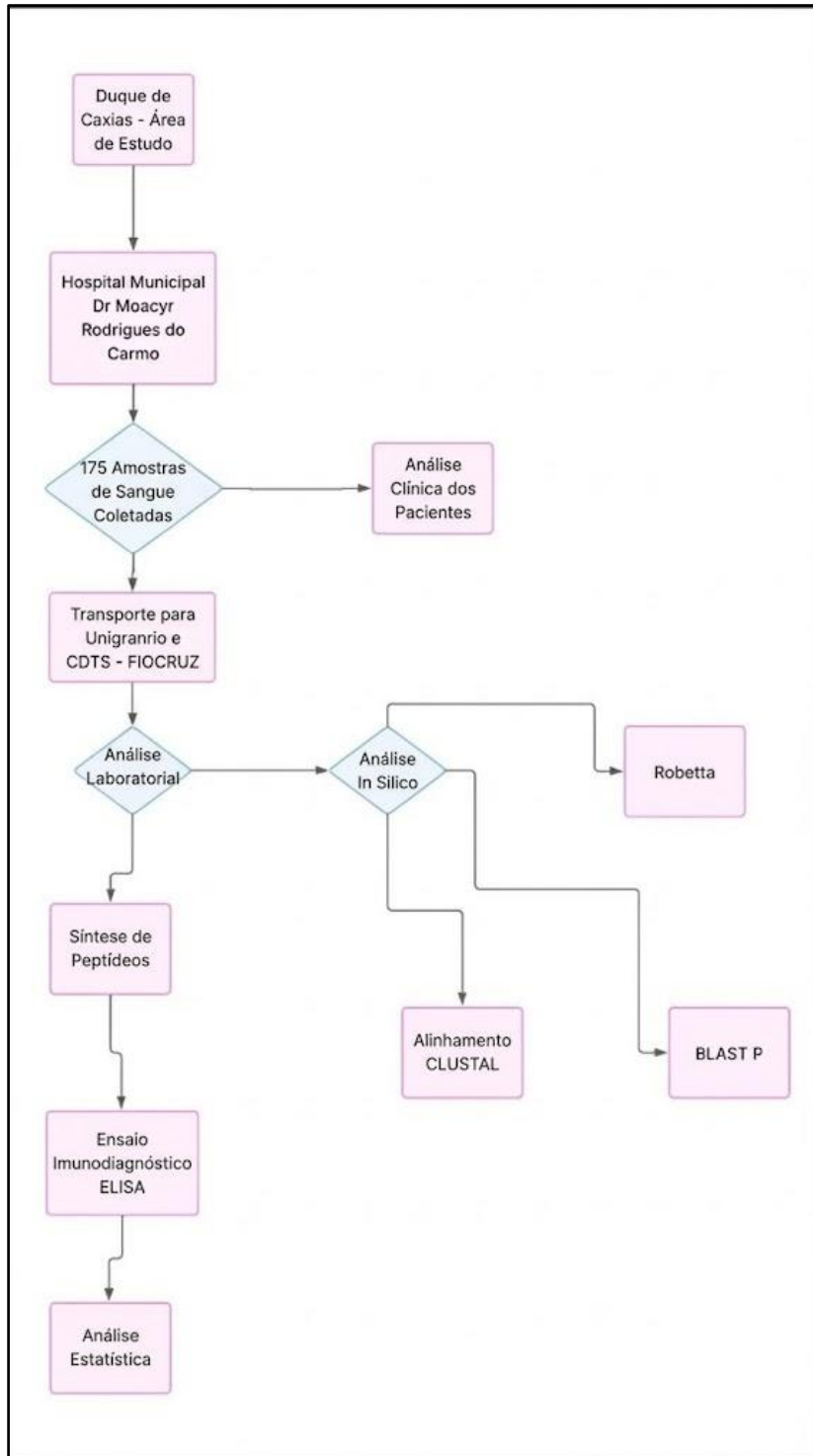
Essas métricas foram calculadas diretamente a partir dos dados brutos para garantir a máxima precisão.

4.13. VÍNCULO DA PESQUISA

Esta pesquisa está vinculada ao Grupo de Pesquisa (CNPq) intitulado “Biologia e Patologia de Organismos de Importância Médica e Ambiental” liderado pelo Dr. Sergian Vianna Cardozo e foi desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Proteína e Peptídeos, localizado no CDTS da FIOCRUZ, sob supervisão do Dr. Salvatore Giovanni De Simone.

Teve apoio financeiro do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP-CAPES).

Figura 15: Fluxograma da metodologia realizada



Fluxograma detalhando as etapas do estudo, começando pela área de estudo em Duque de Caxias e a coleta de 175 amostras de sangue no Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo. As

amostras foram transportadas para a UNIGRANRIO submetidas a análise clínica e, posteriormente, transportadas para o CDTS-FIOCRUZ, onde foram realizadas análises laboratoriais e *in silico*. As análises *in silico* incluíram o uso de Robetta, alinhamento CLUSTAL e *BLAST P*. Enquanto as análises laboratoriais envolveram a síntese de peptídeos e o ensaio imunodiagnóstico ELISA, culminando na análise estatística dos dados.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE CLÍNICA

No período de janeiro a junho de 2018 foram coletadas 175 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar (Hospital Municipal Moacir Rodrigues do Carmo) com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). Destas amostras, 45 (25.71%) foram classificadas como DEN, 30 (17.10%) como ZIK e 94 (53.71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugere um quadro epidêmico de CHIK no período estudado. Aqueles pacientes classificados como DENV/ZIKV (4/2,28%) e DENV/CHIKV (2/1,14%) apresentaram sintomatologia inespecífica para direcioná-los à uma das arboviroses.

Na última estimativa demográfica para a região estudada (IBGE, 2018), foi observado um quantitativo total da população do município de Duque de Caxias de 914.383 habitantes, sendo 444.445 (49,6%) do gênero masculino e 469.938 (51,4%) do gênero feminino.

O cálculo da idade mediana dos pacientes do presente estudo foi de 41 anos (intervalo entre 01 e 73 anos). A maioria dos casos foi do gênero feminino (88/169; 52.07%) e entre estes, chama-se atenção para o quantitativo de casos suspeitos do gênero feminino de ZIK na faixa etária de 20 a 39 anos (11/22; 50%).

Na análise individual das arboviroses observou-se diferença significativa ($p=0,0263$), entre ambos os gêneros, apenas para os casos prováveis de ZIK (Tabela 3).

Levando em consideração a população estimada da região estudada, estratificada nas faixas etárias de <20 e ≥ 60 anos (392.201) e 20 a 59 anos (522.182), observou-se diferença significativa ($p = 0,002$) para ZIK e CHIK (Tabela 3). Tal diferença foi impulsionada pela quantitativo de casos prováveis do gênero feminino para ZIK e masculino para CHIK.

Quanto aos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, entre os 45 casos suspeitos de DEN, a mialgia (29/45; 64.4%), artralgia leve (30/45; 66.7%) e cefaleia (35/45; 77.8%) foram os mais observados, além de 4/45 (8,8%) pacientes que apresentaram sintomas de discrasia. O exantema (30/30; 100%) e o prurido (27/30; 90%) foram observados principalmente nos pacientes suspeitos de ZIK, que apresentaram ainda hiperemia conjuntival em 12/30 (40%). Os pacientes suspeitos de CHIK apresentaram a

artralgia moderada/intensa (91/94; 96,8%) e a artrite (77/94; 81,9%) como sintomas mais frequentes (Tabela 3).

Tabela 2. Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de janeiro a junho/2018.

Gênero	Janeiro a junho/2018		
	DEN n = 45 (%)	ZIK n = 30 (%)	CHIK n = 94 (%)
Masculino	24 (53.3)	8 (26.6)	49 (52.1)
Feminino	21 (46.7)	22 (73.4)	45 (47.9)
<i>p</i> -values ($\alpha=0.05$)*	0,6274	0,0263	0,5620
Faixa etária			
<20 e ≥60	14 (28.6)	4 (33.3)	25 (33,3)
20 a 59	31 (71.4)	26 (66.7)	69 (66.7)
<i>p</i> -values ($\alpha=0.05$)*	0,1481	0,002	0,002
Sintomas			
Febre <38.5 C	20 (44,4)	14 (46,7)	36 (38,3)
Febre >38.5C	25 (55,6)	16 (53,3)	58 (61,7)
Exantema	2 (4,4)	30 (100)	23 (24,5)
Prurido	1 (2,2)	27 (90)	2 (2,1)
Mialgia	29 (64,4)	20 (66,7)	72 (76,6)
Artralgia leve	30 (66,7)	15 (50)	3 (3,2)
Artralgia mod/int.	1 (2,2)	13 (43,3)	91 (96,8)
Artrite	0 (0)	12 (40)	77 (81,9)
Conjuntivite	2 (4,4)	12 (40)	34 (36,2)
Cefaléia	35 (77,8)	22 (73,3)	74 (78,7)
Gânglio	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Discrasia	4 (8,8)	0 (0)	0 (0)
Neurológico	1 (2,2)	0 (0)	3 (3,2)

DEN - Dengue; ZIK - Zika vírus; CHIK – chikungunya; *Teste Qui-quadrado; mod/int. – moderada / intensa.

5.2. IMMUNOBLOTTING

Após o processo de mapeamento e síntese da membrana contendo as proteínas virais do CHIKV, foi realizado o *immunoblotting* para detectar e quantificar os spots que foram imunorreativos na presença de soro e plasma de pacientes testados positivamente para CHIKV previamente, por RT-PCR ou Imunodiagnóstico (Figura 16 – Imagem A).

Com o auxílio do programa *TotalLabTLL100*, versão, 2009 da *Nonliner Dynamics*, foi feita a busca para a intensidade de sinal referente a coloração de cada spot da membrana, 600 no total. Sendo considerados positivos para possível identificação de epítomos, spots com a intensidade de sinal maior ou igual a 30% do maior valor de sinal obtido em todos os spots da membrana.

Na figura 16 (Imagem B) e 17 (Imagem B) temos os gráficos representando a intensidade do sinal dos spots da membrana sintetizada após a realização do *immunoblotting*. Sendo a coloração vermelha uma intensidade maior (indo até 100%) e a coloração verde representando uma intensidade menor (indo até 0%).

Primeiramente temos gráficos representativos (Figura 16 – Imagens C, D, E, F e G) da análise de intensidade sinal de cada proteína estrutural (Capsídeo, E3, E2, E1 e 6K). Dessa maneira pode se destacar os spots que tiveram uma porcentagem elevada de intensidade do sinal indicando que os epítomos de aminoácidos contidos nesses spots, são os mais indicados para serem possíveis epítomos imunológicos do CHIK, uma vez que essa reatividade se dá através da ligação desse peptídeo com os anticorpos presentes nas amostras utilizadas durante o *immunoblotting*, juntamente do anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, mostrando seu possível potencial para utilização no imunodiagnóstico.

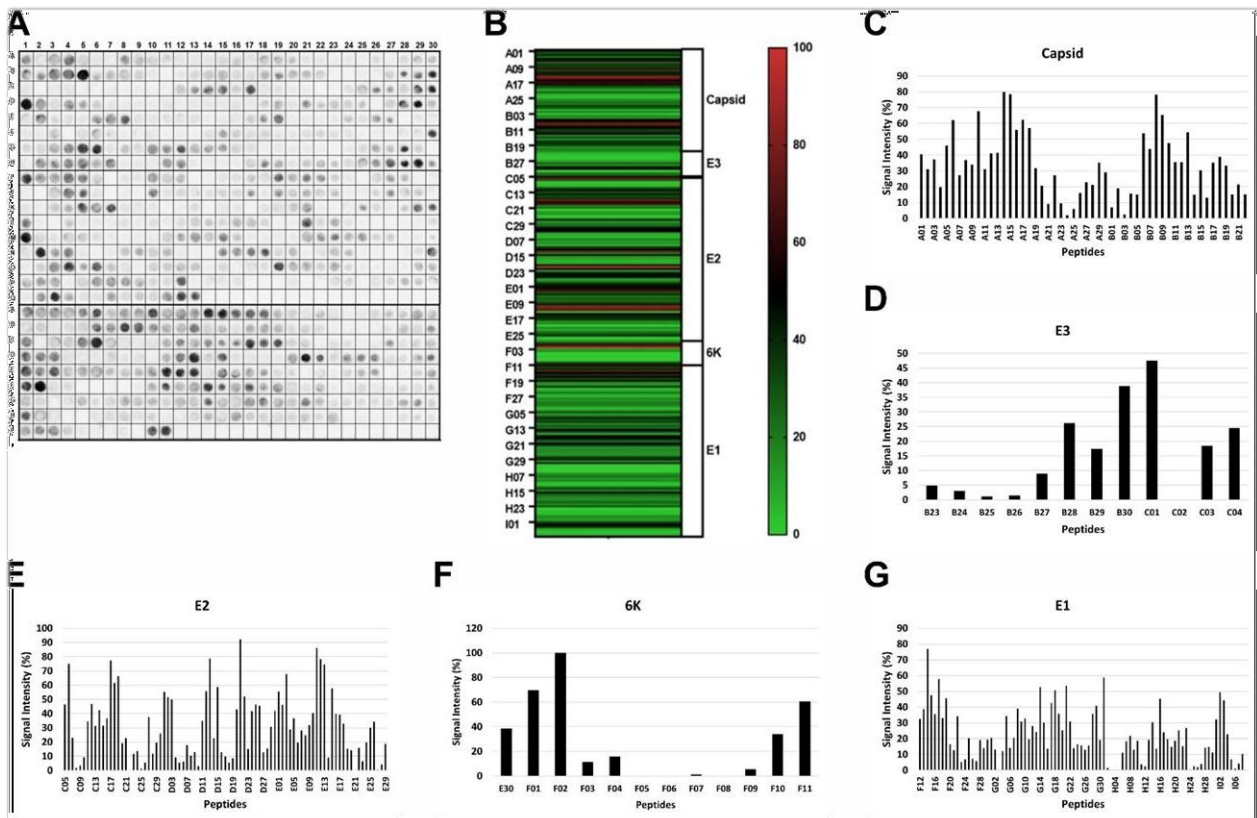


Figura 16. Interação da IgA humana com as diferentes proteínas estruturais do vírus da chikungunya durante o processo de síntese de peptídeos em membrana de celulose (Imagem A), utilizando um banco de dados como fonte e a poliproteína POLS_CHIK3 Structural polyprotein OS=chikungunya virus (strain 37997) - Q5XXP3.

Em seguida temos os resultados para as proteínas não estruturais através dos gráficos representativos (Figura 17 – Imagens C, D, E, F e G) da análise de intensidade sinal de cada proteína estrutural (Capsídeo, E3, E2, E1 e 6K). Dessa maneira pode se destacar os spots que tiveram uma porcentagem elevada de intensidade do sinal indicando que os epítomos de aminoácidos contidos nesses spots, são os mais indicados para serem possíveis epítomos imunológicos do CHIK, uma vez que essa reatividade se dá através da ligação desse peptídeo com os anticorpos presentes nas amostras utilizadas durante o

immunoblotting, juntamente do anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, mostrando seu possível potencial para utilização no imunodiagnóstico.

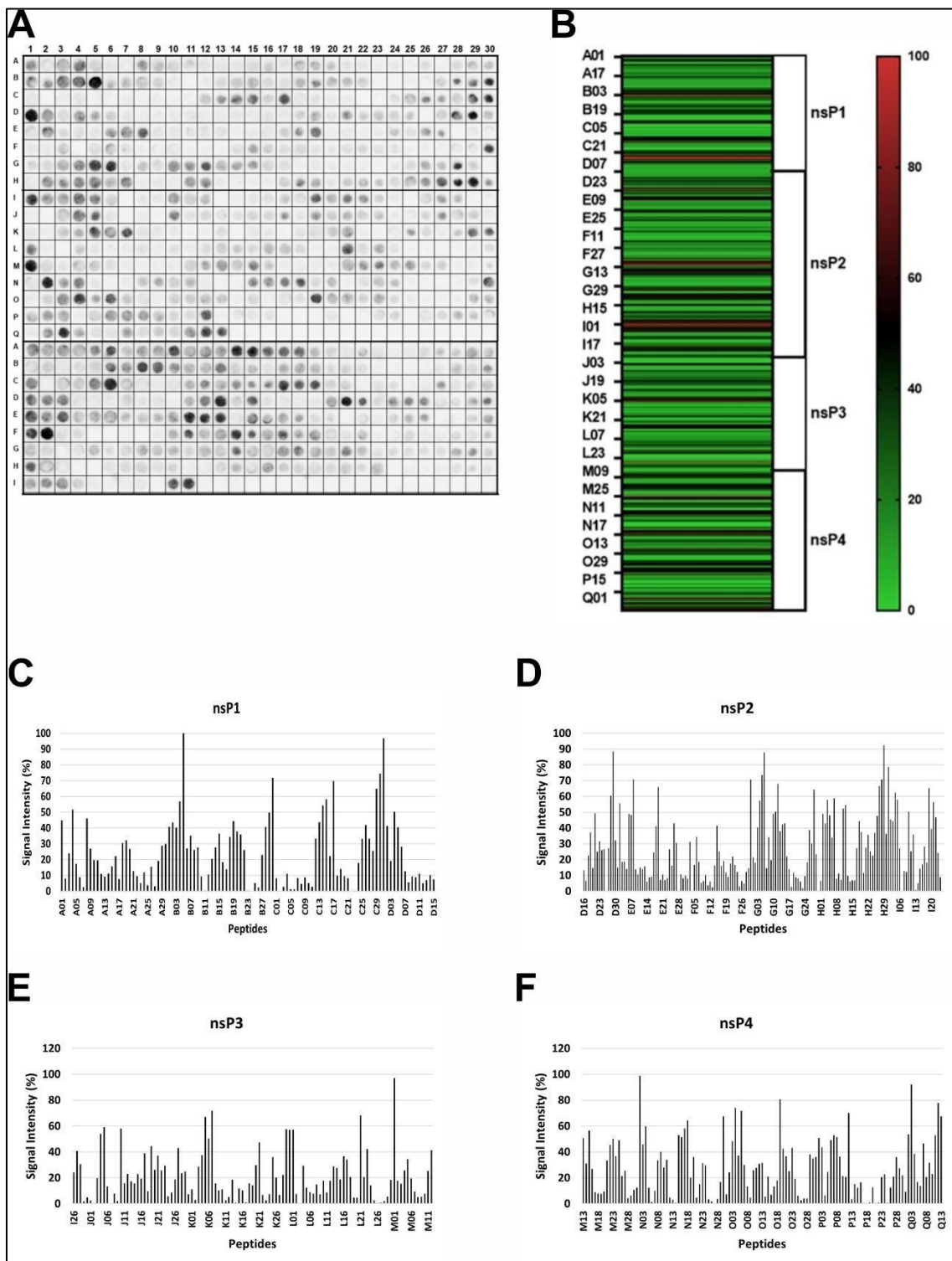


Figura 17. Interação da IgA humana com as diferentes proteínas não estruturais do vírus da chikungunya durante o processo de síntese de peptídeos em membrana de celulose (Imagem A), utilizando um banco de dados como fonte e a poliproteína POLN_CHIK3 Polyprotein P1234

OS=chikungunya virus (strain 37997) - Q5XXP4.

5.3. *BLAST P*

Após a análise das intensidades de sinal de cada poço, todos aqueles que foram considerados positivos (acima de 30%), passaram pelo processo de análise in silico para reatividade cruzada. Através da utilização da ferramenta *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) juntamente com o programa EXCELL, os epítomos selecionados foram comparados nos bancos de dados com outros patógenos humanos que apresentassem uma sequência de pelo menos 5 aminoácidos, o que indicaria uma alta similaridade proteica, podendo futuramente causar reatividade cruzada entre o CHIKV e outros patógenos humanos durante o ELISA, conseqüentemente gerando um diagnóstico não fidedigno. As sequências que não apresentaram reatividade cruzada foram escolhidas para análise de predição de estrutura terciária, com o objetivo de identificar a localização do epítomo na proteína. Esses epítomos escolhidos por não apresentarem reatividade cruzada foram: LLSKVPKTDL (nsp1), FGAPNETFPITFGDF (nsp3), LKKLQESASM (nsp4), SAVNKLTMRVPQQK (Capsídeo), PRRNRKNKKQ (Capsídeo), PKQKKQPPQKKPAQK (Capsídeo). Para o presente artigo utilizaremos a numeração seguinte para cada peptídeo: LLSKVPKTDL (nsp1) – 313, FGAPNETFPITFGDF (nsp3)- 314, LKKLQESASM (nsp4) – 315, SAVNKLTMRVPQQK (Capsídeo) - 316, PRRNRKNKKQ (Capsídeo) – 317 e PKQKKQPPQKKPAQK (Capsídeo) – 318.

Tabela 3. *BLAST P*

PROTEÍNA	AA LOCATION	PEPTIDE SEQUENCE	SIMILARITY WITH PATHOGENIC ORGANISMS
	1 até 15	MDPVYVDIDADSAFL	ONNV
	16 até 30	KALQRAYPMFEVEPR	ONNV, MAYV, RRV, GETV, WEEV e VEEV.
	36 até 50	DHANARAFSHLAIKL	ONNV, EEEV, RRV, GETV, MAYV, SINV, VEEV, BFV e WEEV.
	91 até 100	ERLANYARKL	ONNV, RRV e GETV.
	156 até 165	VHAPTSLYHQ	ONNV, GETV, SFV, RRV, EEEV e WEEV.
	171 até 185	RVAYWIGFDTPFMY	ONNV, VEEV, BFV, GETV, MAYV, SFV, EEEV, WEEV, RRV e SINV.

nsP1	221 até 235	RRGKLSIMRGKMKP	ONNV, MAYV, GETV e SINV.
	246 até 255	TLYPESRKLL	ONNV.
	296 até 310	LYGKTTGYAVTHHAD	ONNV, RRV, MAYV, SFV e GETV.
	366 até 380	IVVNGRTQRNTNTMK	ONNV, VEEV, RRV, GETV, MAYV, SFV, BFV, EEEV, WEEV e SINV.
	381 até 395	NYLLPVVAQAFSKWA	RRV, GETV, ONNV, MAYV, EEEV, WEEV, VEEV, SFV, SINV e BFV.
	426 até 440	QKTHTVYKRPDTQSI	ONNV, RRV, BFV, SFV, VEEV, <i>Mycobacterium simulans</i> , <i>Mycobacterium kyorinense</i> e <i>Mycobacterium fortuitum</i> .
	451 até 465	VVPSLWSSGLSIPLR	ONNV, SFV, MAYV, RRV e <i>Naegleria fowleri</i> .
	471 até 480	LLSKVPKTDL	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
nsP2	541 até 555	PRGAIKVTQAQPTDHV	ONNV e SFV.
	561 até 565	VLSPQ	Sem resultados encontrados
	591 até 600	RAGRYAVEAY	ONNV e SINV.
	606 até 620	VPSGYAISPEDFQSL	ONNV.
	636 até 650	RKLHHIALHGPAINT	ONNV, RRV, GETV e VEEV.
	691 até 700	LTNPPYHEFA	ONNV, SFV e SINV.
	731 até 740	IKNLVTRQDL	ONNV.
	761 até 775	NLEISARTVDSLLL	ONNV, RRV, GETV, VEEV, EEEV e WEEV.
	821 até 835	FFNMMQMKVNYNHNI	ONNV, BFV, SFV, GETV, SINV, WEEV, VEEV, EEEV, <i>Plasmodium knowlesi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> .
	896 até 910	RGWVKQLQIDYRGHE	GETV, RRV, ONNV, MAYV, SFV, SINV, VEEV, EEEV, WEEV e BFV.
	916 até 925	ASQGLTRKGV	ONNV, SINV, VEEV, RRV, EEEV, WEEV, GETV, MAYV, SFV e BBKV.
	926 até 935	YAVRQKVNEN	SINV, ONNV, SINV, RRV, GETV, SFV, MAYV, BFV e BBKV.
	936 até 950	PLYASTSEHVNVLLT	ONNV, VEEV, EEEV, BFV, SINV, RRV, SFV, WEEV, MAYV, SINV e GETV.
	956 até 970	LVWKTLSGDPWIKTL	ONNV, MAYV, RRV, GETV, BFV, VEEV, EEEV, WEEV, SFV e SINV.
	971 até 980	QNPPKGNFKA	ONNV e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .
	1036 até 1050	QIIQAFKEDRAYSPE	ONNV, MAYV, SFV, GETV, RRV e EEEV.
	1066 até 1080	DSGLFSKPLVSVHYA	ONNV.
	1081 até 1095	DNHWDNRPGGKMFGE	ONNV, RRV, GETV, SFV, MAYV e BFV.
	1106 até 1115	KYPFTKGKWN	ONNV.

	1136 até 1150	IIPANRRRLPHSLVAE	ONNV, BFV, SFV, GETV, MAYV, EEEV, VEEV e WEEV.
	1156 até 1170	GERMEWLVNKINGHH	ONNV, MAYV e SFV.
	1191 até 1205	PLGIRGADYTYNLEL	ONNV.
	1206 até 1215	GLPATLGRYD	ONNV.
	1221 até 1230	IHTPFRIHHY	ONNV e SFV.
	1256 até 1260	SSLIR	Sem resultados encontrados
	1291 até 1305	VTSNTEMFFLFSNFD	ONNV, GETV, SFV, RRV, MAYV e BFV.
	1306 até 1315	NGRRNFTTHV	ONNV.
nsP3	1336 até 1345	SYRVKRMDIA	ONNV.
	1371 até 1380	YKKWPESFKN	ONNV.
	1396 até 1410	YPVIHAVGPNFSNYS	ONNV, SFV, BFV, EEEV, GETV, RRV, MAYV, VEEV e WEEV.
	1441 até 1445	LLSTG	Sem resultados encontrados.
	1451 até 1465	KDRLTQSLNHLFTAL	VEEV, ONNV, GETV, SFV, RRV, EEEV, WEEV, BFV, <i>Borrelia duttonii</i> e MIDV.
	1481 até 1495	WEKKIAEAIQMRTQV	SFV, MIDV, ONNV, RRV e GETV.
	1521 até 1530	KGYSTTEGSL	SFV.
	1531 até 1540	YSYLEGTRFH	ONNV, EEEV, WEEV, GETV, RRV, MIDV, VEEV e BFV.
	1601 até 1615	MTPERVTRLRMNHVT	ONNV, MAYV, RRV, GETV e SINV.
	1621 até 1635	SSFPLPKYKIEGVQK	ONNV, RRV, GETV, MIDV, VEEV, SFV e SINV.
	1651 até 1660	RVSPREYKSP	<i>Candida viswanathii</i> e <i>Spirochaetales bacterium</i> .
	1731 até 1740	PVAPPPRRRG	<i>Mycobacterium shizuoka-1</i> , <i>Angiostrongylus cantonensis</i> e <i>Angiostrongylus costaricensis</i> .
	1761 até 1765	RFFRA	<i>Alphacoronavirus sp</i> e <i>Nocardia mangyaensis</i> .
	1801 até 1815	FGAPNETFPITFGDF	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
	1821 até 1835	ESLSSELLFGDFSP	<i>Arthoderma gypseum</i> .
	1867 até 1881	SSDTGPGHLQQRSVR	BFV, EEEV, GETV, MAYV, MIDV, ONNV, RRV, SFV, SINV, VEEV e WEEV.
	1911 até 1921	LKKLQESASM	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
	1922 até 1931	ANRSRYQSRK	ONNV, MAYV, EEEV, WEEV, VEEV, SINV, RRV, GETV, SFV, BFV, MIDV, RRV e EVEV.
	1957 até 1971	KVPTYRTTYPAPVYS	ONNV e GETV.
	1992 até 2006	LARNYPTVASYQITD	MAYV, ONNV, SFV, MIDV, SINV, GETV, EEEV e WEEV.

nsP4	2032 até 2051	LRSYPKQHSYHAPTIRSAV P	ONNV, SFV, SINV, VEEV, GETV, MAYV, WEEV, RRV, MIDV e EEEV.
	2062 até 2076	LAAATKRNCNVTQMR	ONNV, VEEV, RRV, EEEV, WEEV, GETV, MAYV, SFV, BFV, MIDV e SINV.
	2097 até 2111	NQEYWKEFAASPIRI	ONNV.
	2117 até 2136	TTYVTKLKGPKAAALFAK TH	SFV, RRV, GETV, BFV, ONNV, EEEV, MAYV, VEEV, SINV e MIDV.
	2162 até 2171	GTKHTEERP	SINV, ONNV, VEEV, RRV, EEE, WEEV, GETV, MAYV, SFV, BFV, MIDV e BBKV.
	2192 até 2206	ELVRRLNAVLLPNVH	ONNV, MIDV, VEEV, EEEV, WEEV, MAYV, SINV, SFV, RRV, GETV, BFV, RNV e <i>Trypanossoma cruzi</i> .
	2212 até 2226	SAEDFDAIIAAHFKP	ONNV, RRV, GETV, MAYV, SINV, BFV, VEEV, SFV, MIDV, EEEV e WEEV.
	2242 até 2256	QDDSLALTALMLLED	RRV, GETV, ONNV, BFV, MAYV, SFV, MIDV e VEEV.
	2262 até 2271	PLLDLIEAAF	WEEV, ONNV, EEEV, GETV, MAYV, SFV, RRV.
	2282 até 2296	GTRFKFGAMMKSGMF	SINV, ONNV, EEEV, RRV, WEEV, GETV, MAYV, SFV, BFV, MIDV, VEEV e BBKV.
	2307 até 2321	ITIASRVLEDRLTRS	ONNV, SFV, MAYV, MIDV e SINV.
	2387 até 2401	DPLKRLFGLKPLAA	ONNV, VEEV, SFV, SINV, RRV, GETV, MAYV, MIDV, EEEV, WEEV, BFV, RNV, EVEV e <i>Taenia asiática</i> .
	2412 até 2426	ALADEVVRWQRTGLT	ONNV.
	2432 até 2446	AVHSRYEVQGISVVV	ONNV.
	2457 até 2471	SNFEKLRGPVVTLYG	ONNV e RRV.
Capsídeo	1 até 15	MEFIPTQTFYNRRYQ	ONNV, BFV, MIDV, RRV, GETV e SFV.
	26 até 35	QVIRPRRPQ	<i>Mycobacteroides abscessus</i>
	46 até 60	SAVNKLTMRAPVQQK	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
	61 até 70	PRRNRKNNKQ	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
	71 até 80	RQKKQAPQND	MIDV, <i>Mycobacteroides abscessus</i> e SFV.
	81 até 95	PKQKKQPPQKKPAQK	Sem reatividade cruzada com outros patógenos do homem.
	141 até 155	KGIDNADLAKLAFK	ONNV, SFV, MIDV, BFV, RRV, GETV, MAYV e UNAV.
	186 até 200	YNNWHHGAVQYSGGR	ONNV, SINV, RRV, GETV, SFV, VEEV, BFV, WEEV, MAYV, MIDV e EEEV.
	211 até 225	GDSGRPIFDNKGRVV	Una vírus, Middelburg vírus, RRV, GETV, SFV, ONNV, MAYV, EEEV, BFV, WEEV, VEEV e SINV.
	236 até 250	ARTALSVVTWKNKDIV	ONNV, MIDV, BFV, SFV, MAYV, RRV, GETV, VEEV, SINV, EEEV e WEEV.
E3	301 até 310	DNVMRPGYYQ	ONNV.
	326 até 340	STKDNFNVYKATRPY	RRV, ONNV, SFV e GETV.
	356 até 365	PIALERIRNE	ONNV e <i>Loa Loa</i> (filaria loa).

E2	366 até 375	ATDGLTKIQV	ONNV e MAYV.
	381 até 395	IKTDDSHDWTCLRYM	ONNV.
	431 até 445	PKGETLVGFTDSRK	ONNV.
	451 até 465	THPFHHEPPVIGRER	ONNV.
	511 até 525	GNVKITVNGQTVRYK	ONNV, MAYV, RRV, GETV, <i>Tsukamurella paurometabola</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
	551 até 565	HAAVTNHKNWQYNSP	ONNV, GETV e RRV.
	571 até 585	AELGDRKGGKIHIPFP	ONNV, MAYV e SFV.
	601 até 615	VTYGKNQVTMLLYPD	ONNV.
	621 até 635	SYRNMGQEPNYHEEW	ONNV, SFV e UR.
	651 até 665	LEVTWGNNEPYKYWP	ONNV.
	671 até 685	GTAHGHPHEIILYYY	ONNV, GETV, MAYV e RRV.
	726 até 735	ELTPGATVPF	ONNV.
6K	756 até 770	AYLWNEQQPLFWLQA	ONNV, <i>Naegleria fowleri</i> e <i>Arthroderma otae</i> .
	801 até 815	SIGAHTVSAYEHVTV	ONNV.
E1	816 até 830	IPNTVGVYPYKTLVNR	ONNV.
	831 até 845	PGYSPMVLEMELQSV	ONNV.
	856 até 870	ITCEYKTVIPSPYVK	SFV, GETV, ONNV, RRV, MAYV e MIDV.
	921 até 935	ESCKTEFASAYRAHT	ONNV.
	936 até 950	ASASAKLRVLYQGNN	ONNV.
	966 até 980	KDAKFVVGPMSSAWT	ONNV e EEEV.
	986 até 1000	IVVYKGDVYNMDYPP	ONNV, MIDV, RRV, GETV e SFV.
	1001 até 1015	FGAGRPGQFGDIQSR	ONNV, MAYV, VEEV, RRV, GETV, SFV e BFV.
	1041 até 1050	PYSQAPSGFK	ONNV.
	1051 até 1065	YWLKERGASLQHTAP	ONNV.
	1126 até 1140	IIKYTASKKGKCAVH	ONNV e VEEV.
	1206 até 1220	LGVQDISTTAMSWVQ	ONNV.

Após a seleção das sequências de aminoácidos das principais proteínas do vírus CHIKV (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4, E1, E2, E3, C e 6K), uma análise computacional foi conduzida para avaliar a

possibilidade de reatividade cruzada com outros patógenos humanos. Nessa análise, foram considerados tanto a intensidade do sinal quanto a correspondência da sequência com peptídeos do CHIKV. Para isso, utilizamos o BLAST, uma ferramenta de bioinformática amplamente reconhecida, que compara sequências de aminoácidos, RNA ou DNA para identificar similaridades e outras informações relevantes sobre a sequência em questão.

5.4. ESTRUTURA TERCIÁRIA

Com a predição de estrutura terciária de cada epítopo, é possível identificar sua posição na proteína e avaliar seu potencial para utilização no diagnóstico, uma vez que quanto mais exposta ou na superfície (principalmente em proteínas em formato de hélice ou *coil*), teoricamente maior será sua imunogenicidade, gerando uma maior reatividade contra anticorpos para o CHIKV (Figura 18, Figura 19, Figura 20 e Figura 21).

Figura 18. Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp1.

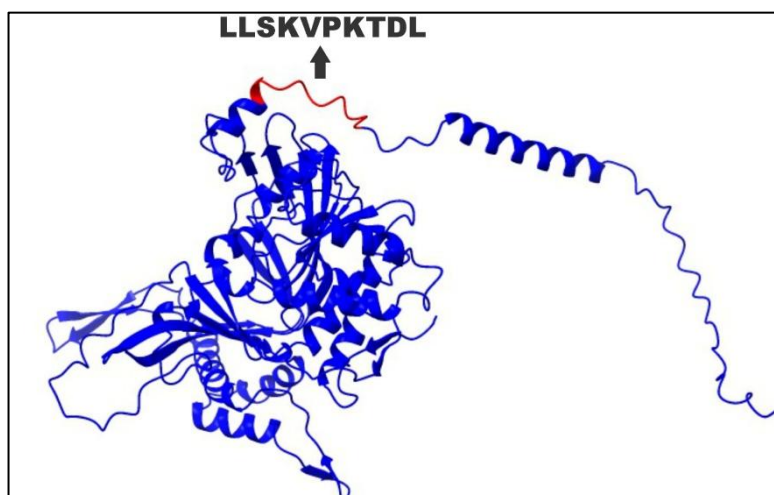


Figura 19. Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp3.

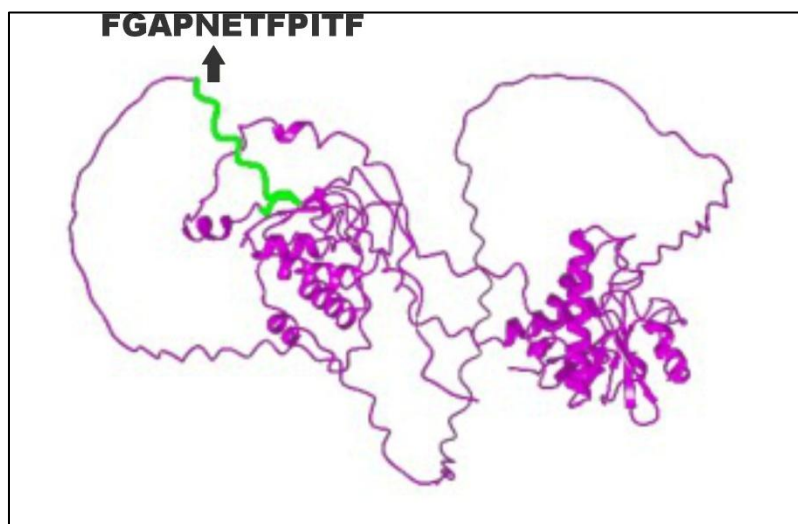


Figura 20. Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína não estrutural nsp4.

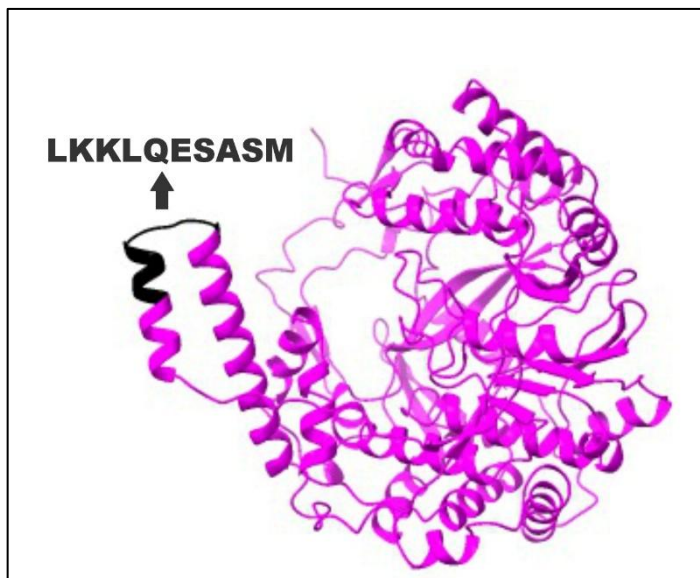
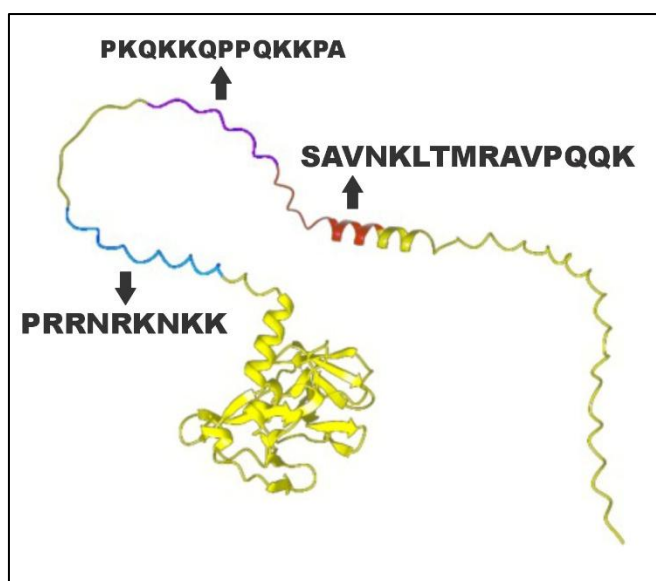


Figura 21. Gráfico de predição de estrutura terciária da proteína estrutural do Capsídeo.



6. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)

Os ensaios de ELISA foram realizados para avaliar a reatividade sérica aos seis peptídeos sintéticos. Após o experimento, os resultados de Densidade Óptica (DO) foram convertidos em Índice de Reatividade (IR) para cada amostra, e as comparações foram feitas entre grupos de indivíduos classificados como "Positivos" e "Negativos", conforme ilustrado na Figura 22.

O gráfico de *box-plot* para o Pep 313 (Figura 22 – Imagem A) mostra que o grupo "positivos" (caixa azul) apresentou um Índice de Reatividade (IR) mediano ligeiramente

superior ao grupo negativo (caixa vermelha). A dispersão dos dados sugere uma sobreposição considerável entre os dois grupos, embora a mediana do grupo positivo esteja em torno de 0.5 e a dos negativos um pouco abaixo. Similarmente ao Pep 313, o Pep 314 (Figura 22 – Imagem B) demonstrou uma tendência do grupo positivos de apresentar valores de IR medianos um pouco maiores do que o grupo negativos. No entanto, a variação dentro de cada grupo é ampla, e a sobreposição é evidente, indicando que a distinção entre os grupos com base apenas no IR pode ser limitada.

Para o Pep 315 (Figura 22 – Imagem C), observa-se que as medianas dos IRs para os grupos positivos e negativos são bem próximas, com uma ligeira vantagem para os positivos. A amplitude dos dados, especialmente no grupo positivos, sugere uma heterogeneidade na reatividade. A grande sobreposição indica uma dificuldade em diferenciar claramente os grupos apenas pelo IR. Analisando o Pep 316 (Figura 22 – Imagem D) exibe uma mediana de IR no grupo positivos que é marginalmente mais alta que a do grupo negativos. Contudo, as distribuições de IR para ambos os grupos são bastante semelhantes em termos de medianas, quartis e dispersão geral, o que sugere uma fraca capacidade discriminatória deste peptídeo entre os grupos estudados.

No caso do Pep 317 (Figura 22 – Imagem E), a mediana do IR para o grupo positivos parece ser um pouco mais elevada em comparação com o grupo negativos. No entanto, a sobreposição das distribuições é notável, indicando que este peptídeo, isoladamente, pode não ser um forte discriminador. A variabilidade nos IRs é considerável em ambos os grupos. Por fim, o Pep 318 (Figura 22 – Imagem F) apresenta um padrão onde a mediana do IR para o grupo positivos é um pouco superior à do grupo negativos. Embora haja uma diferença visual nas medianas, a ampla sobreposição das caixas e bigodes em ambos os grupos sugere que a reatividade a este peptídeo é heterogênea e não permite uma clara distinção entre os grupos positivos e negativos apenas com base no IR.

De modo geral, a análise dos *box-plots* para os seis peptídeos revela que, embora os grupos positivos tendam a apresentar medianas de Índice de Reatividade ligeiramente maiores que os grupos negativos, a sobreposição significativa nas distribuições dos IRs é uma característica comum a todos os peptídeos. Isso sugere que, individualmente, nenhum dos peptídeos avaliados neste ensaio de ELISA demonstra uma capacidade robusta e isolada para distinguir de forma clara e inequívoca os grupos positivos e negativos com base apenas no Índice de Reatividade. Para uma avaliação mais precisa da

capacidade discriminatória desses peptídeos, foi necessária a aplicação de testes estatísticos de significância (e.g., *Mann-Whitney U test*, *t-test*, dependendo da normalidade da distribuição, e curva ROC).

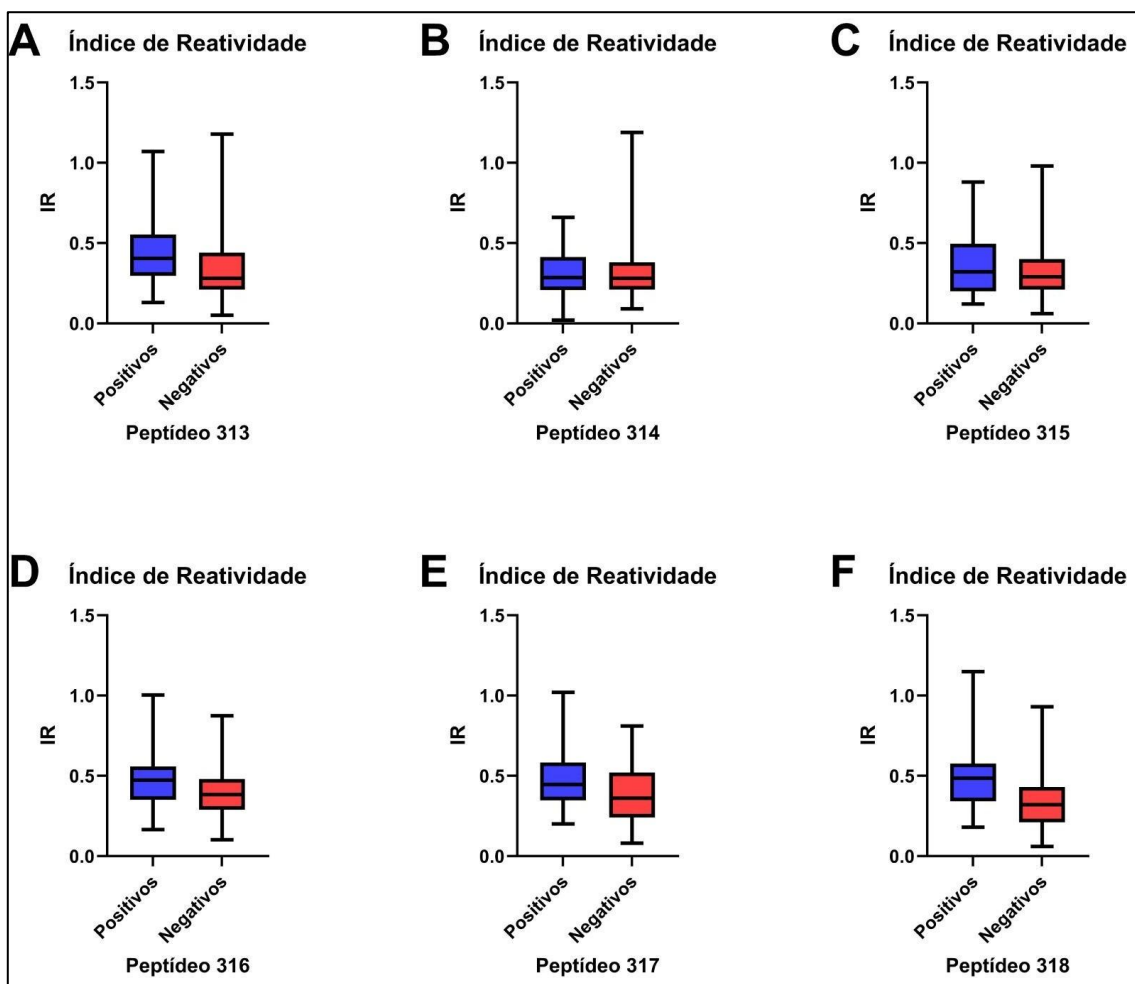


Figura 22. A figura apresenta seis gráficos de box-plot (A-F) que comparam os Índices de Reatividade (IR) obtidos por ELISA para os peptídeos Pep 313, Pep 314, Pep 315, Pep 316, Pep 317 e Pep 318 entre dois grupos de amostras: positivos (barras azuis) e negativos (barras vermelhas). Em cada gráfico, a caixa representa o intervalo interquartil (IQR), a linha horizontal dentro da caixa indica a mediana, e os bigodes (*whiskers*) se estendem até 1,5 vezes o IQR além dos quartis. Os valores individuais situados fora dessa faixa seriam representados como outliers, embora não haja nenhum visível nestes gráficos. O eixo vertical representa o Índice de Reatividade (IR), variando de 0 a 1.5, enquanto o eixo horizontal distingue os grupos Positivos e Negativos para cada peptídeo. A análise visual permite comparar a distribuição dos IRs entre os grupos para cada peptídeo, avaliando a potencial capacidade de cada peptídeo em distinguir entre as amostras dos grupos positivos e negativos.

7. TESTES ESTATÍSTICOS

7.1. PEPTÍDEO 313

As análises preliminares de normalidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk, indicaram que o grupo de amostras negativas não seguia uma distribuição normal, enquanto o grupo de amostras positivas se mostrou normal. Dada essa característica, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparar as medianas dos valores de Reatividade Imune (IR) entre os grupos. Este teste revelou uma diferença estatística significativa entre os grupos positivo e negativo ($p < 0.05$), sugerindo que o Peptídeo 313 possui potencial diagnóstico. Conforme esperado, a reatividade média foi consistentemente maior nas amostras de indivíduos positivos.

Para a avaliação diagnóstica, a Curva ROC para o peptídeo 313 (Figura 23 – Imagem A) apresentou uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.6825, o que classifica sua capacidade discriminatória como razoável a moderada. O Intervalo de Confiança de 95% para a AUC, variando de 0.5696 a 0.7954, não incluiu o valor 0.50, reforçando a ideia de que a discriminação observada não é atribuída ao acaso. Adicionalmente, o p-valor de 0.0046 confirmou que a AUC é estatisticamente diferente de 0.50, conferindo significância estatística à sua capacidade de diferenciar os grupos.

Para aprofundar a compreensão do desempenho diagnóstico, escolhemos o ponto de corte de 0.3300, por ser considerado o mais equilibrado entre as opções disponíveis. Ao aplicar esse corte diretamente aos dados de 30 amostras positivas e 63 negativas, obtivemos as seguintes classificações: identificamos 22 Verdadeiros Positivos (VP) e 44 Verdadeiros Negativos (VN). Contudo, também observamos 19 Falsos Positivos (FP) e 8 Falsos Negativos (FN).

Com base nessas classificações, as métricas de desempenho do teste foram reveladas. A sensibilidade alcançou 73,33% (22/30), o que demonstra a capacidade do teste em identificar corretamente a maioria dos indivíduos que de fato possuem a condição. A especificidade, por sua vez, foi de 69,84% (44/63), indicando a eficácia do teste em reconhecer indivíduos que não apresentam a condição.

A acurácia geral do teste foi de 70,97% (66/93), representando a proporção total de classificações corretas em relação ao total de amostras. Ao analisar os valores preditivos, o Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 53,66% (22/41), sugerindo que um

resultado positivo tem pouco mais da metade de chance de realmente indicar a presença da condição. Em contraste, o Valor Preditivo Negativo (VPN) destacou-se com 84,62% (44/52), ressaltando a alta confiabilidade de um resultado negativo para descartar a condição em questão.

O peptídeo 313 se destaca por sua capacidade estatisticamente significativa de discriminação. A utilização do ponto de corte de 0.3300 resultou em um equilíbrio razoável entre sensibilidade e especificidade, consistente com sua AUC moderada. Embora o teste seja mais eficaz para excluir a condição (alto VPN), sua capacidade de confirmação (VPP) é mais limitada, indicando que um resultado positivo pode necessitar de cautela e métodos confirmatórios adicionais.

7.2. PEPTÍDEO 314

A avaliação de normalidade para o peptídeo 314, pelo teste de Shapiro-Wilk, revelou que tanto o grupo de amostras negativas ($p < 0.0001$) quanto o de positivas ($p = 0.0603$) não apresentaram distribuição normal, embora o grupo positivo estivesse no limite da normalidade. Consequentemente, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para a comparação das medianas. Os resultados do Mann-Whitney indicaram um p-valor de 0.7359, o que é não significativo ($p > 0.05$) e implica que o Peptídeo 314 não consegue discriminar os grupos de amostras positivas e negativas. As medianas dos grupos (Negativos: 0.2800; Positivos: 0.2850) foram praticamente idênticas, corroborando a ausência de separação estatística.

A análise da Curva ROC para o peptídeo IR_314 (Figura 23 – Imagem B) reforçou esses achados, apresentando uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.5220. Este valor, extremamente próximo de 0.50, indica uma capacidade de discriminação muito baixa, quase aleatória. O Intervalo de Confiança de 95% para a AUC, de 0.3997 a 0.6442, incluiu o valor 0.50, o que significa que não há evidência estatística de que o peptídeo possua qualquer capacidade discriminatória real além do acaso. O p-valor de 0.7331 (maior que 0.05) corroborou que a AUC não é significativamente diferente de 0.50, confirmando a ausência de significância estatística.

Apesar de um desempenho geral que se mostrou limitado, decidimos explorar um ponto de corte alternativo de 0.2750 para uma análise mais minuciosa. Este valor foi escolhido por apresentar um certo equilíbrio dentro da tabela ROC. Ao aplicarmos este ponto de corte aos nossos dados brutos – compostos por 30 amostras positivas e 63

negativas – as classificações resultantes foram as seguintes: 18 Verdadeiros Positivos (VP) e 33 Verdadeiros Negativos (VN). Contudo, também identificamos um número considerável de 30 Falsos Positivos (FP) e 12 Falsos Negativos (FN).

Com base nestes resultados, as métricas de desempenho foram calculadas. A sensibilidade do teste foi de 60,00% (18/30), o que significa que 60% dos pacientes que realmente possuíam a condição foram corretamente identificados. Já a especificidade ficou em 52,38% (33/63), indicando que pouco mais da metade dos indivíduos sem a doença foram corretamente reconhecidos.

A acurácia geral do teste foi de 54,84% (51/93), revelando que apenas cerca de 55% de todas as amostras foram classificadas corretamente, um desempenho que se aproxima do acaso. O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 37,50% (18/48), sugerindo que um resultado positivo do teste tem uma chance relativamente baixa – menos de 40% – de realmente indicar a presença da condição, o que implicaria que a maioria dos resultados positivos poderiam ser falsos. Por outro lado, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi mais promissor, atingindo 73,33% (33/45). Este dado é relevante, pois indica uma confiança razoável: se o teste apresentar um resultado negativo, há mais de 70% de chance de que o indivíduo realmente não tenha a condição.

Em síntese, o peptídeo 314 possui uma capacidade discriminatória extremamente limitada e não é estatisticamente diferente de um teste aleatório. Sua baixa performance, com sensibilidade e especificidade próximas de 50%, o torna não confiável ou eficaz como biomarcador para o diagnóstico em questão.

7.3. PEPTÍDEO 315

A avaliação de normalidade para o peptídeo 315, utilizando o teste de Shapiro-Wilk, concluiu que ambos os grupos não apresentavam distribuição normal. Diante disso, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi o método escolhido para comparar as medianas. O resultado do Mann-Whitney revelou um p-valor de 0.5908, que é não significativo ($p > 0.05$) e indica que o Peptídeo IR_315 não diferencia bem os grupos de amostras positivas e negativas. A diferença entre as medianas foi muito pequena (0.0300), corroborando a falta de poder discriminatório estatístico.

A análise da Curva ROC do peptídeo 315 (Figura 23 – Imagem C) corrobora esses achados, exibindo uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.5349. Este valor, extremamente

próximo de 0.50, denota uma capacidade de discriminação muito baixa, quase igual ao acaso. O Intervalo de Confiança de 95% para a AUC, de 0.4070 a 0.6628, incluiu o valor 0.50, indicando que a AUC observada não é estatisticamente diferente de 0.50, e que qualquer capacidade discriminatória real não pode ser confirmada. O p-valor de 0.5875, maior que 0.05, confirmou a ausência de evidência estatística significativa.

Para os cálculos detalhados de desempenho, com um total de 30 amostras positivas e 63 negativas, escolhemos o ponto de corte de 0.3150. Este foi identificado como o mais equilibrado na tabela de sensibilidade/especificidade, buscando uma otimização entre ambas as métricas. Ao aplicarmos este corte, obtivemos 18 Verdadeiros Positivos (VP) e 34 Verdadeiros Negativos (VN). Contudo, também registramos 29 Falsos Positivos (FP) e 12 Falsos Negativos (FN).

Com base nessas classificações, as métricas de desempenho foram calculadas. A sensibilidade do teste foi de 60,00% (18/30), indicando que o teste conseguiu identificar corretamente 60% dos pacientes que realmente possuíam a condição. A especificidade, por sua vez, atingiu 53,97% (34/63), mostrando que aproximadamente 54% dos indivíduos sem a condição foram corretamente identificados.

A acurácia geral do teste ficou em 55,91% (52/93), o que revela que o teste classificou corretamente pouco mais da metade de todas as amostras, um desempenho que, embora superior ao acaso, ainda demonstra espaço para melhorias. O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 38,30% (18/47), sugerindo que um resultado positivo do teste tem apenas 38,30% de chance de realmente ser verdadeiro, o que significa que muitos resultados positivos podem não corresponder à presença da condição. Em contrapartida, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi mais robusto, alcançando 73,91% (34/46). Este valor é particularmente relevante, pois indica que, se o teste retornar um resultado negativo, há uma chance razoável de que o indivíduo realmente não tenha a condição.

Com base em sua AUC próxima de 0.50 e p-valor não significativo, o peptídeo 315 possui uma capacidade discriminatória extremamente limitada. Seu desempenho é indistinguível de um teste aleatório, tornando-o não eficaz ou confiável como biomarcador para a condição em estudo.

7.4. PEPTÍDEO 316

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk para o peptídeo 316 mostrou que o grupo de amostras negativas não seguia uma distribuição normal ($p = 0.0110$), enquanto o grupo positivo foi considerado normal, embora limítrofe ($p = 0.0512$). Devido à não normalidade do grupo negativo, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi o escolhido para a comparação das medianas. Este teste revelou um p-valor de 0.0361, que é estatisticamente significativo ($p < 0.05$), indicando que o Peptídeo 316 consegue discriminar os grupos de amostras positivas e negativas. A diferença entre as medianas (Negativos: 0.3830; Positivos: 0.4725) foi de 0.0895, considerada modesta, mas relevante para a separação dos grupos.

A análise da Curva ROC para o peptídeo 316 (Figura 23 – Imagem D) apresentou uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.6347, o que a classifica como uma capacidade de discriminação razoável, mas ainda fraca. No entanto, essa AUC é estatisticamente significativa, com um p-valor de 0.0365 e um Intervalo de Confiança de 95% de 0.5161 a 0.7532, onde o limite inferior é maior que 0.50, confirmando que a discriminação é real e não aleatória.

Seguindo a análise, escolhemos o ponto de corte de 0.4145, que se mostrou o mais equilibrado em nossa tabela. Ao aplicarmos este corte, obtivemos 18 Verdadeiros Positivos (VP) e 38 Verdadeiros Negativos (VN). No entanto, também registramos 25 Falsos Positivos (FP) e 12 Falsos Negativos (FN).

Com estes resultados, as métricas de desempenho foram calculadas. A sensibilidade do teste foi de 60,00% (18/30), indicando que ele conseguiu identificar corretamente 60% dos pacientes que realmente possuíam a condição. A especificidade, por sua vez, atingiu 60,32% (38/63), mostrando que aproximadamente 60% dos indivíduos sem a condição foram corretamente identificados.

A acurácia geral do teste ficou em 60,22% (56/93), o que significa que o teste classificou corretamente cerca de 60% de todas as amostras. O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 41,86% (18/43). Esse dado sugere que um resultado positivo do teste tem apenas 41,86% de chance de ser verdadeiro, o que nos mostra que mais da metade dos resultados positivos poderiam ser falsos. Por outro lado, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 76,00% (38/50). Isso indica que, se o teste caracterizar um resultado negativo, há uma utilidade considerável para descartar a condição em questão.

Dessa forma, o Peptídeo 316 demonstra uma capacidade de discriminação estatisticamente significativa e um excelente equilíbrio entre sensibilidade e especificidade no ponto de corte de 0.4145. Apesar do equilíbrio, sua performance geral ainda é considerada razoável a fraca. Embora seu VPP seja limitado, seu VPN forte sugere que pode ser útil para descartar a condição. Pode ter utilidade em um contexto mais amplo, mas não é um biomarcador forte ou altamente preciso por si só.

7.5. PEPTÍDEO 317

A avaliação de normalidade para o peptídeo 317, por meio do teste de Shapiro-Wilk, revelou que ambos os grupos não apresentavam distribuição normal. Diante disso, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi o método escolhido para comparar as medianas. O resultado do Mann-Whitney revelou um p-valor de 0.0483, que é estatisticamente significativo ($p < 0.05$), indicando que o Peptídeo IR_317 consegue discriminar entre as amostras positivas e negativas. A diferença entre as medianas (negativos: 0.3600; positivos: 0.4450) foi de 0.0850, considerada razoável e indicativa de uma separação entre os grupos.

A análise da Curva ROC para o peptídeo 317 (Figura 23 – Imagem E) apresentou uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.6270, indicando uma capacidade de discriminação razoável, mas ainda fraca. O p-valor de 0.0486 e o Intervalo de Confiança de 95% de 0.5124 a 0.7416, com o limite inferior maior que 0.50, confirmam que a discriminação é estatisticamente significativa e não aleatória.

Continuando nossas análises, com as mesmas 30 amostras positivas e 63 negativas, investigamos o desempenho utilizando o ponto de corte de 0.4150, que se mostrou o mais equilibrado em nossa avaliação. Com a aplicação deste critério, obtivemos 15 Verdadeiros Positivos (VP) e 40 Verdadeiros Negativos (VN). No entanto, também identificamos 23 Falsos Positivos (FP) e 15 Falsos Negativos (FN).

Com base nestes resultados, as métricas de desempenho foram calculadas. A sensibilidade do teste foi de 50,00% (15/30), indicando que metade dos pacientes que realmente possuem a condição foram corretamente identificados. A especificidade, por sua vez, atingiu 63,49% (40/63), mostrando que aproximadamente 63% dos indivíduos sem a condição foram corretamente reconhecidos.

A Acurácia geral do teste ficou em 59,14% (55/93), o que significa que o teste classificou corretamente cerca de 59% de todas as amostras. O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 39,47% (15/38), sugerindo que, se o teste for positivo, há pouco mais de 39% de chance de o indivíduo realmente ter a condição. Por outro lado, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 72,73% (40/55). Este valor é particularmente relevante, pois indica que, se o teste retornar um resultado negativo, há uma chance considerável de que o indivíduo realmente não tenha a condição.

O Peptídeo 317 demonstrou uma capacidade de discriminação estatisticamente significativa, porém moderada. No ponto de corte de 0.4150 ele apresenta um desempenho equilibrado, mas com valores de sensibilidade de 50% e especificidade de quase dois terços, o que sugere que não seria suficiente como um teste diagnóstico único e perfeito.

7.6. PEPTÍDEO 318

A avaliação de normalidade para o peptídeo IR_318, realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, indicou que ambos os grupos falharam no teste de normalidade. Consequentemente, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi o método empregado para comparar as medianas dos grupos. O teste revelou que o Peptídeo 318 consegue discriminar os grupos positivo e negativo com alta significância estatística. A diferença entre as medianas foi a maior observada até agora entre todos os peptídeos analisados, o que demonstra um excelente desempenho estatístico inicial.

A análise da Curva ROC para o peptídeo 318 (Figura 23 – Imagem F) revelou uma Área Sob a Curva (AUC) de 0.6926, indicando uma capacidade de discriminação moderada. O p-valor de 0.0028 é altamente significativo (muito menor que 0.05), e o Intervalo de Confiança de 95% (0.5809 a 0.8042), com o limite inferior claramente acima de 0.50, demonstra evidência robusta de capacidade discriminatória real.

Para os cálculos detalhados, com 30 amostras positivas e 63 negativas, selecionamos o ponto de corte de 0.3950. Essa escolha foi feita especificamente porque esse valor maximiza o Índice de Youden, buscando o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade. Ao aplicarmos este corte, os resultados foram: 19 Verdadeiros Positivos (VP) e 41 Verdadeiros Negativos (VN). No entanto, também observamos 22 Falsos Positivos (FP) e 11 Falsos Negativos (FN).

Com base nessas classificações, as métricas de desempenho foram calculadas. A sensibilidade do teste foi de 63,33% (19/30), demonstrando a capacidade do teste em identificar corretamente os verdadeiros positivos. A especificidade, por sua vez, alcançou 65,08% (41/63), indicando a capacidade de identificar corretamente os verdadeiros negativos.

Sua Acurácia geral ficou em 64,52% (60/93), representando a porcentagem total de classificações corretas obtidas. Ao analisar os valores preditivos, o Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 46,34% (19/41), indicando a probabilidade de um indivíduo realmente ser positivo quando o teste retorna um resultado positivo. Em contraste, o Valor Preditivo Negativo (VPN) foi de 78,85% (41/52), ressaltando a probabilidade de um indivíduo ser realmente negativo quando o teste apresenta um resultado negativo.

Tabela 4: Resultados estatísticos dos peptídeos analisados

Peptídeo	Mann-Whitney	AUC (IC 95%)	p-valor AUC	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP	VPN
313	p < 0.05	0.6825 (0.5696-0.7954)	0.0046	73,33%	69,84%	70,97%	53,66 %	84,62 %
314	p = 0.7359	0.5220 (0.3997-0.6442)	0.7331	60,00%	52,38%	54,84%	37,50 %	73,33 %
315	p = 0.5908	0.5349 (0.4070-0.6628)	0.5875	60,00%	53,97%	55,91%	38,30 %	73,91 %
316	p = 0.0361	0.6347 (0.5161-0.7532)	0.0365	60,00%	60,32%	60,22%	41,86 %	76,00 %
317	p = 0.0483	0.6270 (0.5124-0.7416)	0.0486	50,00%	63,49%	59,14%	39,47 %	72,73 %
318	p significativo	0.6926 (0.5809-0.8042)	0.0028	63,33%	65,08%	64,52%	46,34 %	78,85 %

Resultados estatísticos detalhados para seis peptídeos (313 a 318) submetidos a análise. Os parâmetros incluem testes de significância estatística, métricas de desempenho de classificação e valores preditivos.

Após uma comparação geral foi observado que o peptídeo 318 demonstrou uma performance promissora como biomarcador, com uma discriminação estatisticamente robusta e a maior AUC entre os peptídeos avaliados. No ponto de corte de 0.3950 ele exibe um bom equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, com um VPP moderado e um VPN forte, o que sugere um bom potencial diagnóstico.

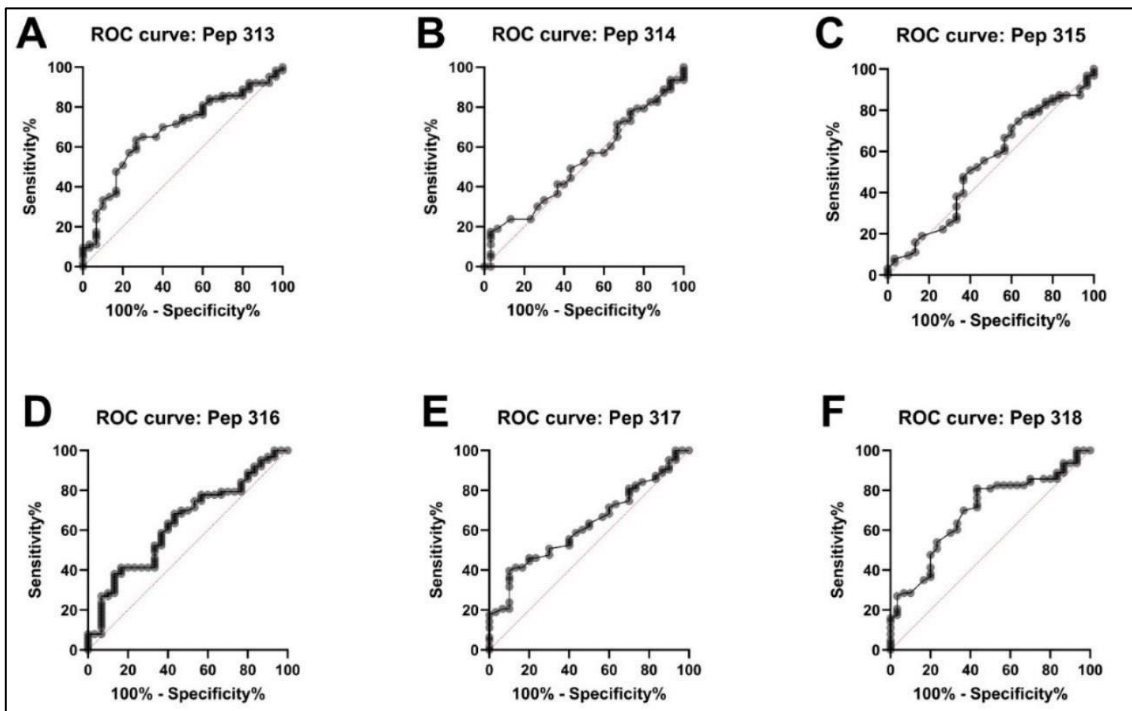


Figura 23. A figura apresenta seis gráficos de Curva de Característica de Operação do Receptor (ROC - *Receiver Operating Characteristic*) individuais (A-F), demonstrando a capacidade preditiva de seis peptídeos distintos (Pep 313, Pep 314, Pep 315, Pep 316, Pep 317 e Pep 318). Cada curva ROC plota a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) contra a taxa de falsos positivos (especificidade) para diferentes pontos de corte, permitindo a avaliação da acurácia de cada peptídeo como biomarcador. A linha pontilhada diagonal em cada gráfico representa um classificador aleatório, servindo como referência para a comparação da performance dos peptídeos. A área sob a curva (AUC) de cada gráfico, é um indicador crucial da performance diagnóstica, onde valores mais próximos de 1 indicam maior capacidade discriminatória.

8. DISCUSSÃO

O presente estudo, ao analisar 175 amostras sanguíneas de pacientes com diagnóstico clínico de arboviroses atendidos na UPA Beira Mar, em Duque de Caxias, entre janeiro e junho de 2018, oferece um panorama relevante sobre a epidemiologia local dessas doenças. A cocirculação de dengue (DEN), Chikungunya (CHIK) e zika (ZIK) representa um cenário complexo e dinâmico no Brasil, com impactos substanciais sobre o sistema de saúde, especialmente em áreas urbanas densamente povoadas, como Duque de Caxias – uma realidade comum em centros urbanos brasileiros (SILVA *et al.* 2021; FERNANDES *et al.* 2024).

A prevalência observada de CHIK, predominante em nossa coorte (53,71% dos casos), superando DEN (25,71%) e ZIK (17,10%), indica um possível surto localizado da infecção por CHIKV no período estudado. Essa distribuição reforça as variações epidemiológicas temporais e geográficas das arboviroses no Brasil (BRASIL, 2020). O Ministério da Saúde enfatiza que a emergência e reemergência desses vírus exigem vigilância contínua e estratégias adaptativas.

As coinfeções, ainda que menos frequentes (DEN/ZIK: 2,28%; DEN/CHIK: 1,14%), associadas a sintomas inespecíficos, refletem os desafios diagnósticos em contextos de cocirculação viral. A sobreposição de manifestações clínicas entre as três arboviroses dificulta a identificação etiológica baseada apenas em critérios clínicos, conforme destacado em estudos recentes (PUCCIONI-SOHLER *et al.* 2023). Isso ressalta a importância de métodos laboratoriais confirmatórios na condução clínica e em ações de vigilância.

A análise demográfica revelou idade mediana de 41 anos e predominância do sexo feminino (52,07%). Estudos epidemiológicos apontam maior risco de infecção entre mulheres, o que pode estar relacionado a padrões sociais, hábitos de vestuário e maior exposição domiciliar ao vetor (SILVA *et al.*, 2021). No caso específico do ZIKV, observou-se maior frequência de infecção entre mulheres de 20 a 39 anos, reforçando padrões já descritos na literatura (KOHLENER *et al.* 2018).

As manifestações clínicas observaram-se em consonância com a literatura: pacientes com DEN apresentaram predominantemente mialgia, cefaleia e, em alguns casos, discrasias; os com ZIK relataram exantema, prurido e hiperemia conjuntival;

enquanto os casos de CHIK mostraram elevada frequência de artralgia e artrite, com intensidade variando de moderada a grave (KOHLENER *et al.* 2018; SOUSA *et al.* 2023).

O mapeamento de epítomos lineares por síntese de peptídeos em membrana de celulose e posterior immunoblotting com soros/plasma de pacientes positivos para CHIK mostrou-se eficaz na identificação de regiões imunorreativas. A escolha de peptídeos com intensidade de sinal $\geq 30\%$, conferiu rigor à seleção dos epítomos (FRANK, 2020), permitindo identificar sequências imunogênicas relevantes. Essa metodologia tem se mostrado promissora na geração de antígenos para diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (KASHIAP *et al.* 2016).

Os resultados demonstraram a interação da IgA com proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, E1 e 6K) do CHIKV. A resposta dirigida a essas regiões reforça a importância das proteínas estruturais como alvos imunogênicos, conforme evidenciado por Burgos *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2018), especialmente E2 e E1, que são expostas na superfície viral.

De forma inédita, este estudo também demonstrou reatividade de IgA frente às proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4), indicando sua imunogenicidade e potencial como alvo diagnóstico, com menor risco de reatividade cruzada com outros arbovírus. Agarwal *et al.* (2024) destacam a presença de epítomos de células T CD4⁺ nas proteínas não estruturais, especialmente nsP1, reforçando seu valor imunológico.

A presença de epítomos imunorreativos tanto em proteínas estruturais quanto não estruturais amplia o leque de possibilidades para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e vacinas multiepitópicas. A especificidade dos peptídeos identificados pode ser essencial para reduzir interferências decorrentes de infecções prévias por arbovírus relacionados.

A análise *in silico* por BLASTP permitiu a avaliação da especificidade dos epítomos identificados, utilizando um critério conservador de similaridade mínima de 5 aminoácidos para prever reatividade cruzada. Essa abordagem é amplamente reconhecida como um passo crítico na triagem inicial de peptídeos candidatos para uso diagnóstico, aumentando a acurácia de testes como o ELISA (LECHUGA *et al.* 2024).

No presente estudo, foram identificados e selecionados seis epítomos específicos do CHIKV – LLSKVPKTDL (nsP1), FGAPNETFPITFGDF (nsP3), LKKLQESASM

(nsP4), SAVNKLTMRVPQQK, PRRNRKNKKQ e PKQKKQPPQKKPAQK (todos do capsídeo) – que não apresentaram reatividade cruzada com outros patógenos humanos, conforme demonstrado pela análise *in silico*. A ausência de similaridade significativa com proteínas de outros arbovírus, bem como de patógenos não relacionados, reforça a especificidade desses epítomos como potenciais biomarcadores para diagnóstico sorológico de CHIK, minimizando o risco de resultados falso-positivos. Este achado é de grande relevância diante da cocirculação de múltiplos arbovírus e outros agentes etiológicos com estruturas proteicas homólogas.

A análise contemplou epítomos tanto de proteínas estruturais quanto não estruturais, ampliando as possibilidades de identificação de regiões imunogênicas específicas. Estudos anteriores, como o de Medina Gómez *et al.* (2020), também investigaram epítomos específicos do CHIK para fins diagnósticos. Enquanto nosso estudo identificou epítomos em nsP1, nsP3, nsP4 e capsídeo, Medina Gómez *et al.* destacaram epítomos principalmente nas proteínas E1 e E2. No total, foram identificados 13 epítomos exclusivos do CHIK, incluindo seis em proteínas estruturais (três em E1 e três em E2) e sete em proteínas não estruturais (dois em nsP1, um em nsP2, dois em nsP3 e dois em nsP4).

A abordagem desses autores incluiu a construção de sequências consenso a partir de 1.320 sequências do CHIKV disponíveis no NCBI, alinhadas com sequências de DEN e ZIK para identificar regiões com menor homologia. A seleção dos epítomos foi baseada em critérios rigorosos, como detecção por múltiplos algoritmos (Clustal W, T-Coffee, MUSCLE) e baixa similaridade (<25%) com flavivírus. Assim como em nosso estudo, foram priorizadas regiões com alta especificidade, destacando a importância de epítomos que possam ser utilizados como biomarcadores seletivos.

A seleção de epítomos sem reatividade cruzada é um componente essencial para aumentar a acurácia diagnóstica. Além disso, possibilita o desenvolvimento de ensaios mais simples, econômicos e escaláveis, com menor necessidade de validação extensiva de peptídeos inespecíficos. A utilização da análise *in silico* como filtro inicial para seleção de candidatos diagnósticos representa uma etapa crítica na racionalização do desenvolvimento de novos testes.

A predição da estrutura terciária dos epítomos identificados permitiu avaliar sua acessibilidade e localização em regiões potencialmente imunogênicas, como hélices e

coils expostos. Essa característica favorece a interação com anticorpos e fortalece seu uso como candidatos diagnósticos ou vacinais (CHAKRABORTI *et al.* 2021). A análise da conformação tridimensional dos epítomos do capsídeo revelou a provável exposição dessas regiões na superfície da proteína, o que corrobora com estudos que associam acessibilidade à imunogenicidade (THITE *et al.* 2021).

De forma similar, os epítomos das proteínas não estruturais nsP1, nsP3 e nsP4 (Figuras 18, 19 e 20, respectivamente) apresentaram conformações compatíveis com reconhecimento pelo sistema imune. Embora tradicionalmente menos exploradas, as proteínas não estruturais têm emergido como alvos diagnósticos promissores devido à sua menor homologia com outros arbovírus e maior conservação entre linhagens do CHIKV (BHAKAT *et al.* 2014; CHAN *et al.* 2019).

A análise exploratória dos dados experimentais foi realizada por meio de *box-plots* dos Índices de Reatividade (IR), revelando que os grupos positivos apresentaram medianas geralmente mais elevadas. No entanto, observou-se uma sobreposição considerável entre os grupos, o que limita a capacidade discriminatória isolada de cada peptídeo. Esse padrão foi consistente entre os seis peptídeos avaliados (313 a 318), indicando que análises adicionais, como as curvas ROC, são indispensáveis para avaliar a utilidade diagnóstica desses marcadores.

Os resultados estatísticos revelaram que os peptídeos 314 e 315 apresentaram desempenho discriminatório nulo, com valores de AUC próximos a 0,50 e ausência de significância estatística no teste de *Mann-Whitney*. Tais resultados inviabilizam sua aplicação isolada como biomarcadores. Em contraste, os peptídeos 313, 316 e 317 exibiram AUCs entre 0,63 e 0,68, valores estatisticamente superiores ao acaso, mas ainda abaixo dos padrões ideais para testes diagnósticos ($>0,80$). As sensibilidades e especificidades observadas para esses peptídeos variaram entre 50% e 73,33%, e entre 60,32% e 69,84%, respectivamente.

O peptídeo 318 apresentou o desempenho mais promissor, com AUC próxima de 0,69 e p-valor altamente significativo. Apresentou equilíbrio entre sensibilidade (63,33%) e especificidade (65,08%) no ponto de corte otimizado. O Valor Preditivo Negativo (VPN) elevado (78,85%) sugere utilidade para triagem, ao passo que o Valor Preditivo Positivo (VPP) moderado (46,34%) indica a necessidade de testes confirmatórios adicionais. Tais achados refletem a complexidade do diagnóstico diferencial das

arboviroses, frequentemente dificultado por cocirculação e reatividade cruzada (PANIS-MONDOLFI *et al.* 2016).

Comparativamente, ensaios comerciais bem estabelecidos apresentam desempenho superior. O estudo de Guo *et al.* (2022) demonstrou sensibilidades e especificidades superiores a 97% para ELISAs baseados na proteína E2 recombinante. Outro exemplo é o Platelia Dengue IgA Capture (Bio-Rad), com sensibilidade de 93% e especificidade de 88% (DE DECKER *et al.* 2015). Esses dados ressaltam que, embora os peptídeos aqui avaliados apresentem potencial, sua aplicação isolada ainda exige aprimoramento ou integração em painéis diagnósticos.

A principal contribuição de ensaios ELISA baseados em peptídeos, como os realizados neste estudo, reside na sua capacidade de focar em epítomos específicos, o que é crucial para superar a reatividade cruzada – um dos maiores desafios no diagnóstico diferencial de arboviroses em regiões endêmicas (FISHER *et al.*, 2021). A combinação estratégica de múltiplos epítomos, seja em formato de "cocktail" ou em plataformas multiplex, representa uma abordagem promissora para aumentar a sensibilidade e a especificidade globais dos testes.

Em síntese, este estudo oferece uma contribuição significativa para o avanço do imunodiagnóstico da CHIK, ao mapear epítomos lineares específicos em proteínas estruturais e não estruturais do CHIK. A combinação de análises experimentais, bioinformáticas e estatísticas fortalece a proposta de uso de epítomos IgA como biomarcadores diagnósticos em cenários de cocirculação viral. Embora a performance individual dos peptídeos seja variável, a integração estratégica de múltiplos epítomos representa um caminho promissor para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis, específicos e aplicáveis à rotina laboratorial em saúde pública.

9. CONCLUSÕES

I. Entre as 169 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, com diagnóstico clínico de arboviroses, 94 (53.71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugeriu um **quadro epidêmico** de CHIK no período estudado.

II. Com base na análise dos dados epidemiológicos, observou-se **que não houve diferença significativa** entre os números de casos de chikungunya entre os gêneros feminino e masculino. Este achado sugere que o vírus, assim como o vetor transmissor, não apresenta predileção clara por um sexo específico na transmissão da doença.

III. Nos pacientes suspeitos de chikungunya, observaram-se com alta frequência quadros de **artralgia**, variando de moderada a intensa em 96,8% dos casos (91 de 94 pacientes), além de manifestações de **artrite** em 81,9% dos casos (77 de 94 pacientes), confirmando o tropismo do vírus por células articulares;

IV. O mapeamento realizado por meio da síntese de peptídeo em membrana da estrutura do CHIKV foi realizado de forma eficiente, sendo comprovado pelo alto número de epítomos reconhecidos pela IgA humana e evidenciado pelo índice de reatividade deles.

V. Através da análise *in silico* de reatividade cruzada para CHIKV através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), foi possível observar muitos epítomos que potencialmente poderiam apresentar **reatividade cruzada** com outros patógenos do homem (principalmente outros vírus) no processo de imunodiagnóstico, devido à similaridade estrutural dos aminoácidos com epítomos de proteínas desses outros patógenos.

VI. Apesar do grande número de epítomos com potencial de reação cruzada no imunodiagnóstico, **seis epítomos** (três sendo de proteínas estruturais e três sendo de proteínas não estruturais) não apresentaram similaridade estrutural em sua proteína quando comparados a outros patógenos do homem, indicando grande potencial na utilização desses epítomos durante o imunodiagnóstico com a finalidade de reduzir a reação cruzada gerando melhores testes imunológicos.

VII. A análise dos *box-plots* mostrou que, apesar da tendência dos grupos "positivos" a terem medianas de IR ligeiramente maiores, a sobreposição significativa nas distribuições dos IRs para todos os seis peptídeos (Pep 313-318) **impede uma distinção clara e**

isolada entre os grupos "positivos" e "negativos". Isso indica a necessidade de testes estatísticos para avaliar a real capacidade discriminatória.

VIII. Os testes estatísticos revelaram que o **Peptídeo 313 e o Peptídeo 318** possuem capacidade discriminatória estatisticamente significativa entre os grupos positivos e negativos. Ambos demonstraram potencial para descarte da doença.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, RIMJHIM; HA, CALVIN; CORTES, FERNANDA H.; LEE, YEJI; MARTÍNEZ-PÉREZ, AMPARO; GÁLVEZ, ROSA ISELA; CASTILLO, IZABELLA N.; BALMASEDA, ANGEL; HARRIS, EVA; ROMERO-VIVAS, CLAUDIA M.; PREMKUMAR, LAKSHMANANE; FALCONAR, ANDREW K.; GRIFONI, ALBA; SETTE, ALESSANDRO; WEISKOPF, Daniela. Identification of immunogenic and cross-reactive chikungunya virus-specific CD4+ T cell epitopes in chronic chikungunya viral arthritic disease in humans. **bioRxiv**, 2024. DOI: 10.1101/2024.10.22.619717. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.10.22.619717v1.full>. Acesso em: 3 jul. 2025.

ALVES, JULIANA CARDOSO; MAGALHÃES, LUCAS SOUSA; SANTOS, PRISCILA LIMA DOS; COUTO, DEBORAH DE LUCENA; CASTRO, GEFERSON DE ALMEIDA; LIMA, BRUNA MARIA SALES; PIRES, LARISSA DOS SANTOS; COSTA, LUCAS MEDEIROS DA; MONTENEGRO, FERNANDO SILVEIRA; MELO, FABIANO CAVALCANTE DE. Coinfection with chikungunya and Zika results in mild disease and distinct inflammatory response. **npj Viruses**, v. 3, n. 10, 11 fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s44298-025-00098-w>. Acesso em: 30 jul. 2025.

AZEVEDO, R.DOS., OLIVEIRA, C. S., & VASCONCELOS, P. F. (2015). Chikungunya risk for Brazil. *Revista de saude publica*, 49, 58. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006219>

BHAKAT, SOUMENDRANATH; KARUBIU, WILSON; JAYAPRAKASH, VENKATESAN; SOLIMAN, MAHMOUD E S. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. **Eur J Med Chem.**, v. 87, p. 677-702, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.10.010.

BLACKMORE, S.; CARRINGTON, C. V.; PAN, K. R. Reduction in Dengue IgM Antibody Prevalence Detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Nine Countries of the English-Speaking Caribbean, 2004-2011. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32616, 2012.

BOUQUILLARD, É.; & COMBE, B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, v. 75, n. 3, p. 369-371, 2008.

BOUQUILLARD, É.; FIANU, A.; BANGIL, M.; CHARLETTE, N.; RIBERA, A.; SCHUFFENECKER, I.; ... & CABIÉ, A. Rheumatic manifestations associated with Chikungunya virus infection: A study of 307 patients with 32-month follow-up (RHUMATOCHIK Study). **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 4, p. 675-677, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. Volume 48 N° 29

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 30 de 2018. Volume 49.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (2020). **Boletim Epidemiológico** - Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Vol. 51, N° 33. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-33-2020.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (2020). Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), **Semanas Epidemiológicas 1 a 19**, 2020. Vol. 51, N° 20. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2020/06/Boletim-epidemiologico-SVS-20-aa.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (2020). **Boletim Epidemiológico** - Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Vol. 51, N° 33. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-33-2020.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (2020). Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), **Semanas Epidemiológicas 1 a 19**, 2020. Vol. 51, N° 20. Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2020/06/Boletim-epidemiologico-SVS-20-aa.pdf>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 44, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas (dengue, chikungunya e Zika) Semanas Epidemiológicas 1 a 47. Boletim Epidemiológico, v. 50, n.37, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e Zika) Semanas Epidemiológicas 1 a 46, 2020. Boletim Epidemiológico, v. 51, n.48, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e Zika) Semanas Epidemiológicas 1 a 51, 2021. Boletim Epidemiológico, v. 52, n.48, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 35 de 2022. Boletim Epidemiológico, v. 53, n.34, 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Óbitos por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Boletim Epidemiológico, v. 51, n.33, 2020.

BURT, FELICITY J; CHEN, WEIQIANG; MINER, JONATHAN J; LENSCHOW, DEBORAH J; MERITS, ANDRES; SCHNETTLER, ESTHER; KOHL, ALAIN; RUDD, PENNY A; TAYLOR, ADAM; HERRERO, LARA J; ZAID, ALI; NG, LISA F P; MAHALINGAM, SURESH (2017). *Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. The Lancet Infectious Diseases*, 17(4), e107–e117. doi:10.1016/S1473-3099(16)30385-1

COFFEY, LORI L.; FELLOWS, ANNE-BELLA; WEAVER, SCOTT C. Chikungunya virus–vector interactions. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, nov. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v6114628>. Acesso em: 30 jul. 2025

CHAHAR, H. S., BHARAJ, P., DAR, L., GULERIA, R., KABRA, S. K., & BROOR, S. (2009). Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. *Emerging infectious diseases*, 15(7), 1077–1080. <https://doi.org/10.3201/eid1507.080638>

CHAKRABORTY, CHIRANJIB; SHARMA, ASHISH RANJAN; BHATTACHARYA, MANOJIT; SHARMA, GARIMA; LEE, SANG-SOO. Immunoinformatics Approach for the Identification and Characterization of T Cell and B Cell Epitopes towards the Peptide-Based Vaccine against SARS-CoV-2. *Arch Med Res*, v. 52, n. 4, p. 362–370, 2021. DOI: 10.1016/j.arcmed.2021.01.004.

CHAN, YI-HAO; TEO, TECK-HUI; UTT, AGE; TAN, JESLIN JL; AMRUN, SITI NAQIAH; BAKAR, FARHANA ABU; YEE, WEARN-XIN; BECHT, ETIENNE; LEE, CHERYL YI-PIN; LEE, BERNETT; RAJARETHINAM, RAVISANKAR; NEWELL, EVAN; MERITS, ANDRES; CARISSIMO, GUILLAUME; LUM, FOK-MOON; NG, LISA FP. Mutating chikungunya virus non-structural protein produces potent live-attenuated vaccine candidate. *EMBO Mol Med*, v. 11, n. 6, p. e10092, 2019. DOI: 10.15252/emmm.201810092.

CHOPRA, A.; ANURADHA, V.; GHORPADE, R.; & SALUJA, M. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. *Epidemiology and Infection*, v. 140, n. 5, p. 842-850, 2012.

CHOPRA, A.; SALUJA, M.; VENUGOPALAN, A. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 10-year follow-up study. *Journal of Rheumatology*, v. 41, n. 10, p. 2004-2005, 2014.

CLETON, N. B.; REUSKEN, C. B.; WAGENAAR, J.; KOOPMANS, M. P.; & REIMERINK, J. H. The chikungunya virus: a review. *Journal of Clinical Virology*, v. 50, n. 2, p. 87-97, 2012.

CONTOPOULOS-IOANNIDIS D, NEWMAN-LINDSAY S, CHOW C, LABEAUD AD. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(6):e0006510. Published 2018 Jun 13. doi:10.1371/journal.pntd.0006510

COSTA *et al.*, Virological, clinical, laboratory and epidemiological aspects of arboviroses chikungunya fever and zika vírus. 30 de Junho, 2017, disponível em: <http://repositorio.asc.es.edu.br/handle/123456789/1108>

CUNHA, M. S.; CRUZ, A. C. R.; OLIVEIRA, S. S. D.; RIBEIRO, G. S. IgA Detection Methods for Arboviral Infections: **A Review**. *Viruses*, v. 11, n. 6, p. 527, 2019.

CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, V. 112(8), p. 523-531, August, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/JqRqyjsdtdVJrYSPwcrs9Tz/?lang=en>

DA SILVA, A.N.M.R., Identification of B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3. 2007. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/3939>

DA SILVA, NAYARA MESSIAS *et al.* . Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília , v. 27, n. 3, e2017127, set. 2018. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742018000300006&lng=pt&nrm=iso. acessos em 04 nov. 2022. Epub 18-Jul-2018. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742018000300003>.

DE DECKER, SOPHIE; VRAY, MURIEL; SISTEK, VIRIDIANA; LABEAU, BHETY; ENFISSI, ANTOINE; ROUSSET, DOMINIQUE; MATHEUS, SÉVERINE. Evaluation of the Diagnostic Accuracy of a New Dengue IgA Capture Assay (Platelia Dengue IgA Capture, Bio-Rad) for Dengue Infection Detection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 3, p. e0003596, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003596

DE SOUZA, A.F.P.V.B. Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV), 2019. Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/35453/1/2019_AnaFernandaPinheirodeVascancellosBrumdeSouza.pdf

DE-SIMONE, S.G.; NAPOLEÃO-PÊGO, P.; LECHUGA, G.C.; CARVALHO, J.P.; MONTEIRO, M.E.; MOREL, C.M.; PROVANCE, D.W. Mapping IgA Epitope and Cross-Reactivity between Severe Acute Respiratory Syndrome–Associated Coronavirus and DENV. *Preprints* 2023, 2023110709. <https://doi.org/10.20944/preprints202311.0709.v1>

DE SOUZA, WILLIAM M.; DOS SANTOS, SHIRLENE T. S.; DE LIMA, RONALDO; MATTHEWS, CHARLES; SALJE, HENRIK; DO ROSÁRIO, RAYANNY P. N. Chikungunya: a decade of burden in the Americas. **The Lancet Regional Health – Americas**, v. 37, 100802, fev. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2025.100802>. Acesso em: 30 jul. 2025.

DONALÍSIO, M.R., FREITAS, R.R.F., ZUBEN, A.P.B.Z. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para clínica e implicações para a saúde pública. **Rev. Saúde Pública** vol.51, São Paulo, 2017. Epub Apr 10, 2017. ISSN 1518-8787. <http://dx.doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>.

DUBRULLE, M.; MOUSSON, L.; MOUTAILLER, S.; VAZEILLE, M.; & FAILLOUX, A. B. Chikungunya virus and Aedes mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e5895, 2009.

DUTRA, A. P.; FERNANDES, R. S.; DE MORIAS BRONZONI, R. V.; ROCHA, W. C.; DE SOUZA RIBEIRO, B.; DE FÁTIMA DUARTE, L.; ... & CUNHA, R. V. Resistance to malathion in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) populations from Ceará, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 1, p. 88-95, 2020.

ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL). Chikungunya Worldwide Overview, 2023. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>

FARAH DEEBA, ASIMUL ISLAM, SYED NAQUI KAZIM, IRSHAD HUSSAIN NAQVI, SHOBHA BROOR, ANWAR AHMED, SHAMA PARVEEN, CHIKUNGUNYA VIRUS: RECENT ADVANCES IN EPIDEMIOLOGY, HOST PATHOGEN INTERACTION AND VACCINE STRATEGIES, *Pathogens and Disease*, Volume 74, Issue 3, April 2016, ftv119, <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv119>

FERNANDES, C. O. S.; FERNANDES, D. R. A. S.; BARACAT, R. V. M.; SILVEIRA, P. T. M.; BRAGA, G. O. Arboviroses emergentes e reemergentes no Brasil: dengue, chikungunya e zika. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 8, p. 5036–5048, 2024.

FISCHER, Carlo; JO, Wendy K.; HAAGE, Verena; MOREIRA-SOTO, Andrés; OLIVEIRA FILHO, Edmilson F. de; DREXLER, Jan Felix. Challenges towards serologic

diagnostics of emerging arboviruses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 9, p. 1221-1229, 2021. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.05.047.

FREITAS, J. T. Diagnóstico Diferencial da Infecção pelo Vírus Zika e Outras Arboviroses: Produção de Proteínas Recombinantes com Potencial Antigênico para o Desenvolvimento de Métodos Imunológicos. Tese de Doutorado – Universidade Federal Fluminense – Programa de Pós-Graduação em Patologia – 2022.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ) – AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS- Chikungunya, 2015. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/chikungunya>

GÉRARDIN, P.; GUERNIER, V.; PERRAU, J.; FIANU, A.; LE ROUX, K.; GRIVARD, P.; ... & MICHAULT, A. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2019.

GREGIANINI, T.S. *ET AL.* Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016. **Rev Med Virol.** 2017;(August):1-10, DOI:10.1002/rmv.1943.

GUO, MEIJUN; DU, SHANSHAN; LAI, LIJIN; WU, WEI; HUANG, XIAOXIA; LI, AQIAN; LI, HAO; LI, CHUAN; WANG, QIN; SUN, LINA; LIU, TIEZHU; TIAN, TINGTING; WANG, SHIWEN; LIANG, MIFANG; LI, DEXIN; XIE, CHUN; LI, JIANDONG. Development and evaluation of recombinant E2 protein based IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to Chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 12, p. e0010829, 2022. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010829.

HONÓRIO NA, CÂMARA DCP, CALVET GA, BRASIL P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad Saúde Pública.** 2015May;31(5):906–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020515>

HOSSAIN MS, HASAN MM, ISLAM MS, *ET AL.* Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease. **PLoS Negl Trop Dis.** 2018;12(6):e0006561. Published 2018 Jun 6. doi:10.1371/journal.pntd.0006561

HUA, C.; COMBE, B. (2017). Chikungunya Virus-Associated Disease. **Current Rheumatology Reports**, 19(11), 69–. doi:10.1007/s11926-017-0694-0

HUERTA ALBARRÁN, ROSANA; WEBER, AMANDA; ROBLES, MARTHA AVILÉS; APPENDINO, JUAN PABLO. Chikungunya virus infection: A scoping review highlighting pediatric systemic and neurologic complications. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 54, p. 101213, jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.spen.2025.101213>. Acesso em: 30 jul. 2025.

IANI, F.C.M. Vigilância genômica das arboviroses emergentes circulantes e co-circulantes no estado de Minas Gerais. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, 2021.

IREKEOLA, A. A., ENGKU NUR SYAFIRAH, E. A. R., ISLAM, M. A., & SHUEB, R. H. (2022). Global prevalence of dengue and chikungunya coinfection: A systematic review and meta-analysis of 43,341 participants. *Acta tropica*, 231, 106408. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106408>

KASHYAP, RAJPAL S.; BHULLAR, SHRADHA S.; CHANDAK, NITIN H.; TAORI, GIRDHAR M. Synthetic Peptide-Based Antibody Detection for Diagnosis of Chikungunya Infection with and without Neurological Complications. **Methods Mol Biol**, v. 1426, p. 39-50, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3618-2_4.

KOHLER, L. I. A.; AZEVEDO, J.; LIMA, M. A.; MARINHO, R. A.; SOUZA, L. J. Perfil epidemiológico dos pacientes com evolução subaguda e crônica de infecção por Chikungunya. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 16, n. 1, p. 13-17, 2018.

LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública). Manual para o diagnóstico laboratorial das arboviroses no estado de Goiás. Goiânia, Abril de 2017, 1ª versão. Disponível em: <http://www.saude.go.gov.br/wp-content/uploads/2016/12/manual-diagnostico-das-arboviroses-go.pdf>

LAI, QIAN; SHAN, HONG; GAI, LI; YUAN, HUI; ZHU, XIANFAN. Chikungunya virus in Europe: A retrospective epidemiology study from 2007 to 2023. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7 mar. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012984>. Acesso em: 30 jul. 2025.

LECHUGA, GUILHERME C.; TEMEROZO, JAIRO R.; NAPOLEÃO-PÊGO, PALOMA; CARVALHO, JOÃO P. R. S.; GOMES, LARISSA R.; BOU-HABIB, DUMITH CHEQUER; MOREL, CARLOS M.; PROVANCE JR., DAVID W.; SOUZA,

THIAGO M. L.; DE-SIMONE, SALVATORE G. Enhanced Assessment of Cross-Reactive Antigenic Determinants within the Spike Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8180, 2024. DOI: 10.3390/ijms25158180.

LEITÃO, MARCELO & ARRAIS, NIVIA & FILGUEIRA, FABIANA & BEZERRA, MYLENA & BARRETO, ANNA & ARAÚJO, JOSÉLIO. (2019). Cases of Chikungunya virus infection by vertical transmission in a university hospital in the first half of 2016. **Residência Pediátrica**. 9. 111-114. 10.25060/residpediatr-2019.v9n2-05.

LENGLET, Y.; BARAU, G.; ROBILLARD, P.-Y.; RANDRIANAIVO, H.; MICHAULT, A.; GÉRARDIN, P.; BOURMAINTRI, B.; ODABASI, Y.; KAUFMANN, C.; SCHUFFENECKER, T.; GALIMEDE, M.; FLAHAULT, A. [Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the Reunion Island outbreak]. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction (Paris)**, v. 35, n. 6, p. 578-583, out. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2006.06.002>. Acesso em: 30 jul. 2025.

LEPARC-GOFFART I, NOUGAIREDE A, CASSADOU S, PRAT C, DE LAMBALLERIE X. Chikungunya in the Americas. **Lancet**. 2014 Feb 8;383(9916):514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9. PMID: 24506907.

LICÍNIO, C. O. L, AYRES, F. M. O uso do PCR em tempo real em diagnósticos de arboviroses: revisão integrativa. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. 57 – 2021.

LINDH, ERIKA; ARGENTINI, CLAUDIO; REMOLI, MARIA ELENA; FORTUNA, CLAUDIA; FAGGIONI, GIOVANNI; BENEDETTI, ELEONORA; AMENDOLA, ANTONELLA; MARSILI, GIULIA; LISI, FLAVIA; REZZA, GIOVANNI; VENTURI, GIULIETTA. The Italian 2017 Outbreak Chikungunya Virus Belongs to an Emerging *Aedes albopictus*-Adapted Virus Cluster Introduced From the Indian Subcontinent. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. ofy321, 12 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy321>. Acesso em: 30 jul. 2025.

LONG, KRISTIN M.; HEISE, MARK T. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 5, n. 1, p. 7-13, mar. 2018. Disponível em: doi:[10.1007/s40475-015-0037-z](https://doi.org/10.1007/s40475-015-0037-z). Acesso em: 30 jul. 2025

LOPES, N., NOZAWA, C., LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300055

LOUNIBOS LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:233-266. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145206

LUM FM, NG LF. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* 2015;120:165-174. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.009

MARTINS, ANDRÉ FREDERICO. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES DE FASES AGUDA E SUBAGUDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM VÍRUS CHIKUNGUNYA, ATENDIDOS NO HOSPITAL MUNICIPAL MOARCYR RODRIGUES DO CARMO, DUQUE DE CAXIAS, RJ. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) BIOTRANS, UNIGRANRIO, 2020.

MEDINA GÓMEZ, MIGUEL; GARCÍA MACHORRO, JAZMÍN; CORREA BASURTO, JOSÉ. BÚSQUEDA DE EPÍTOPOS DE CHIKUNGUNYA PARA INMUNODIAGNÓSTICO. *Revista Multidisciplinaria de Avances de Investigación*, v. 6, n. 3, p. 7-30, set./dez. 2020. Disponível em: <https://www.remai.ipn.mx/index.php/REMAI/article/download/76/72>. Acesso em: 6 jul. 2025.

MORALES, I., ROSENBERGER, K. D., MAGALHAES, T., MORAIS, C., BRAGA, C., MARQUES, E., CALVET, G. A., DAMASCENO, L., BRASIL, P., BISPO DE FILIPPIS, A. M., TAMI, A., BETHENCOURT, S., ALVAREZ, M., MARTÍNEZ, P. A., GUZMAN, M. G., SOUZA BENEVIDES, B., CAPRARA, A., QUYEN, N., SIMMONS, C. P., WILLS, B., ... IDAMS Clinical Study Group (2021). Diagnostic performance of anti-Zika virus IgM, IgAM and IgG ELISAs during co-circulation of Zika, dengue, and chikungunya viruses in Brazil and Venezuela. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(4), e0009336. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009336>

MOREIRA, FELIPE ROMERO REBELLO; MENEZES, MARIANA TOTON DE; BENVINDO, CLARISSA SALGADO; WHITTAKER, CHARLES; COX, VICTORIA; CHANDRASEKARAN, NILANI; PAULA, HURY HELLEN SOUZA DE; MARTINS,

ANDRE FREDERICK; CHAGAS, RAPHAEL RANGAL DAS; BRASIL, RODRIGO DECEMBRINO VARGAS; CÂNDIDO, DARLAN DA SILVA; HERLINGER, ALICE PASCHUK; RIBEIRO, MARISA DE OLIVEIRA; ARRUDA, MONICA BARCELLOS; ALVAREZ, PATRICIA; TÔRRES, MARCELO CALADO DE PAULA; DORIGATTI, ILARIA; BRADY, OLIVER; VOLOCH, CAROLINA MOREIRA; TANURI, AMILCAR; IANI, FELIPE; SOUZA, WILLIAM MARCIEL DE; CARDOZO, SERGIAN VIANNA; FARIA, NUNO RODRIGUES; AGUILAR, RENATO SANTANA. Epidemiological and genomic investigation of chikungunya virus in Rio de Janeiro state, Brazil, between 2015 and 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 9, p. e0011536, 28 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011536>. Acesso em: 30 jul. 2025.

MORRISON TE. Reemergence of chikungunya virus. **J Virol**. 2014;88(20):11644-11647. doi:10.1128/JVI.01432-14<https://sci-hub.hkvisa.net/10.1002/art.40403>

NGUYEN, PHUONG TK.; YU, HOIDOU; KELLEN, PAUL A.; CHEN, XIAOFEI; WANG, PENG; LIU, YINGHONG; WANG, YUELI. Identification of chikungunya virus nsP2 protease inhibitors using structure-based approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 71, p. 3-8, abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2025.10.001>. Acesso em: 30 jul. 2025.

NG, L. C.; TAN, L. K.; TAN, C. H.; TAN, S. S.; HAPUARACHCHI, H. C.; POK, K. Y.; ... & YAP, G. Entomologic and virologic investigation of chikungunya, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 836-839, 2015.

OCÉA, REGINA ADALVA DE LUCENA COUTO. Avaliação das manifestações clínicas, da cronicidade e da expressão gênica na febre chikungunya. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

PAZ-BAILEY, G.; ROSENBERG, E. S.; DOYLE, K.; MUNOZ-JORDAN, J.; SANTIAGO, G. A.; KLEIN, L.; ... & GARCIA-DIAZ, J. B. Persistence of Zika Virus in Body Fluids—Preliminary Report. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 13, p. 1234-1243, 2018.

PIALOUX, G.; GAUZÈRE, B. A.; JAURÉGUIBERRY, S.; & STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **The Lancet Infect**, 2007.

PONGPIRUL, W. A.; VENKATESH, G.; THONGCHAROEN, P.; & LEO, Y. S. Plant-based therapeutic interventions for the management of persistent musculoskeletal pain associated with chikungunya virus infection: a systematic review. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 4, p. 250-256, 2015.

PONGSIRI, P.; PRAIANANTATHAVORN, K.; THEAMBOONLERS, A.; PAYUNGPOORN, S.; POOVORAWAN, Y.; & HIRSCH, A. J. Chikungunya virus in Southeast Asia: insight into the limited genetic diversity and transmission patterns. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0201191, 2018.

PRAMANICK, K.; RATHO, R. K.; SETHI, S. Role of IgA ELISA in Serodiagnosis of Chikungunya. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 92-93, 2018.

PUCCIONI-SOHLER, M.; SOARES, C. N.; CHRISTO, P. P.; ALMEIDA, S. M. Review of dengue, zika and chikungunya infections in nervous system in endemic areas. **Arg Neuropsiquiatr.**, v. 81, n. 12, p. 1112-1124, 2023.

QUEIROZ, Josiane Teresinha Matos de; SILVA, Priscila Neves; HELLER, Léo. Novos pressupostos para o saneamento no controle de arboviroses no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, n. 5, p. 1-5, 2020.

RAJAPAKSE S, RODRIGO C, RAJAPAKSE A. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(2):89-96. doi:10.1016/j.trstmh.2009.07.031

RAMACHANDRAN, V.; MALAISAMY, M.; PONNAIAH, M.; *et al.* Efficacy and Safety of Methotrexate in Chikungunya Arthritis: A Randomized Control Trial. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 186-190, 2011.

REZZA G, NICOLETTI L, ANGELINI R, ROMI R, FINARELLI AC, PANNING M, CORDIOLI P, FORTUNA C, BOROS S, MAGURANO F, SILVI G, ANGELINI P, DOTTORI M, CIUFOLINI MG, MAJORI GC, CASSONE A; CHIKV study group. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet.** 2007 Dec 1;370(9602):1840-6. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61779-6. PMID: 18061059.

RESCK, MARIA EDUARDA BARRETO; CÂMARA, DANIEL CARDOSO POMBO; SANTOS, FLAVIA BARRETO DOS; SANTOS, JEFFERSON PEREIRA CAIXAS DOS; ALBOR, BARRY; HONÓRIO, MIDIMAR ALVES. Spatial-temporal distribution of chikungunya virus in Brazil: a review on the circulating viral genotypes and *Aedes*

(*Stegomyia albopictus*) as a potential vector. **Frontiers in Public Health**, v. 12, 10 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.148002>. Acesso em: 30 jul. 2025.

ROLPH, M. S.; ZAID, A.; RULLI, N. E.; & MAHALINGAM, S. The immunopathogenesis and mechanisms of chikungunya virus. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 78-84, 2019.

SÁNCHEZ-BURGOS, GILMA G.; MONTALVO-MARIN, NALLELY M.; DÍAZ-ROSADO, EDGAR R.; PÉREZ-RUEDA, ERNESTO. In Silico Identification of Chikungunya Virus B- and T-Cell Epitopes with High Antigenic Potential for Vaccine Development. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 2360, 2021. DOI: 10.3390/v13122360.

SANTANA, J. F. C. L. de.; RONN, A. P.; BEZERRA, G. N. .; FERNANDES, T. L. da S. . Clinical injuries due arbovirus infections: a literature review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e46010212057, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12057. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12057>. Acesso em: 18 nov. 2023.

SANTOS, GABRIEL RIBEIRO DOS; JAWED, FARIHA; MUKANDAVIRE, CHRISTINAH; DEOL, ARMINDER; SCARPONI, DANNY; MBOERA, LEONARD E. G.; SERUYANGE, ERIC; POIRIER, MATHIEU J. P.; BOSOMPRAH, SAMUEL; UDEZE, AUGUSTINE O.; NASRALLAH, GHEYATH K.; CAUCHEMEZ, SIMON; SALJE, HENRIK. Global burden of chikungunya virus infections and the potential benefit of vaccination campaigns. **Nature Medicine**, v. 31, n. 7, p. 2342–2349, 10 jun. 2025. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-025-03703-w>. Acesso em: 30 jul. 2025.

SCHWARTZ O, ALBERT ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol**. 2010;8(7):491-500. doi:10.1038/nrmicro2368

SES (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE) – GOVERNO DO ESTADO – Mato Grosso do Sul. Boletim epidemiológico de Chikungunya nº 08 – 2022. Disponível em:https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2022/09/Epidemiologico-Chikungunya-Setembro_2022.pdf

SILVA, JOÃO PAULO DA CRUZ. Mapeamento de epítomos das proteínas estruturais do vírus Chikungunya. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, 2018.

SILVA, LAURIE A.; DERMODY, TERENCE S. (2017). *Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies*. *Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737–749. doi:10.1172/jci84417

SILVA, MARIA BEATRIZ ARAÚJO; BRITO, MARIA ISABELLE BARBOSA DA SILVA; SILVA, JAIZYARA MARY; BARRETO, JOANE OTAVIO FARIAS; LOPES, KATIÚSCIA ARAÚJO DE MIRANDA; VASCONCELOS, LARISSA LINS DO EGITO; SANTOS, THAMIRES MYLLENE MONTEIRO DOS; OLIVEIRA, KARLA SOUZA FIRMINO DE. Perfil das arboviroses Dengue, Chikungunya e Zika no Distrito Sanitário III do município de Recife (Brasil). *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, [S. l.], v. 9, n. 1, 2021. Disponível em: <https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/article/view/607>. Acesso em: 30 jun. 2025. Brasil. Ministério da Saúde. Arboviroses. *Portal Gov.br*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/arboviroses>

SIMON, F.; PAROLA, P.; GRANDADAM, M.; FOURCADE, S.; OLIVER, M.; BROUQUI, P.; & HANCE, P. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine*, v. 86, n. 3, p. 123-137, 2007.

SISSOKO, D.; MOENDANDZE, A.; MALVY, D.; & GIRY, C. Diagnostic methods for Chikungunya. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 44, n. 9, p. 395-400, 2014.

SOUSA, S. S. S.; CRUZ, A. C. R.; OLIVEIRA, R. S.; PINHEIRO, V. C. S. Características clínicas e epidemiológicas das arboviroses epidêmicas no Brasil: Dengue, Chikungunya e Zika. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 23, n. 7, p. 1-8, 2023. DOI: <https://doi.org/10.25248/REAS.e13518.2023>.

SOUZA, JULIANO DE PAULA. Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “in vitro” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação. Tese (Doutorado

em Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos), Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

TEICH, V., ARINELLI, R., FAHHAM, I. Aedes aegypti and society: the economic burden of arboviruses in Brazil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**. 9. 267-276. 10.21115/JBES.v9.n3.p267-76.9.n3.p267-76, 2017.

THITE, AABHA; AGRAWAL, MEGHA; PAVITRAKAR, DAYA; CHERIAN, SARAH; DAMLE, REKHA. Delineation of an epitope recognized by a chikungunya virus anti-capsid monoclonal antibody on the protease domain using an immunoinformatics approach. **J Biomol Struct Dyn**, v. 40, n. 12, p. 5623-5633, 2022. DOI: 10.1080/07391102.2021.1872416.

TONELLI, E., FREIRE, L.M.S., Doenças infecciosas na infância e na adolescência. 2ª edição, volume 2, capítulo 68, arboviroses, MEDSI – **Editora Médica e Científica Ltda**, 2000. ISBN: 85-7199-225-8.

TSETSARKIN KA, VANLANDINGHAM DL, MCGEE CE, HIGGS S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog**. 2007;3(12):e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201

VOLK SM, CHEN R, TSETSARKIN KA, ADAMS AP, GARCIA TI, SALL AA, NASAR F, SCHUH AJ, HOLMES EC, HIGGS S, MAHARAJ PD, BRAULT AC, WEAVER SC. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **J Virol**. 2010 Jul;84(13):6497-504. doi: 10.1128/JVI.01603-09. Epub 2010 Apr 21. Erratum in: **J Virol**. 2011 Jun;85(11):5706. PMID: 20410280; PMCID: PMC2903258.

VU DM, JUNGKIND D, ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clin Lab Med**. 2017;37(2):371-382. doi:10.1016/j.cll.2017.01.008

WAHID, M.; AMAN, S.; SULTANA, S.; RAHMAN, M. M.; & ISLAM, S. N. Management of chronic musculoskeletal pain following chikungunya: **A systematic review**. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03285, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CHIKUNGUNYA, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>

11. ANEXOS

11.1. ANEXO I: Adendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) sob CAAE 70324417.1.0000.528.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Duque de Caxias, 03 de maio de 2019

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO
Para Pesquisadores: Raphael Rangel das Chagas
André Frederico Martins
Hury Hellen Souza de Paula
Para Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa "PEPTÍDEOS E LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA ZIKA VÍRUS", protocolado sob o **número de CAAE 70324417.1.0000.5283**, encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. A referida pesquisa inclui um **ADENDO** para constituição de grupo controle em uma nova vertente, que é a avaliação de mediadores químicos inflamatórios de pacientes com arboviroses. Além da avaliação dos aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes diagnosticados com arboviroses.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.

Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO

Andreia Peter Christo
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO
Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – 25 de Agosto – Duque de Caxias – CEP: 25071-202
Tel.: 21 2672-7733 – E-mail: cep@unigranrio.com.br

11.2. ANEXO II: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) referente à pesquisa proposta.



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Adendo ao Projeto intitulado: **Peptídeos e lipossomas funcionalizados para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico sorológico para Zika vírus**
Pesquisadores Responsáveis: **André Frederico Martins; Raphael Rangel das Chagas; Hury Hellen de Paula e Sergian Vianna Cardozo**

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los. A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

O objetivo geral do estudo é: **Propor o desenvolvimento em laboratório de um teste sorológico, de alta especificidade e sensibilidade, para o diagnóstico de Zika vírus.**

Motivo do adendo: **Inclusão de grupo controle em uma nova vertente do Projeto, que é a avaliação de mediadores químicos inflamatórios de pacientes com arboviroses.**

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 12 meses (02/2018 – 06/2019).

Descrição do Estudo

Este estudo será realizado na **UPA Beira Mar – Hospital Moacir do Carmo/PMDC**

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque foi diagnosticado, pelos seus sinais e sintomas, com suspeita de dengue, Chikungunya, febre amarela ou Zika vírus.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, será realizada a coleta de sangue total (10 - 15 mL) através de venopuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugado para retirada do soro, de acordo com as diretrizes de coleta sanguínea determinadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Os resultados dos exames serão disponibilizados à UPA Beira Mar assim que foram processados no laboratório.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local de coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer. Serão tomados os cuidados cabíveis para minimizar estes riscos.

Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo experimental em laboratório que busca um método diagnóstico eficiente para a rápida detecção de Zika vírus em pacientes que apresentam sintomatologia compatível com esta virose.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a na detecção de um teste diagnóstico eficiente para o Zika Vírus.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidos a você por escrito. Se você decidir continuar nesse estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Você terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta Instituição são os Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo; André Frederico Martins (mestrando); Raphael Rangel das Chagas (mestrando) e Hury Hellen de Paula (mestranda) que poderão ser encontrado no Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas da Universidade do Grande Rio (Unigranrio) ou nos respectivos telefones: 21 2672-7714 ou 21 98737-3532.

Declaração de Consentimento

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a coleta de sangue e a utilização dos meus registros médicos (prontuários) pelo pesquisador, em prol desta pesquisa.

Sujeito de Pesquisa_____
Data_____
Representante Legal do Sujeito de Pesquisa_____
Data_____
Membro da equipe obtendo o Consentimento_____
Data_____
Pesquisador responsável_____
Data

11.3. ANEXO III: Produção Bibliográfica e Artigos Científicos com Participação do Autor



A clinical-ecological study of a triple viral epidemic: Zika, Dengue and Chikungunya

Um estudo clínico-ecológico de uma tripla epidemia viral: Zika, Dengue e Chikungunya

DOI:10.34117/bjdv7n6-088

Recebimento dos originais: 17/05/2021

Aceitação para publicação: 04/06/2021

Viviane Camara Maniero

Department of Health, Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Rodrigo Decembrino Vargas Brasil

Department of Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Paulo Sérgio Cerqueira Rangel

Department of Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Taiane Mendonça Camargo

Department of Health, Faculty of Medicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Marcela Pires de Souza

Department of Health, Faculty of Medicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Júlia Marcelo Maia Forte

Department of Health, Faculty of Medicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Cristiane da Cruz Lamas

Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil/Cardiology National Institute, Rio de Janeiro, Brazil

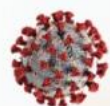
Sergian Vianna Cardozo

Department of Health, Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

Rua Professor José de Souza Herdy, 1036. Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. Zip code 25071-202

E-mail: sergianvc@unigranrio.edu.br

RODRIGO DECEMRINO VARGAS BRASIL
SERGIAN VIANNA CARDOZO



DIAGNÓSTICO CLÍNICO E
IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
COM SUSPEITA DE


COVID-19

ATENDIDOS NO MUNICÍPIO
DE GUAPIMIRIM, RJ



DIALÉTICA
EDITORA

plos.org [Create account](#) [Sign in](#)



[Browse](#) [Publish](#) [About](#)

advanced search

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED
 RESEARCH ARTICLE

Epidemiological and genomic investigation of chikungunya virus in Rio de Janeiro state, Brazil, between 2015 and 2018

Filipe Romero Rebello Moreira, Mariane Talon de Menezes, Clarisse Salgado-Benvindo, Charles Whittaker, Victoria Cox, Nilani Chandradeva, Hury Hellen Souza de Paula, André Frederico Martins, Raphael Rangel das Chagas, Rodrigo Decembrino Vargas Brasil, Darlan da Silva Cândido, Alice Laschuk Herlinger, Marisa de Oliveira Ribeiro, [...], Renato Santana Aguiar [\[view all \]](#)

Version 2 Published: September 28, 2023 • <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011536>

0 Save	8 Citation
2,165 View	0 Share

Article

Authors

Metrics

Comments

Media Coverage

Peer Review

Download PDF

Print

Share



[HOME](#) | [SUBMIT](#) | [FAQ](#) | [BLOG](#) | [ALERTS / RSS](#) | [RESOURCES](#) | [ABOUT](#)

Advanced Search

[Follow this preprint](#)

Previous

Next

Epidemiological and genomic investigation of chikungunya virus in Rio de Janeiro state, Brazil, between 2015 and 2018

Filipe Romero Rebello Moreira, Mariane Talon de Menezes, Clarisse Salgado-Benvindo, Charles Whittaker, Victoria Cox, Nilani Chandradeva, Hury Hellen Souza de Paula, André Frederico Martins, Raphael Rangel das Chagas, Rodrigo Decembrino Vargas Brasil, Darlan da Silva Cândido, Alice Laschuk Herlinger, Marisa de Oliveira Ribeiro, Monica Barcellos Arruda, Patricia Alvarez, Marcelo Calado de Paula Tôrres, Ilaria Dorigatti, Oliver Brady, Carolina Moreira Voloch, Amílcar Tanuri, Felipe Iani, William Marciel de Souza, Sergian Vianna Cardozo, Nuno Rodrigues Faria, Renato Santana de Aguiar

doi: <https://doi.org/10.1101/2023.04.12.23288482>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed [what does this mean?]. It reports new medical research that has yet to be evaluated and so should not be used to guide clinical practice.

Posted April 20, 2023.

- [Download PDF](#)
- [Print/Save Options](#)
- [Author Declarations](#)
- [Supplementary Material](#)
- [Data/Code](#)

Subject Area

Epidemiology

- [Email](#)
- [Share](#)
- [Citation Tools](#)
- [Get QR code](#)

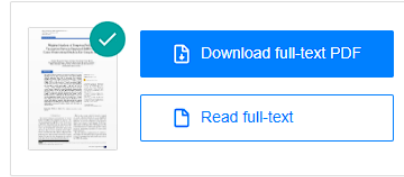
Article PDF Available

Weighted Analysis of Symptom Profiles by Vaccination Status in Suspected SARS-CoV-2 Cases: Observational Study in São Gonçalo, Brazil

September 2025 · *European Journal of Medical and Health Sciences* 7(5):63-66

DOI:10.24018/ejmed.2025.7.5.2380

License · [CC BY-NC-SA 4.0](#)



Authors:

- Raphael Rangel das Chagas** **Rodrigo Decembrino Vargas Brasil**
- Hércules Rezende Freitas** **Gabriella Carvalho**
- Michel Alexandre Villani Gantus** **Fabio S A Fortes**
- Sergian Vianna Cardozo**

[Hide](#)

[Download citation](#) [Copy link](#)

References (8)

Abstract

This study investigated symptom associations in SARS-CoV-2 positive individuals based on their vaccination status. Unvaccinated individuals exhibited significantly higher odds of experiencing severe symptoms, including fever > 38.5°C (logOR = 3.64, 95% CI: 1.52–5.77, p = 0.0008), rhinitis (logOR = 2.94, 95% CI: 0.82–5.05, p = 0.0065), headache (logOR = 2.17, 95% CI: 0.06–4.28, p = 0.0436), and myalgia (logOR = 3.25, 95% CI: 1.17–5.34, p = 0.0023). Conversely, unvaccinated individuals were less likely to report cough (logOR = -2.44, 95% CI: -4.53 to -0.34, p = 0.0226), potentially reflecting behavioral factors related to vaccine hesitancy. Among the vaccinated participants, symptom profiles varied according to vaccine type. Both Oxford-AstraZeneca and Pfizer-BNT162b2 vaccines were associated with increased odds of loss of smell (logOR = 0.81 and 1.47, respectively) and loss of taste (logOR = 0.75 for Oxford-AstraZeneca). Additionally, the Oxford-AstraZeneca vaccine was associated with dyspnea (logOR = 0.85, 95% CI: 0.02–1.69, p = 0.0449). These findings suggest that vaccination reduces the likelihood of severe systemic and respiratory symptoms, while influencing specific symptom manifestations in breakthrough cases. Ongoing research is essential for understanding vaccine-specific immune responses and their impact on clinical outcomes.

ResearchGate

Discover the world's research

- 25+ million members
- 160+ million publication pages
- 2.3+ billion citations

[Join for free](#)

11.4. ANEXO IV: Programação dos epítomos de aminoácidos para o processo de mapeamento dos epítomos reagentes.

Spot	Sequence	Spot	Sequence	Spot	Sequence
A01	MDPVYVDIDADSAFL	I10	DSLRLLLKPGGSLLIR	A06	QVIRPRPRPQRQAGQ
A02	VDIDADSAFLKALQR	I11	LKPGGSLLIRAYGYA	A07	RPRPQRQAGQLAQLI
A03	DSAFLLKALQRAYPMF	I12	SLLRIRAYGYADRTSE	A08	RQAGQLAQLISAVNK
A04	KALQRAYPMFEVEPR	I13	AYGYADRTSERVVCV	A09	LAQLISAVNKLTMRA
A05	AYPMFEVEPRQVTPN	I14	DRTSERVVCVLRKRF	A10	SAVNKLTMRVAVPQQK
A06	EVEPRQVTPNDHANA	I15	RVVCVLRKRFSSRA	A11	LTMRVAVPQQKPRRNR
A07	QVTPNDHANARAFSH	I16	LGRKFRSSRALKPPC	A12	VPQQKPRRNRKKNKKQ
A08	DHANARAFSHLAIKL	I17	RSSRALKPPCVTSNT	A13	PRRNRKKNKKQRQKKQ
A09	RAFSHLAIKLIEQEI	I18	LKPPCVTSNTEMFFL	A14	KNKKQRQKKQAPQND
A10	LAIKLEIEQIDPDST	I19	VTSNTEMFFLFSNFD	A15	RQKKQAPQNDPKQKK
A11	IEQEIDPDSTILDIG	I20	EMFFLFSNFDNGRRN	A16	APQNDPKQKKQPPQK
A12	DPDSTILDIGSAPAR	I21	FSNFDNGRRNFTTHV	A17	PKQKKQPPQKKPAQK
A13	ILDIGSAPARRMMSD	I22	NGRRNFTTHVMNNQL	A18	QPPQKKPAQKKKKPG
A14	SAPARRMMSDRKYHC	I23	FTTHVMNNQLNAAFV	A19	KPAQKKKKPGRRERM
A15	RMMSDRKYHCVCMPR	I24	MNNQLNAAFVQATR	A20	KKKPGRRERMCMKIE
A16	RKYHCVCMPRSAEDP	I25	NAAFVQATRAGCAP	A21	RRERMCMKIENDCIF
A17	VCPMRSAEDPERLAN	I26	GQATRAGCAPSYRVK	A22	CMKIENDCIFEVKHE
A18	SAEDPERLANYARKL	I27	AGCAPSYRVKRMEDIA	A23	NDCIFEVKHEGKVMG
A19	ERLANYARKLASAAG	I28	SYRVKRMEDIAKNDEE	A24	EVKHEGKVMGYACL
A20	YARKLASAAGKVLDR	I29	RMDIAKNDEECVVNA	A25	GKVMGYACLVGDKVM
A21	ASAAGKVLDRNISEK	I30	KNDEECVVNAANPRG	A26	YACLVGDKVMKPAHV
A22	KVLDRNISEKIGDLQ	J01	CVVNAANPRGLPGDG	A27	GDKVMKPAHVKGID
A23	NISEKIGDLQAVMAV	J02	ANPRGLPGDGVCKAV	A28	KPAHVKGIDNADLA
A24	IGDLQAVMAVPDAET	J03	LPGDGVCKAVYKKWP	A29	KGIDNADLAKLAFK
A25	AVMAVPDAETPTFCL	J04	VCKAVYKKWPESFKN	A30	NADLAKLAFKRSSKY
A26	PDAETPTFCLHTDVS	J05	YKKWPESFKNSATPV	B01	KLAFKRSSKYDLECA
A27	PTFCLHTDVSCRQRA	J06	ESFKNSATPVGTAKT	B02	RSSKYDLECAQIPVH
A28	HTDVSCRQRADVAIY	J07	SATPVGTAKTVMCGT	B03	DLECAQIPVHMKSDA
A29	CRQRADVAIYQDVYA	J08	GTAKTVMCGTYPVIH	B04	QIPVHMKSDASKFTH
A30	DVAIYQDVYAVHAPT	J09	VMCGTYPVIHAVGPN	B05	MKSDASKFTHKEPEG
B01	QDVYAVHAPTSLYHQ	J10	YPVIHAVGPNFNSYS	B06	SKFTHKEPEGYNNWH
B02	VHAPTSLYHQAIKGV	J11	AVGPNFNSYSESEGD	B07	EKPEGYNNWHHGAVQ
B03	SLYHQAIKGVVAVY	J12	FSNYSESEGDRELA	B08	YNNWHHGAVQYSGGR
B04	AIKGVVAVYWIGFDT	J13	ESEGDRELAAYREV	B09	HGAVQYSGGRFTIPT
B05	RVAVYWIGFDTTPFMY	J14	RELAAYREVAKEVT	B10	YSGGRFTIPTGAGKP
B06	IGFDTTPFMYNAMAG	J15	AYREVAKEVTRLGVN	B11	FTIPTGAGKPGDSGR
B07	TPFMYNAMAGAYPSY	J16	AKEVTRLGVNSVAIP	B12	GAGKPGDSGRPIFDN
B08	NAMAGAYPSYSTNWA	J17	RLGVNSVAIPLLSTG	B13	GDSGRPIFDNKGRVV
B09	AYPSYSTNWADEQVL	J18	SVAIPLLSTGVYSGG	B14	PIFDNKGRVVAVILG
B10	STNWADEQVLKAKNI	J19	LLSTGVYSGGKDRLT	B15	KGRVVAVILGGANEG
B11	DEQVLKAKNIGLCST	J20	VYSGGKDRLTQSLNH	B16	AIVLGGANEGARTAL

B12	KAKNIGLCSTDLTEG	J21	KDRLTQSLNHLFTAL	B17	GANEGARTALSVVTTW
B13	GLCSTDLTEGRRGKL	J22	QSLNHLFTALDSTDA	B18	ARTALSVVTTWNKDIV
B14	DLTEGRRGKLSIMRG	J23	LFTALDSTDADVVIY	B19	SVVTTWNKDIVTKITP
B15	RRGKLSIMRGKMKMP	J24	DSTDADVVIYCRDKE	B20	NKDIVTKITPEGAE
B16	SIMRGKMKPCDRVL	J25	DVVIYCRDKEWEKKI	B21	TKITPEGAEESLAL
B17	KMKPCDRVLFVSGS	J26	CRDKEWEKKIAEAIQ	B22	EGAEESLALPVLCL
B18	CDRVLFVSGSTLYPE	J27	WEKKIAEAIQMRTQV	B23	WSLALPVLCLLANTT
B19	FSVGSTLYPESRLL	J28	AEAIQMRTQVELLDE	B24	PVLCLLANTTFPCSQ
B20	TLYPESRLLKSWHL	J29	MRTQVELLDEHISVD	B25	LANTTFPCSQPPCTP
B21	SRLLKSWHLPSVFH	J30	ELLDEHISVDCDIIR	B26	FPCSQPPCTPCCYEK
B22	KSWHLPSVFHLKGKL	K01	HISVDCDIIRVHPDS	B27	PPCTPCCYEKEPEST
B23	PSVFHLKGKLSFTCR	K02	CDIIRVHPDSSLAGR	B28	CCYEKEPESTLRMLE
B24	LKGKLSFTCRCDTVV	K03	VHPDSSLAGRKGYST	B29	EPESTLRMLEDNVMR
B25	SFTCRCDTVVSCGY	K04	SLAGRKGYSTTEGSL	B30	LRMLEDNVMRPGYYQ
B26	CDTVVSCGYVVKRI	K05	KGYSTTEGSLYSYLE	C01	DNVMRPGYYQLLKAS
B27	SCEGYVVKRITISPG	K06	TEGSLYSYLEGTRFH	C02	PGYYQLLKASLTCSP
B28	VVKRITISPGLYGKT	K07	YSYLEGTRFHQTAVD	C03	LLKASLTCSPHRQR
B29	TISPGLYGKTTGYAV	K08	GTRFHQTAVDMAEVY	C04	LTCSPHRQRSTKDN
B30	LYGKTTGYAVTHHAD	K09	QTAVDMAEVYTMWPK	C05	HRQRSTKDNFNVYK
C01	TGYAVTHHADGFLMC	K10	MAEVYTMWPKQTEAN	C06	STKDNFNVYKATRPY
C02	THHADGFLMCKTTDT	K11	TMWPKQTEANEQVCL	C07	FNVYKATRPYLAHCP
C03	GFLMCKTTDTVDGER	K12	QTEANEQVCLYALGE	C08	ATRPYLAHCPDCGEG
C04	KTTDTVDGERVFSV	K13	EQVCLYALGESIESI	C09	LAHCPDCGEGHSCHS
C05	VDGERVFSVCTYVP	K14	YALGESIESIRQKCP	C10	DCGEGHSCHSPIALE
C06	VFSVCTYVPATICD	K15	SIESIRQKCPVDDAD	C11	HSCHSPIALERIRNE
C07	CTYVPATICDQMTGI	K16	RQKCPVDDADASSPP	C12	PIALERIRNEATDGT
C08	ATICDQMTGILATEV	K17	VDDADASSPPKTVPC	C13	RIRNEATDGTLKIQV
C09	QMTGILATEVTPEDA	K18	ASSPPKTVPCLCRYA	C14	ATDGTLKIQVSLQIG
C10	LATEVTPEDAQKLLV	K19	KTVPCLCRYAMTPER	C15	LKIQVSLQIGIKTDD
C11	TPEDAQKLLVGLNQR	K20	LCRYAMTPERVTRLR	C16	SLQIGIKTDDSHDWT
C12	QKLLVGLNQRIVVNG	K21	MTPERVTRLRMNHVT	C17	IKTDDSHDWTKLRYM
C13	GLNQRIVVNGRTQRN	K22	VTRLRMNHVTSIIVC	C18	SHDWTKLRYMDSHTP
C14	IVVNGRTQRNTNTMK	K23	MNHVTSIIVCSSFPL	C19	KLRYMDSHTPADAER
C15	RTQRNTNTMKNYLLP	K24	SIIVCSSFPLPKYKI	C20	DSHTPADAERAGLLV
C16	TNTMKNYLLPVVAQA	K25	SSFPLPKYKIEGVQK	C21	ADAERAGLLVRTSAP
C17	NYLLPVVAQAFSKWA	K26	PKYKIEGVQKVKCSK	C22	AGLLVRTSAPCTITG
C18	VVAQAFSKWAKECRK	K27	EGVQKVKCSKVMLFD	C23	RTSAPCTITGTMGHF
C19	FSKWAKECRKMEDE	K28	VKCSKVMLFDHNVPS	C24	CTITGTMGHFILARC
C20	KECRKMEDEKLLGI	K29	VMLFDHNVPSRVSPR	C25	TMGHFILARCPKGET
C21	DMEDEKLLGIRERTL	K30	HNVPSRVSPREYKSP	C26	ILARCPKGETLTVGF
C22	KLLGIRERTLTCCCL	L01	RVSPREYKSPQETAQ	C27	PKGETLTVGFTDSRK
C23	RERTLTCCCLWAFKK	L02	EYKSPQETAQEVSSST	C28	LTVGFTDSRKISHTC
C24	TCCCLWAFKKQKTH	L03	QETAQEVSSSTSLTH	C29	TDSRKISHTCTHPFH
C25	WAFKKQKTHTVYKRP	L04	EVSSSTSLTHSQFDL	C30	ISHTCTHPFHHEPPV
C26	QKTHTVYKRPDTQSI	L05	TSLTHSQFDLSVDGE	D01	THPFHHEPPVIGRER

C27	VYKRPDTQSIQKVPA	L06	SQFDLSVDGEELPAP	D02	HEPPVIGRERFHSRP
C28	DTQSIQKVPAEFDSF	L07	SVDGEELPAPSDLEA	D03	IGRERFHSRPQHGE
C29	QKVPAEFDSFVVPST	L08	ELPAPSDLEADAPIP	D04	FHSRPQHGKELPCST
C30	EFDSFVVPSTLWSSGL	L09	SDLEADAPIPEPTPD	D05	QHGKELPCSTYVQST
D01	VVPSTLWSSGLSIPLR	L10	DAPIPEPTPDDRAVL	D06	LPCSTYVQSTAATAE
D02	WSSGLSIPLRTRIKW	L11	EPTPDDRAVLTLPPT	D07	YVQSTAATAEEIEVH
D03	SIPLRTRIKWLLSKV	L12	DRAVLTLPPTIDNFS	D08	AATAEEIEVHMPPDT
D04	TRIKWLLSKVPKTDL	L13	TLPTIDNFSAVSDW	D09	EIEVHMPPDTPDRTL
D05	LLSKVPKTDLIPYSG	L14	IDNFSAVSDWVMNTA	D10	MPPDTPDRTLMTQQS
D06	PKTDLIPYSGDAKEA	L15	AVSDWVMNTAPVAPP	D11	PDRTLMTQQSGNVKI
D07	IPYSGDAKEARDAEK	L16	VMNTAPVAPPRRRRG	D12	MTQQSGNVKITVNGQ
D08	DAKEARDAEKEAEEE	L17	PVAPPRRRRGKLNLV	D13	GNVKITVNGQTVRYK
D09	RDAEKEAEEEREAE	L18	RRRRGKLNLVTCDER	D14	TVNGQTVRYKCNCGG
D10	EAEEREAEALTREAL	L19	KLNLVTCDEREENVL	D15	TVRYKCNCGGNEGL
D11	REAEALTREALPPLQA	L20	TCDEREENVLPMASV	D16	CNCGGNEGLTTTDDK
D12	TREALPPLQAAQDDV	L21	EGNVLPMASVRFRA	D17	SNEGLTTTDDKVINNC
D13	PPLQAAQDDVQVEID	L22	PMASVRFRAHLHSI	D18	TTTDDKVINNCKIDQC
D14	AQDDVQVEIDVEQLE	L23	RFFRAHLHSIVQETA	D19	VINNCKIDQCHAAVT
D15	QVEIDVEQLEDRAGA	L24	DLHSIVQETAeirDT	D20	KIDQCHAAVTNHKNW
D16	VEQLEDRAGAGIET	L25	VQETAeirDTAASLQ	D21	HAAVTNHKNWQYNP
D17	DRAGAGIETPRGAI	L26	EirDTAASLQAPLSV	D22	NHKNWQYNPLVPRN
D18	GIIETPRGAIKVTAQ	L27	AASLQAPLSVATEPN	D23	QYNPLVPRNAELGD
D19	PRGAIKVTAQPTDHV	L28	APLSVATEPNQLPIS	D24	LVPRNAELGDRKGI
D20	KVTAQPTDHVVGEYL	L29	ATEPNQLPISFGAPN	D25	AELGDRKGIHIFPF
D21	PTDHVVGEYLVLSQ	L30	QLPISFGAPNETFPI	D26	RKGKIHIFPLANVT
D22	VGEYLVLSQPTVLR	M01	FGAPNETFPIFGDF	D27	HIFPLANVTCRVPK
D23	VLSPQTVLRSQKLSL	M02	ETFPITFGDFDEGEI	D28	LANVTCRVPKARNPT
D24	TVLRSQKLSLIHALA	M03	TFGDFDEGEIESLSS	D29	CRVPKARNPTVYTGK
D25	QKLSLIHALAEQVKT	M04	DEGEIESLSSELLTF	D30	ARNPTVYTGKNQVTM
D26	IHALAEQVKTCTHSG	M05	ESLSSELLTFGDFSP	E01	VTYGKNQVTMLLYPD
D27	EQVKTCTHSGRAGRY	M06	ELLTFGDFSPGEVDD	E02	NQVTMLLYPDHPTLL
D28	CTHSGRAGRYAVEAY	M07	GDFSPGEVDDLTDSD	E03	LLYPDHPTLLSYRNM
D29	RAGRYAVEAYDGRIL	M08	GEVDDLTDSDWSTCS	E04	HPTLLSYRNMGEQPN
D30	AVEAYDGRILVPSGY	M09	LTSDWSTCSDTDE	E05	SYRNMGEQPNYHEEW
E01	DGRILVPSGYAISPE	M10	WSTCSDTDELLDRA	E06	GQEPNYHEEWTHKK
E02	VPSGYAISPEDFQSL	M11	DTDELLDRAGGYIF	E07	YHEEWTHKKEVTLT
E03	AISPEDFQSLSESAT	M12	LLDRAGGYIFSSDTG	E08	VTHKKEVTLTVPTG
E04	DFQSLSESATMVYNE	M13	GGYIFSSDTGPGHLQ	E09	EVTLTVPTGLEVTW
E05	SESATMVYNEREFVN	M14	SSDTGPGHLQQRSVR	E10	VPTEGLEVTWGNNEP
E06	MVYNEREFVNRKLHH	M15	PGHLQQRSVRQTVLP	E11	LEVTWGNNEPYKYWP
E07	REFVNRKLHHIALHG	M16	QRSVRQTVLPVNTLE	E12	GNNEPYKYWPQMSTN
E08	RKLHHIALHGALNT	M17	QTVLPVNTLEEVQEE	E13	YKYWPQMSTNGTAHG
E09	IALHGALNTDEESY	M18	VNTLEEVQEEKCYPP	E14	QMSTNGTAHGHPHEI
E10	PALNTDEESYELVRA	M19	EVQEEKCYPPKLDEV	E15	GTAHGHPHEIILYYY
E11	DEESYELVRAERTEH	M20	KCYPPKLDEVKEQLL	E16	HPHEIILYYYELYPT

E12	ELVRAERTEHEYVYD	M21	KLDEVKEQLLLLKKLQ	E17	ILYYYELYPTMTVVI
E13	ERTEHEYVYVDVQRR	M22	KEQLLLKKLQESASM	E18	ELYPTMTVVIIVSVAS
E14	EYVYVDVQRRCKKE	M23	LKKLQESASMANRSR	E19	MTVVIIVSVASFVLLS
E15	VDQRRCKKEEAAGL	M24	ESASMANRSRYQSRK	E20	VSVASFVLLSMVGTA
E16	CCKKEEAAGLVLVGD	M25	ANRSRYQSRKVENMK	E21	FVLLSMVGTAVGMCV
E17	EAAGLVLVGDLTNPP	M26	YQSRKVENMKATIVQ	E22	MVGTAVGMCVCARRR
E18	VLVGDLTNPPYHEFA	M27	VENMKATIVQRLKGG	E23	VGMCVCARRRCITPY
E19	LTNPPYHEFAYEGLR	M28	ATIVQRLKGGCKLYL	E24	CARRRCITPYELTPG
E20	YHEFAYEGLRIRPAC	M29	RLKGGCKLYLMSETP	E25	CITPYELTPGATVPF
E21	YEGLRIRPACPYKTA	M30	CKLYLMSETPKVPTY	E26	ELTPGATVPFLLSLL
E22	IRPACPYKTAVIGVF	N01	MSETPKVPTYRTTYP	E27	ATVPFLLSLLCCVRT
E23	PYKTAVIGVFGVPGS	N02	KVPTYRTTYPAPVYS	E28	LLSLLCCVRTTKAAT
E24	VIGVFGVPGSGKSAI	N03	RTTYPAPVYSPPINI	E29	CCVRTTKAATYYEAA
E25	GVPGSGKSAIKNLV	N04	APVYSPPINIRLSNP	E30	TKAATYYEAAAYLWN
E26	GKSAIKNLVTRQDL	N05	PPINIRLSNPESAVA	F01	YYEAAAYLWNEQQPL
E27	IKNLVTRQDLVTSKG	N06	RLSNPESAVAACNEF	F02	AYLWNEQQPLFWLQA
E28	TRQDLVTSKGKENCQ	N07	ESAVAACNEFLARNY	F03	EQQPLFWLQALIPLA
E29	VTSGKKENCQEISTD	N08	ACNEFLARNYPTVAS	F04	FWLQALIPLAALIVL
E30	KENCQEISTDVMRQR	N09	LARNYPTVASYQITD	F05	LIPLAALIVLCNCLK
F01	EISTDVMRQRNLEIS	N10	PTVASYQITDEYDAY	F06	ALIVLCNCLKLLPCC
F02	VMRQRNLEISARTVD	N11	YQITDEYDAYLDMVD	F07	CNCLKLLPCCCKTLA
F03	NLEISARTVDSLLL	N12	EYDAYLDMVDGSESC	F08	LLPCCCKTLAFLAVM
F04	ARTVDSLLLNGCNRP	N13	LDMVDGSESCDRAT	F09	CKTLAFLAVMSIGAH
F05	SLLLNGCNRPVVLY	N14	GSESCDRATFNPSK	F10	FLAVMSIGAHTVSAY
F06	GCNRPVVDLYVDEAF	N15	LDRATFNPSKLSYSP	F11	SIGAHTVSAYEHTV
F07	VDVLYVDEAFACHSG	N16	FNPSKLSYSPKQHSY	F12	TVSAYEHTVIPNTV
F08	VDEAFACHSGTLLAL	N17	LRSYSPKQHSYHAPTI	F13	EHTVIPNTVGVVYK
F09	ACHSGTLLALIALVR	N18	KQHSYHAPTIRSAVP	F14	IPNTVGVVYKTLVNR
F10	TLLALIALVRPRQKV	N19	HAPTIRSAVPSPFQN	F15	GVVYKTLVNRPGYSP
F11	IALVRPRQKVVLVCGD	N20	RSAVPSPFQNTLQNV	F16	TLVNRPGYSPMVLEM
F12	PRQKVVLVCGDPKQCG	N21	SPFQNTLQNVLAAAT	F17	PGYSPMVLEMELQSV
F13	VLCGDPKQCGFFNMM	N22	TLQNVLAAATKRNCN	F18	MVLEMELQSVTLEPT
F14	PKQCGFFNMMQMKVN	N23	LAAATKRNCNVTQMR	F19	ELQSVTLEPTLSLDY
F15	FFNMMQMKVNYNHNI	N24	KRNCNVTQMRELPTL	F20	TLEPTLSLDYITCEY
F16	QMKVNYNHNICTQVY	N25	VTQMRELPTLDSAVF	F21	LSLDYITCEYKTVIP
F17	YNHNICTQVYHKSIS	N26	ELPTLDSAVFNVECF	F22	ITCEYKTVIPSPYVK
F18	CTQVYHKSISRRTCL	N27	DSAVFNVECFKFKFAC	F23	KTVIPSPYVKCCGTA
F19	HKSISRRTCLPVTAI	N28	NVECFKFKFACNQEW	F24	SPYVKCCGTAECKDK
F20	RRCTLPVTAIVSSLH	N29	KKFACNQEWKEFAA	F25	CCGTAECKDKSLPDY
F21	PVTAIVSSLHYEGKM	N30	NQEWKEFAASPIRI	F26	ECKDKSLPDYSCKVF
F22	VSSLHYEGKMRTTNE	O01	KEFAASPIRITTENL	F27	SLPDYSCKVFTGVYP
F23	YEGKMRTTNEYNKPI	O02	SPIRITTENLTTYVT	F28	SCKVFTGVYPFMWGG
F24	RTTNEYNKPIVDDTT	O03	TTENLTTYVTKLKGK	F29	TGVYPFMWGGAYCFC
F25	YNKPIVDDTTGSTKP	O04	TTYVTKLKGPKAAAL	F30	FMWGGAYCFDAENT
F26	VDDTTGSTKPDGDL	O05	KLKGPKAAALFAKTH	G01	AYCFDAENTQLSEA

F27	GSTKPDGDLVLTFCF	O06	KAAALFAKTHNLLPL	G02	DAENTQLSEAHVEKS
F28	DPGDLVLTFCFRGWVK	O07	FAKTHNLLPLQEVPM	G03	QLSEAHVEKSECKT
F29	VLTCFRGWVKQLQID	O08	NLLPLQEVPMDFRTV	G04	HVEKSECKTEFASA
F30	RGWVKQLQIDYRGHE	O09	QEVPMDFRTVDMKRD	G05	ESCKTEFASAYRAHT
G01	QLQIDYRGHEVMTAA	O10	DRFTVDMKRDVKVTP	G06	EFASAYRAHTASASA
G02	YRGHEVMTAAASQGL	O11	DMKRDVKVTPGKHT	G07	YRAHTASASAKLRVL
G03	VMTAAASQGLTRKGV	O12	VKVTPGKHTTEERPK	G08	ASASAKLRVLYQGNN
G04	ASQGLTRKGVYAVRQ	O13	GKHTTEERPKVQVIQ	G09	KLRVLYQGNNITVAA
G05	TRKGVYAVRQKVNEN	O14	EERPKVQVIQAAEPL	G10	YQGNNITVAAYANGD
G06	YAVRQKVNENPLYAS	O15	VQVIQAAEPLATAYL	G11	ITVAAYANGDHAVTV
G07	KVNENPLYASTSEHV	O16	AAEPLATAYLCGIHR	G12	YANGDHAVTVKDAKF
G08	PLYASTSEHVNVLLT	O17	ATAYLCGIHRELVR	G13	HAVTVKDAKFVVGPM
G09	TSEHVNVLLTRTEGK	O18	CGIHRELVRRLNAVL	G14	KDAKFVVGPMSSAWT
G10	NVLLTRTEGKLVWKT	O19	ELVRRLNAVLLPNVH	G15	VVGPMSSAWTPFDNK
G11	RTEGKLVWKTLSGDP	O20	LNAVLLPNVHTLFD	G16	SSAWTPFDNKIVVYK
G12	LVWKTLSGDPWIKTL	O21	LPNVHTLFDMSAEDF	G17	PFDNKIVVYKGDVYN
G13	LSGDPWIKTLQNPPK	O22	TLFDMSAEDFDAIIA	G18	IVVYKGDVYNMDYPP
G14	WIKTLQNPPKGNFKA	O23	SAEDFDAIIAAHFKP	G19	GDVYNMDYPPFGAGR
G15	QNPPKGNFKATIKEW	O24	DAIIAAHFKPGDAVL	G20	MDYPPFGAGRPGQFG
G16	GNFKATIKEWVEHA	O25	AHFKPGDAVLETDIA	G21	FGAGRPGQFGDIQSR
G17	TIKEWEVEHASIMAG	O26	GDAVLETDIASFDKS	G22	PGQFGDIQSRTPESK
G18	EVEHASIMAGICNHQ	O27	ETDIASFDKSQDDSL	G23	DIQSRTPESKDVYAN
G19	SIMAGICNHQVTFDT	O28	SFDKSQDDSLALTAL	G24	TPESKDVYANTQLVL
G20	ICNHQVTFDTFQNK	O29	QDDSLALTALMLLED	G25	DVYANTQLVLQRPAA
G21	VTFDTFQNKANVCWA	O30	ALTALMLLEDLGVDH	G26	TQLVLQRPAAAGTVHV
G22	FQNKANVCWAKSLVP	P01	MLLEDLGVDHPLLDL	G27	QRPAAGTVHVPYSQA
G23	NVCWAKSLVPILETA	P02	LGVDHPLLDLIEAAF	G28	GTVHVPYSQAPSGFK
G24	KSLVPILETAGIKLN	P03	PLLDLIEAAFGEISS	G29	PYSQAPSGFKYWLKE
G25	ILETAGIKLNDRQWS	P04	IEAAFGEISSCHLPT	G30	PSGFKYWLKERGASL
G26	GIKLNDRQWSQIIQA	P05	GEISSCHLPTGTRFK	H01	YWLKERGASLQHTAP
G27	DRQWSQIIQAFKEDR	P06	CHLPTGTRFKFGAMM	H02	RGASLQHTAPFGCQI
G28	QIIQAFKEDRAYSPE	P07	GTRFKFGAMMKS GMF	H03	QHTAPFGCQIATNPV
G29	FKEDRAYSPEVALNE	P08	FGAMMKS GMFLTLFV	H04	FGCQIATNPVRVAVNC
G30	AYSPEVALNEICTRM	P09	KSGMFLTLFVNTLLN	H05	ATNPVRVAVNCAVGNI
H01	VALNEICTRMYGVDL	P10	LTLFVNTLLNITIAS	H06	RAVNCAVGNIPISID
H02	ICTRMYGVDLDSGLF	P11	NTLLNITIASRVLED	H07	AVGNIPISIDIPDAA
H03	YGVDLDSGLFSKPLV	P12	ITIASRVLEDRLTRS	H08	PISIDIPDAAFTRVV
H04	DSGLFSKPLVSVHYA	P13	RVLEDRLTRSACAAF	H09	IPDAAFTRVVDAPSV
H05	SKPLVSVHYADNHWD	P14	RLTRSACAAFIGDDN	H10	FTRVVDAPSVTDMSC
H06	SVHYADNHWDNRPGG	P15	ACAAFIGDDNIIHGV	H11	DAPSVTDMSCVDPAC
H07	DNHWDNRPGGKMGFG	P16	IGDDNIIHGVVSDLE	H12	TDMSCVDPACTHSSD
H08	NRPGGKMGFGNPEAA	P17	IIHGVVSDLEMAARC	H13	EVPACTHSSDFGGVA
H09	KMGFGNPEAASILER	P18	VSDLEMAARCATWMN	H14	THSSDFGGVAIIKYT
H10	NPEAASILERKYPFT	P19	MAARCATWMNMEVKI	H15	FGGVAIIKYTASKKG
H11	SILERKYPFTKGKWN	P20	ATWMNMEVKIIDAVV	H16	IIKYTASKKGKCAVH

H12	KYPFTKGGWNTNKQI	P21	MEVKIIDAVVSQKAP	H17	ASKKGGKCAVHSMTNA
H13	KGKWNTNKQICVTTR	P22	IDAVVSQKAPYFCGG	H18	KCAVHSMTNAVTIRE
H14	TNKQICVTTRRIEDF	P23	SQKAPYFCGGFILYD	H19	SMTNAVTIREADVEV
H15	CVTTRRIEDFNPNTN	P24	YFCGGFILYDTVAGT	H20	VTIREADVEVEGNSQ
H16	RIEDFNPNTNIIPAN	P25	FILYDTVAGTACRVA	H21	ADVEVEGNSQLQISF
H17	NPNTNIIPANRRLPH	P26	TVAGTACRVADPLKR	H22	EGNSQLQISFSTALA
H18	IIPANRRLPHSLVAE	P27	ACRVADPLKRLFCLG	H23	LQISFSTALASAEFR
H19	RRLPHSLVAEHRPVK	P28	DPLKRLFCLGKPLAA	H24	STALASAEFRVQVCS
H20	SLVAEHRPVKGERME	P29	LFKLGKPLAAGDEQD	H25	SAEFRVQVCSSTQVHC
H21	HRPVKGERMEWLVNK	P30	KPLAAGDEQDDRRR	H26	VQVCSSTQVHCAAACH
H22	GERMEWLVNKINGHH	Q01	GDEQDDRRRRALADE	H27	TQVHCAAACHPPKDH
H23	WLVNKINGHHVLLVS	Q02	DDRRRALADEVVRWQ	H28	AAACHPPKDHIVNYP
H24	INGHHVLLVSGYNLV	Q03	ALADEVVRWQRTGLT	H29	PPKDHIVNYPASHTT
H25	VLLVSGYNLVLPTKR	Q04	VVRWQRTGLTDELEK	H30	IVNYPASHTTLGVQD
H26	GYNLVLPTKRVTWVA	Q05	RTGLTDELEKAVHSR	I01	ASHTTLGVQDISTTA
H27	LPTKRVTWVAPLGR	Q06	DELEKAVHSRYEVQG	I02	LGVQDISTTAMSWVQ
H28	VTWVAPLGRGADYT	Q07	AVHSRYEVQGISVVV	I03	ISTTAMSWVQKITGG
H29	PLGRGADYTYNLEL	Q08	YEVQGISVVVMSMAT	I04	MSWVQKITGGVGLIV
H30	GADYTYNLELGLPAT	Q09	ISVVVMSMATFASSR	I05	KITGGVGLIVAVAAL
I01	YNLELGLPATLGRYD	Q10	MSMATFASSRSNFEK	I06	VGLIVAVAALILIVV
I02	GLPATLGRYDLVIIN	Q11	FASSRSNFEKLRGPV	I07	AVAALILIVVLCVSF
I03	LGRYDLVIINIHTPF	Q12	SNFEKLRGPVVTLYG	I08	ALILIVVLCVSFSRH
I04	LVIINIHTPFRIHHY	Q13	EKLRGPVVTLYGGPK	I09	
I05	IHTPFRIHHYQQCVD	A01	MEFIPTQTFYNRRYQ	I10	GYPKDGNAFNLDRI
I06	RIHHYQQCVDHAMKL	A02	TQTFYNRRYQPRPWA	I11	KEVPALTAVETGATN
I07	QQCVDHAMKLQMLGG	A03	NRRYQPRPWAPRPTI	I12	QEVRF
I08	HAMKLQMLGGDSLRL	A04	PRPWAPRPTIQVIRP		
I09	QMLGGDSLRLKPGG	A05	PRPTIQVIRPRPRPQ		

11.5. ANEXO V: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do CHIKV com vírus do gênero *Alphavirus* e *Flavivirus* com utilização do CLUSTAL W (software amplamente utilizado para alinhamento de seqüências de DNA ou proteínas).

Alignment: CHIKV X FLAVIVIRUS NÃO ESTRUTURAL

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10         20         30         40         50
CHIK NÃO E  -----MDPVY V D I D A D S A F L  K A L Q R A Y P M F  E V E P R Q V T P N
DEN1 NÃO E  D S G C V I N W K G  R E L K C G S G I F  V T N E V H - - - -  - T W T E Q Y K F Q  A D S P K R L S A A
DEN2 NÃO E  D S G C V V S W K N  K E L K C G S G I F  V T D N V H - - - -  - T W T E Q Y K F Q  P E S P S K L A S A
DEN3 NÃO E  D M G C V I N W K G  K E L K C G S G I F  V T N E V H - - - -  - T W T E Q Y K F Q  A D S P K R L A T A
DEN4 NÃO E  D M G C V V S W T G  K E L K C G S G I F  V T D N V H - - - -  - T W T E Q Y Q F Q  P E S P A R L A S A
YEFV NÃO E  D Q G C A I N F G K  R E L K C G D G I F  I F R D S D - - - -  - D W L N K Y S Y Y  P E D P V K L A S I
ZIKV NÃO E  D V G C S V D F S K  K E T R C G T G V F  I Y N D V E - - - -  - A W R D R Y K Y H  P D S P R R L A A A
55          : : : : . * . * : : : : : : : * . * : : : : * : : : : * : : : : : : : : : : * : : : : : : : *

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                60         70         80         90         100
CHIK NÃO E  -----D H A  N A R - - - - A F S H  L A I K L I - - - -  - - - - E Q E I D  P D S      T
DEN1 NÃO E  I G R A W E E G V C  G I R S A T R L E N  I M W K Q I S N E L  N H I L L E N D I K  F T V V V G N A N G
DEN2 NÃO E  I Q K A H E E G I C  G I R S V T R L E N  L M W K Q I T S E L  N H I L S E N E V K  L T I M T G D I K G
DEN3 NÃO E  I A G A W E N G V C  G I R S T T R M E N  L L W K Q I A N E L  N Y I L W E N N I K  L T V V V G D I I G
DEN4 NÃO E  I L N A H K D G V C  G I R S T T R L E N  V M W K Q I T N E L  N Y V L W E G G H D  L T V V A G D V K G
YEFV NÃO E  V K A S F E E G K C  G L N S V D S L E H  E M W R S R A D E I  N A I F E E N E V D  I S V V V Q D P K N
ZIKV NÃO E  V K Q A W E E G I C  G I S S V S R M E N  I M W K S V E G E L  N A I L E E N G V Q  L T V V V G S V K N
55          . . . . * . * : : : : : * . * : : : : * : : : : * : : : : : : : : : : : * . * : : : : * . *

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                110        120        130        140        150
CHIK NÃO E  I L D I G S A P A R  R M M S D R K Y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - H C V C P M
DEN1 NÃO E  I L A Q G K K M I R  P Q P M E H K Y S W  K S W G K A K I I G  A D I Q N T T F I I  D G P D T P E C P D
DEN2 NÃO E  I M Q V G K R S L R  P Q P T E L R Y S W  K T W G K A K M L S  T E L H N Q T F L I  D G P E T A E C P N
DEN3 NÃO E  V L E Q G K R T L T  P Q P M E L K Y S W  K T W G K A K I V T  A E T Q N S S F I I  D G P N T P E C P S
DEN4 NÃO E  V L V K G K R A L T  P P V N D L K Y S W  K T W G K A K I F T  P E A K N S T F L I  D G P D T S E C P N
YEFV NÃO E  V Y Q R G T H P F S  R I R D G L Q Y G W  K T W G K N L V F S  P G R K N G S F I I  D G K S R K E C P F
ZIKV NÃO E  P M W R G P Q R L P  V P V N E L P H G W  K A W G K S Y F V R  A A K T N N S F V V  D G D T L K E C P L
55          . : : : : : : * : : : : : : : * . . * : : : : : : : . . * : : : : : : : * : : : : : : : . .

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                160        170        180        190        200
CHIK NÃO E  R S A E D P E R L A  N Y A R K L A S A A  G K V L D R N I S E  K I G D L Q A V M A  V P D A E T P T F C
DEN1 NÃO E  E Q R A - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N I W E  V E D Y G F G I F -
DEN2 NÃO E  T N R A - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N S L E  V E D Y G F G V F -
DEN3 NÃO E  A S R A - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N V W E  V E D Y G F G V F -
DEN4 NÃO E  E R R A - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N F L E  V E D Y G F G M F -
YEFV NÃO E  S N R V - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N S F Q  I E E F G T G V F -
ZIKV NÃO E  E H R A - - - - - W  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N S F L  V E D H G F G V F -
55          . : : * * . . . . * * : : : : * . . : : : : : : * . . : : * . * : : : : * . . : : : : : : :

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                210        220        230        240        250
CHIK NÃO E  L H T D V S C R Q R  A D V A I Y Q D V Y  A V H A P T S L Y H  Q A I K G V - - - - - R V A Y W I G F D
DEN1 NÃO E  - T T N I W L K - -  - - - - - L R D S Y  T Q M C D H R L M S  A A I K D S K A V H  A D M G Y W I E S -
DEN2 NÃO E  - T T N I W L R - -  - - - - - L R E K Q  D A F C D S K L M S  A A I K D N R A V H  A D M G Y W I E S -

```

DEN3 NÃO E -TTNIWLK-- -----LREVV TQSCDHRLMS AAIKDERAVH ADMGYWIES-
DEN4 NÃO E -TTSIWMK-- -----FREGS SEVCDHRLMS AAIKDQKAVH ADMGYWLES-
YEFV NÃO E -TTRVYMD-- -----AVFEY TIDCDGSILG AAVNGKKSAAH GSPTFFWMGSH
ZIKV NÃO E -HTSVWLK-- -----VREDY SLECDPAVIG TAVKGREAAH SDLGYWIES-
55 *:::*::: :*:**...** :...***:*: :*:::*::* :*:::*::**

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
260 270 280 290 300
CHIK NÃO E TTPFMY---- ----NAMAGA YPSYSTNWAD EQ----VLKA KNIGL-C-ST
DEN1 NÃO E EKNETWKLAR ASFIEVKTCI WPKSHTLWSN GVLESEMIIP KMYGGPISQH
DEN2 NÃO E ALNDTWKIEK ASFIEVKSCH WPKSHTLWSN GVLESEMVIP KNIAGPVSQH
DEN3 NÃO E QKNGSWKLEK ASFIEVKTCT WPKSHTLWSN GVLESDMIIP KSLAGPISQH
DEN4 NÃO E SKNQTWQIEK ASLIEVKTCL WPKTHTLWSN GVLESQMLIP KAYAGPFSQH
YEFV NÃO E EVNGTWMiht LEALDYKECE WPLTHTIG-T SVEESEMFMP RSIGGPVSSH
ZIKV NÃO E EKNDTWRLKR AHLIEMKTCE WPKSHTLWTD GVEESDLIIP KSLAGPLSHH
55 :*:::*::* :*:::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
310 320 330 340 350
CHIK NÃO E DLTEGR---- - ---RGKLS IMRG ---KK ---MKPCDRV LFSVGSSTLYP
DEN1 NÃO E NYRPGYFTQT AGPWHLGKLE LDFDLCEGTT VVDEHCGSR GPSLR--TTT
DEN2 NÃO E NNRPGYHTQT AGPWHLGKLE MDFDFCEGTT VVTEECGNR GPSLR--TTT
DEN3 NÃO E NHRPGYHTQT AGPWHLGKLE LDFNYCEGTT VVITENCGTR GPSLR--ATT
DEN4 NÃO E NYRQGYATQT MGPWHLGKLE IDFGCEPGTT VTIQEDCDHR GPSLR--TTT
YEFV NÃO E NHIPGYKVQT NGPVMQVPLE VKREACPGTS VIIDGNCDGR GKSTR--STT
ZIKV NÃO E NTREGYRTQV KGPWHSEELE IRFECEPGTK VYVEETCGTR GPSLR--STT
55 :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
360 370 380 390 400
CHIK NÃO E ESRKLLKSWH LPSV----- FHLKGKLSFT CRCDTVVSCE GYVVKRITIS
DEN1 NÃO E VTGKIIHEWC CRSC TLPLR FRGEDGCWYG MEIRPVKEKE ENLVRSM-VS
DEN2 NÃO E ASGKLITWC CRSC TLPLR YRGEDGCWYG MEIRPLKEKE ENLVSSL-VT
DEN3 NÃO E VSGKLIHEWC CRSC TLPLR YMGEDGCWYG MEIRPVNEKE ENMVKSL-VS
DEN4 NÃO E ASGKLVTQWC CRSC TMPLR FLGEDGCWYG MEIRPLSERE ENMVKSQ-VS
YEFV NÃO E DSGKVIPEWC CRSC TMPPVS FHGSDGCWYP MEIRPRKTHE SHLVRSW-VT
ZIKV NÃO E ASGRVIEEWC CRECTMPLS FRAKDG CWYG MEIRPRKEPE SNLVRSM-VT
55 :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
410 420 430 440 450
CHIK NÃO E PGLYGKTTGY AVTHHADGFL MCKTTDT-----VDGERVSFS-
DEN1 NÃO E AGS-----G- EVDSFSLGI- LCVSIMIEEV MRSRWSRKML MTGT LAVFLL
DEN2 NÃO E AGH-----G- QIDNFSLGI- LGMALFLEEM LRTRVGTKHA ILLVAVSFLT
DEN3 NÃO E AGS-----G- KVDNFTMGV- LCLAILFEEV MRGKFGKHHM IAGVLF T FVL
DEN4 NÃO E AGQ-----G- SSETFSMGL- LCLTLFIEEC LRRKVTRKHM ILVVVTT FCA
YEFV NÃO E AGE-----I- --HAVPFGL- VSMMIAMEVV LRKRQGPQOM LVGGVLLGA
ZIKV NÃO E AGS-----TD HMDHFS LGV- LVILLMVQEG LKKRMTTKII MSTSM AVL VV
55 :*** :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::* :*::*::*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
460 470 480 490 500
CHIK NÃO E -----VCTYVPA TICDQMTG--- -----I
DEN1 NÃO E LIMQLTWND LIRLCIMVGA NASD-KMGMG TTYLALMATF KMRP MFAVGL
DEN2 NÃO E LITGNMSFRD LGRVMVMVGA TMTD-DIGMG VTYLALLAAF KVRPTFAAGL
DEN3 NÃO E LLSGQITWRD MAHTLIMIGS NASD-RMGMG VTCLAL IATF KIQPFLALGF

55

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1260      1270      1280      1290      1300
CHIK NÃO E VTFDT-FQNK ANVCWAKSLV PILETAGIKL NDRQWSQIIQ AFKEDRAYSP
DEN1 NÃO E KTFDTEYQKT KNNDWDYVVT TD----- ISEMG NFRADRVIDP
DEN2 NÃO E KTFDSEYVKT RTNDWDFVVT TD----- ISEMG NFKAERVIDP
DEN3 NÃO E KTFDTEYQKT KLNDWDFVVT TD----- ISEMG NFKADRVIDP
DEN4 NÃO E KTFDTEYPKT KLTDWDFVVT TD----- ISEMG NFRAGRVIDP
YEFV NÃO E KTFEREYPTI KQKKPDFILA TD----- IAEMGA NLCVERVLDC
ZIKV NÃO E KTFETEFQKT KNQEWDFVIT TD----- ISEMG NFKADRVIDS
55

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1310      1320      1330      1340      1350
CHIK NÃO E EVALNEICTR MYGVDLDSGL FSKPLVSVHY ADNHWDRPG GKMFGENPEA
DEN1 NÃO E RRCLKPVILK DG---PERVI LAGPMPVTVA SAAQRRGR ----- IGRNQNK
DEN2 NÃO E RRCMKPVILT DG---EERVI LAGPMPVTHS SAAQRRGR ----- IGRNPRN
DEN3 NÃO E RRCLKPVILT DG---PERVI LAGPMPVTAA SAAQRRGR ----- VGRNPQK
DEN4 NÃO E RRCLKPVILT DG---PERVI LAGPIPVTVA SAAQRRGR ----- IGRNPAQ
YEFV NÃO E RTAFKPVLDV EG----RKVA IKGPLRISAS SAAQRRGR ----- IGRNPNR
ZIKV NÃO E RRCLKPVILD -----GERVI LAGPMPVTHA SAAQRRGR ----- IGRNPNK
55

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1360      1370      1380      1390      1400
CHIK NÃO E ASILERKYPF TKGKWN TNKQ -ICVTT--RR IEDFNPNTNI IPANRRLPH-
DEN1 NÃO E E---GDQYVY MGQPLNDED HAHWTEAKML LDNINTPEGI IPALFEPERE
DEN2 NÃO E E---NDQYIY MGEPLEDED CAHWKEAKML LDNINTPEGI IPSMFEPERE
DEN3 NÃO E E---NDQYIF TGQPLNDED HAHWTEAKML LDNINTPEGI IPALFEPERE
DEN4 NÃO E E---DDQYVF SGDPLKDED HAHWTEAKML LDNIYTPEGI IPTLFGPERE
YEFV NÃO E D---GDSYYY SEPTSENAH HVCWLEASML LDNMEVRGGM VAPLYGVEGT
ZIKV NÃO E P---GDEYMY GGGCAETDEG HAHWLEARML LDNIYLQDGL IASLYRPEAD
55

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1410      1420      1430      1440      1450
CHIK NÃO E -----
DEN1 NÃO E KSAAIDGEYR LRGEARKTFV ELMRRGDLPV WLSYKVASEG FQYSRRWCF
DEN2 NÃO E KVDAIDGEYR LRGEARKTFV DLMRRGDLPV WLAYKVAEAG INYADRRWCF
DEN3 NÃO E KSAAIDGEYR LKGESRKTFF ELMRRGDLPV WLAHKVASEG IKYTRDKWCF
DEN4 NÃO E KTQAIDGFR LRGEQRKTFF ELMKRGDLPV WLSYKVASAG ISYKDREWCF
YEFV NÃO E KTPVSPGEMR LRDDQRKVFR ELVRNCDLPV WLSWQVAKAG LKTNDRKWCF
ZIKV NÃO E KVAIEGEFEK LRTEQRKTFF ELMKRGDLPV WLAYQVASAG ITYTRRWCF
55

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1460      1470      1480      1490      1500
CHIK NÃO E -----SLVA EHRPVKGERM EWLVNKINGH HVLLVSGYNL
DEN1 NÃO E DGERNNQVLE ENMD-VEIWT KEGERKKLRP RWLDARTYSD PLALREFKEF
DEN2 NÃO E DGTRNNQILE ENVE-VEIWT KEGERKKLRP RWLDARIYSD PLALKEFKEF
DEN3 NÃO E DGERNNQILE ENMD-VEIWT KEGERKKLRP RWLDARTYSD PLALKEFKDF
DEN4 NÃO E TGERNNQILE ENME-VEIWT REGEKKLRP KWLDRVYAD PMALKDFKEF
YEFV NÃO E EGPEEHEILN DSGETVKCRA PGGAKKPLRP RWCDERVSSD QSALSEFIKF
ZIKV NÃO E DGTTNNTIME DSVP-AEVWT KYGEKRVLPK RWMDARVCS HAALKSFKEF
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1510      1520      1530      1540      1550
CHIK NÃO E VLPTKRVTWV APLGIRGADY TYNLELG-LP ATLGR-YDLV IINI HT
DEN1 NÃO E A----- --AGRRSVSG DLILEIGKLP QHLTLRAQNA LDNLVMLHNS
DEN2 NÃO E A----- --AGRKSLTL NLITEMGRLP TFMTQKARDA LDNLAVLHTA
DEN3 NÃO E A----- --AGRKSIAL DLVTEIGRVP SHLAHRTRNA LDNLVMLHTS
DEN4 NÃO E A----- --SGRKSITL DILTEIASLP TYLSSRAKLA LDNIVMLHTT
YEFV NÃO E A----- --EGRRGAA- EVLVVLSELP DFLAKKGGEA MDTISVFLHS
ZIKV NÃO E A----- --AGKRGAA- GVMEALGTLG GHMTERFQEA IDNLAVLMRA
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1560      1570      1580      1590      1600
CHIK NÃO E PFRIHHYQQC V---DHAMKL QMLGGDSLRL LKPGGSLLI- RAYGYADRTS
DEN1 NÃO E EQGGKAYRHA MEELPDTIET LMLLA--LIA VLTGGVTLFF LSGKGLGKTS
DEN2 NÃO E EAGGKAYNHA LSELPETLET LLLLT--LLA TVTGGIFLFL MSGRGIGKMT
DEN3 NÃO E EHGGRAYRHA VEELPETMET LLLLG--LMI LLTGGAMLFL ISGKGIGKTS
DEN4 NÃO E ERGGRAYQHA LNELPESLET LMLVA--LLG AMTAGIFLFF MQGKGIGKLS
YEFV NÃO E EEGSRAYRNA LSMMPPEAMTI VMLFI--LAG LLTSGMVIFF MSPKGISRMS
ZIKV NÃO E ETGSRPYKAA AAQLPETLET IMLLG--LLG TVSLGIFFVL MRNKGIGKMG
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1610      1620      1630      1640      1650
CHIK NÃO E ERVVCVLGRK FRSS-RALKP PCVTSNTEMF FLFSNFDNGR RNFTTHVMNN
DEN1 NÃO E IGLLCVTASS ALLWMAVSEP HWIAASIILE FFLMVLLIPE PDRQRTPODN
DEN2 NÃO E LGMCCIIITAS ILLWYAQIQP HWIAASIILE FFLIVLLIPE PEKQRTPODN
DEN3 NÃO E IGLICVIASS GMLWMADVPL QWIASAIVLE FFMMVLLIPE PEKQRTPODN
DEN4 NÃO E VGLIAIAVAS GLLWVAEIQP QWIAASIILE FFLMVLLIPE PEKQRTPODN
YEFV NÃO E MAMGTMAGCG YLMFLGGVKP THISYVMLIF FVLMVVVIPE PGQORSIQDN
ZIKV NÃO E FGMVTLGASA WLMWLSEIEP ARIACVLIVV FLLLVLVIPE PEKQRSPODN
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1660      1670      1680      1690      1700
CHIK NÃO E QLNAAFVQQA TRAGCAPSYR VKRMDIAKND EECVVNAANP RGLPGDGVCK
DEN1 NÃO E QLAYVVIGLL FMILTVAANE MGLLETTKKD LGIGHVA--- ----AENH--
DEN2 NÃO E QLTYVIIAIL TVVAATMANE MGFLEKTKKD LGLGHIA--- ----TQ-Q--
DEN3 NÃO E QLAYVVIGIL TLAAIVAANE MGLLETTKRN LGMSKEP--- ----GV-V--
DEN4 NÃO E QLIYVILAIL TIIGLVAANE MGLIEKTKAD FGFYQVK--- -----
YEFV NÃO E QVAYLIIGIL TLVSAVAANE LGMLEKTKED LFGKKNLI-- ----PSSA--
ZIKV NÃO E QMAIIMVAV GLLGLITANE LGWLERTKND IAHLMGRR-- ----EEGA--
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1710      1720      1730      1740      1750
CHIK NÃO E AVYKKWPESF KNSATPVGTA KTVMCGT--- --YPVIHAVG PNFSNYSESE
DEN1 NÃO E -QHATILDV- ---DLHPASA WTLYAVATTV ITPMMRHTIE NTTANISLTA
DEN2 NÃO E -PESNILDI- ---DLRPASA WTLYAVATTF ITPMLRHSIE NSSVNVSLTA
DEN3 NÃO E -SPTSYLVD- ---DLHPASA WTLYAVATTV ITPMLRHTIE NSTANVSLAA
DEN4 NÃO E -TETTILDV- ---DLRPASA WTLYAVATTI LTPMLRHTIE NTSANLSLAA
YEFV NÃO E -SPWSWPD- ---DLKPGAA WTVYVGVITM LSPMLHHWIK VEYGNLSLSG
ZIKV NÃO E -TMGFSDI- ---DLRPASA WAIYAALTTL ITPAVQHAVT TSYNNYSLMA
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1760      1770      1780      1790      1800
CHIK NÃO E GDRELAAYR EVAKEVTRLG VNSVAIPLLS TGVYSGGKDR -LTQSLN---
DEN1 NÃO E IANQ-AAILM GLDKG-WPIS KMDLGVPLLA LGCYSQVNPL TLTAAVLMLV
DEN2 NÃO E IANQ-ATVLM GLGKG-WPLS KMDIGVPLLA IGCYSQVNPI TLTAALLMLV
DEN3 NÃO E IANQ-AVVLN GLDKG-WPIS KMDLGVPLLA LGCYSQVNPL TLTAAVLLLV
DEN4 NÃO E IANQ-AAVLM GLGKG-WPLH RMDLGVPLLA MGCYSQVNPT TLTASLVMLL
YEFV NÃO E IAQS-ASVLS FMDKG-IPFM KMNISVIMLL VSGWNSITVM PLLCGIGCAM
ZIKV NÃO E MATQ-AGVLF GMGKG-MPFM HGDLGVPLLM MGCYSQLTPL TLIVAILLV
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1810      1820      1830      1840      1850
CHIK NÃO E -----H LFTALDSTDA DVVIYCRDKE
DEN1 NÃO E AHYAIIGPGL QAKATREAQK RTAAGIMKNP TVDGIVAILD DPVYD--AK
DEN2 NÃO E AHYAIIGPGL QAKATREAQK RAAAGIMKNP TVDGITVIDL DPIPYD--PK
DEN3 NÃO E THYAIIGPGL QAKATREAQK RTAAGIMKNP TVDGIMTIDL DPVIYD--SK
DEN4 NÃO E VHAYIIGPGL QAKATREAQK RTAAGIMKNP TVDGITVIDL EPISYD--PK
YEFV NÃO E LHWSLILPGI KAQQSKLAQR RVFHGVAENP VVDGNPTVDI EEAPEM-PAL
ZIKV NÃO E AHYMYLIPGL QAAAARAQK RTAAGIMKNP VVDGIVVTDI DTMTID--PQ
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1860      1870      1880      1890      1900
CHIK NÃO E WEKKIAEAIQ MRT---QVEL LDEHISVDCD IIRVH--PDS SL-AG-----
DEN1 NÃO E FEKQLGQIML LILCTSQILL MRTT-WALCE SITLATGPLT TLWEGSPGKF
DEN2 NÃO E FEKQLGQVML LVLCVTQVLM MRTT-WALCE ALTLATGPVS TLWEGNPGRF
DEN3 NÃO E FEKQLGQVML LVLCVQLLL MKTS-WALCE VLTATGPIT TLWEGSPGKF
DEN4 NÃO E FEKQLGQVML LVLCAGQLL MRTT-WAFCE VLTATGPVL TLWEGNPGRF
YEFV NÃO E YEKKLALYLL LALSASVAM CRTP-FSLAE GIVLASAALG PLIEGNTSLL
ZIKV NÃO E VEKKMGQVLL IAVAISAVL LRTA-WGWGE AGALITAATS TLWEGSPNKY
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1910      1920      1930      1940      1950
CHIK NÃO E -----RKGYSTT EGSLSYLEG TRF--HQTAV DMAEVYTMWP
DEN1 NÃO E WNTTIAVSMA NIFRGSYLAG AGLAFSLMKS LGGRRGTGA QGETLGEKWK
DEN2 NÃO E WNTTIAVSMA NIFRGSYLAG AGLLFSIMKN TTSTR-----
DEN3 NÃO E WNTTIAVSMA NIFRGSYLAG AGLAFSIMKS VGTGKRGTGS QGETLGEKWK
DEN4 NÃO E WNTTIAVSTA NIFRGSYLAG AGLAFSLIKN AQTPRRGTT TGETLGEKWK
YEFV NÃO E WNGPMAVSMT GVMRGNHYAF VGVMYNLWKM KT--GRRGSA NGKTLGEVWK
ZIKV NÃO E WNSSTATSLC NIFRGSYLAG ASLIYTVTRN AGLVKRRGGG TGETLGEKWK
55

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1960      1970      1980      1990      2000
CHIK NÃO E KQTEANEQVC LYALGESIES IRQKCPVDDA DASSPPKTVP CLCRYAMTPE
DEN1 NÃO E RQLNQLSK--- -----
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E KKLNQLSR--- -----
DEN4 NÃO E RQLNSLDR--- -----
YEFV NÃO E RELNLLDK--- -----
ZIKV NÃO E ARLNQMSA--- -----
55

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          2010          2020          2030          2040          2050
CHIK NÃO E RVTRLRMNHV TSIIVCSSFP LPKYKIEGVQ KVKCSKVMLF DHNVPSRVSP
DEN1 NÃO E -----SE FNTYKRSGIM EVDRS-----
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E -----KE FDLYKKSGIT EVDRT-----
DEN4 NÃO E -----KE FEEYKRSGIL EVDRT-----
YEFV NÃO E -----RQ FELYKRTDIV EVDRD-----
ZIKV NÃO E -----LE FYSYKKSGIT EVCRE-----
55
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          2060          2070          2080          2090          2100
CHIK NÃO E REYKSPQETA QEVSSTTSLT HSQFDLSVDG EELPAPSDLE ADAPIPEPTP
DEN1 NÃO E -----E AKEGLKR-----
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E -----E AKEGLKR-----
DEN4 NÃO E -----E AKSALKD-----
YEFV NÃO E -----T ARRHLAE-----
ZIKV NÃO E -----E ARRALKD-----
55
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          2110          2120          2130          2140          2150
CHIK NÃO E DDRAVLTLPP TIDNFSAVSD WVMNTAPVAP PRRRRGKNLN VTCDEREGNV
DEN1 NÃO E ---GET-TKH AVSRGTAKLR WFVERNLVKP ----EGKVID LGCGRGG---
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E ---GEI-THH AVSRGSAKLO WFVERN MVIP ----EGRVID LGCGRGG---
DEN4 NÃO E ---GSK-IKH AVSRGSSKIR WIVERGMVKP ----KGKVVD LGCGRGG---
YEFV NÃO E ---GKVDTGV AVSRGTAKLR WFHERGYVKL ----EGRVID LGCGRGG---
ZIKV NÃO E ---GVATGGH AVSRGSAKIR WLEERGYLQP ----YGKVVD LGCGRGG---
55
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          2160          2170          2180          2190          2200
CHIK NÃO E LPMASVRFFR ADLHSIVQET AEIRD TAASL QAPLSVATEP NQLPISFGAP
DEN1 NÃO E ----WSYYC AGLKKVT----EVK ----GYTKGGP
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E ----WSYYC AGLKKVT---EVR-----GYTKGGP
DEN4 NÃO E ----WSYYM ATLKNVT---EVK-----GYTKGGP
YEFV NÃO E ----WCYYA AAQKEVS---GVK-----GFTLGRD
ZIKV NÃO E ----WSYYA ATIRKVQ---EVR-----GYTKGGP
55
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          2210          2220          2230          2240          2250
CHIK NÃO E NETFPITFGD FDEGEIESLS SELLTFGDFS PGEVDDLTDSDWSTCSDTDD
DEN1 NÃO E GHEEPIPMAT YGWNLVKLHS GKDV-F-FMP PEKCDTL---
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E GHEEPVPMST YGWNIVKLMS GKDV-F-YLP PEKCDTL---
DEN4 NÃO E GHEEPIPMAT YGWNLVKLHS GVDV-F-YKP TEQVDTL---
YEFV NÃO E GHEKPMNVQS LGWNIITFKD KTDI-H-RLE PVKCDTL---
ZIKV NÃO E GHEEPMNVQS YGWNIVRLKS GVDV-F-HMA AEPKCDTL---
55
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

                2260          2270          2280          2290          2300
CHIK NÃO E ELXLDRAGGY IFSSDTGPGH LQQRSVRQTV LPVNTLEEVQ EEKC-----
DEN1 NÃO E --LCD----- IGESSPNPTI EEGRTLRLVLK MVEPWLRG-- NQFCIKILNP
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E --LCD----- IGESSPSPTV EESRTIRVLK MVEPWLKN-- NQFCIKVLNP
DEN4 NÃO E --LCD----- IGESSSNPTI EEGRTLRLVLK MVEPWLSSK- PEFCIKVLNP
YEFV NÃO E --LCD----- IGESSSSSVT EGERTVRVLD TVEKWLAGCV DNFCVKVLAP
ZIKV NÃO E --LCD----- IGESSSSPEV EETRTRLRVLS MVGDWLEKRP GAFCIKVLCP
55

```

```

                2310          2320          2330          2340          2350

```

```

CHIK NÃO E YPPKLDEVKE QLLLKKLQES A---SMANRS RYQSRKVENM KATIVQRLKG
DEN1 NÃO E YMPSVVETLE QMQRK-HGGM LVRNPLSRNS THEMYWVSCG TGNIVSAVNM
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E YMPTVIEHLE RLQRK-HGGM LVRNPLSRNS THEMYWISNG TGNIVSSVNM
DEN4 NÃO E YMPTVIEELE KLQRK-HGGS LIRCPLSRNS THEMYWVSGA SGNIVSSVNT
YEFV NÃO E YMPDVLEKLE LLQRR-FGGT VIRNPLSRNS THEMYVYVSGA RSNVTFTVNO
ZIKV NÃO E YTSTMMETME RLQRR-HGGG LVRVPLCRNS THEMYWVSGA KSNIIKSVST
55

```

```

                2360          2370          2380          2390          2400

```

```

CHIK NÃO E GCKLYLMSET PKVPTYRTTY PAPVYSPPIN IRLSNPESAV AACNEFLARN
DEN1 NÃO E TSRMLLN--- ----RFTMAH RKPTYERDVD --LGAGTRHV AVEPEVANLD
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E VSRLLLN--- ----RFTMTH RRPTIEKDVD --LGAGTRHV NAEPETPNMD
DEN4 NÃO E TSKMLLN--- ----RFTTRH RKPTYEKDVD --LGAGTRSV STETEKPDMT
YEFV NÃO E TSRLLMR--- ----RMRRT GKVTLADV --LPIGTRSV ETDKGPLDKE
ZIKV NÃO E TSQLLLG--- ----RMDGPR RPKVYEEVDN --LGSSTRAV ASCAEAPNMK
55

```

```

                2410          2420          2430          2440          2450

```

```

CHIK NÃO E YPTVASYQIT DEYDAYLDMV DGSESCLDRA TFNPSKLSRY PKQHSYHAPT
DEN1 NÃO E IIGQRIENIK NEHKST---- -----WHYD --EDNPYKTW AYHGSYEVKP
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E VIGERIKRIK EEHSST---- -----WHYD --DENPYKTW AYHGSYEVKA
DEN4 NÃO E IIGRRLQRLQ EEHKET---- -----WHYD --QENPYRTW AYHGSYEAPS
YEFV NÃO E AIEERVERIK SEYMTS---- -----WFD --NDNPYRTW HYCGSYVTKT
ZIKV NÃO E IIGRRIERIR NEHAET---- -----WFLD --ENHPYRTW AYHGSYEAPT
55

```

```

                2460          2470          2480          2490          2500

```

```

CHIK NÃO E IRSVAVSPFQ NTLQNVLAAA TKRNCNVTQM RELPTLDSAV FNVE-CFKKF
DEN1 NÃO E SGSAS--SMV NGVVRLITKP WDVIPMVTQI ---AMTDTP FGQQRVFKEK
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E TGSAS--SMI NGVVKLLTKP WDVVPMVTQM ---AMTDTP FGQQRVFKEK
DEN4 NÃO E TGSAS--SMV NGVVKLLTKP WDVIPMVTQL ---AMTDTP FGQQRVFKEK
YEFV NÃO E SGSAA--SMV NGVIKILTYP WDRIEEVTRM ---AMTDTP FGQQRVFKEK
ZIKV NÃO E QGSAS--SLV NGVVRLITKP WDVVTGVTGI ---AMTDTP YGQQRVFKEK
55

```

```

                2510          2520          2530          2540          2550

```

CHIK NÃO E -----ACN QEYWKFEAAS --PIRITTEN LTT-----
DEN1 NÃO E VDTRTPRAKR GTAQIMEVTA KWLWGFLSRN KKPRICTREE FTRKVRSNAA
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E VDTRTPRPMP GTRKVMEITA EWLWRTLGRN KRPRLECTREE FTKKVRTNAA
DEN4 NÃO E VDTRTPQPKL GTRVVMTTTA NWLWALLGRK KNPRLECTREE FISKVRSNAA
YEFV NÃO E VDTRAKDPPA GTRKIMKVVN RWLFRHLARE KNPRLECTREE FIAKVRSHAA
ZIKV NÃO E VDTRVPDPQE GTRQVMNIVS SWLWKELGKR KRPRVCTKEE FINKVRSNAA
55

....|....||....||....||....||....|
2560 2570 2580 2590 2600

CHIK NÃO E -----YVTKLKG PKAAALFAKT HNLLPLQEV MDRFTVDMKR
DEN1 NÃO E IGAVFVDENQ WNSAKEAVED ERFWDLVHRE RELHKQKCA TCVYNMMGKR
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E MGAVFTEENQ WDSARAAVED EEFWKLVDRE RELHKLKCG SCVYNMMGKR
DEN4 NÃO E IGAVFQEEQG WTSASEAVND SRFWELVDKE RALHQEGKCE SCVYNMMGKR
YEFV NÃO E IGAYLEEQQE WKTANEAVQD PKFWELVDEE RKLHQGRCR TCVYNMMGKR
ZIKV NÃO E LGAIFEEKE WKTAVEAVND PRFWALVDRE REHHLRGECH SCVYNMMGKR
55

....|....||....||....||....||....|
2610 2620 2630 2640 2650

CHIK NÃO E DVKVTPGTXH TEERPKVQVI QAAEPL---A TAY-----LCGIH
DEN1 NÃO E EKKLGEFGKA KGSRAIWYMW LGARFLEFEA LGFMNEDHWF SRENSLSGVE
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E EKKLGEFGKA KGSRAIWYMW LGARYLEFEA LGFLNEDHWF SRENSYSGVE
DEN4 NÃO E EKKLGEFGRA KGSRAIWYMW LGARFLEFEA LGFLNEDHWF GRENSWSGVE
YEFV NÃO E EKKLSEFGKA KGSRAIWYMW LGARYLEFEA LGFLNEDHWA SRENSGGGVE
ZIKV NÃO E EKKGQEFGKA KGSRAIWYMW LGARFLEFEA LGFLNEDHWM GRENSGGGVE
55

....|....||....||....||....||....|
2660 2670 2680 2690 2700

CHIK NÃO E RELVRRNAV LLPNVHTLFD MSAEDFDAII AAHFKPGDAV LETDIASFDF
DEN1 NÃO E GEGLHKLGYI -----LRD-----ISKIPGGNM YADDTAGWDT
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E GEGLHKLGYI -----LRD-----ISKIPGGAM YADDTAGWDT
DEN4 NÃO E GEGLHRLGYI -----LED-----IDRKDGLM YADDTAGWDT
YEFV NÃO E GIGLQYLGIV -----IRD-----LAAMDGGGF YADDTAGWDT
ZIKV NÃO E GLGLQRLGYI -----LEE-----MNRAPGGKM YADDTAGWDT
55

....|....||....||....||....||....|
2710 2720 2730 2740 2750

CHIK NÃO E SQDDSLALTA LMLLEDLGVD HPLLDLI--E AAFGE-ISSC HL--PTGTRF
DEN1 NÃO E RITEDDLQNE AKITDIMEPE HALLATSIFK LTYQNKVVRV QRPKNG-TV
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E RITEDDLHNE EKITQQMDPE HRQLANAIFK LTYQNKVVKV QRPTPKG-TV
DEN4 NÃO E RITEDDLLNE ELITEQMAPH HRILAKAIFK LTYQNKVVKV LRPTPKG-AV
YEFV NÃO E RITEADLDE QEILNYMSPH HKKLAQVME MTYKNKVVKV LRPAPGGKAY
ZIKV NÃO E RISKFDLENE ALITNQMEEG HRTLALAVIK YTYQNKVVKV LRPAEGGKT
55

....|....||....||....||....||....|
2760 2770 2780 2790 2800

CHIK NÃO E ----KFGAMM KSGMFLTLFV NTLNITIAS RVLEDRLTRS ACAA-FIGDD

DEN1 NÃO E MDVISRRDQR GSGQVGTYGL NTFTNMEVQL -----IRQ MESEGIFFPS
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E MDIISRKDQR GSGQVGTYGL NTFTNMEAQL -----VRQ MEGEGVLSKA
DEN4 NÃO E MDIISRKDQR GSGQVGTYGL NTFTNMEVQL -----IRQ MEAEGVITQD
YEFV NÃO E MDVISRRDQR GSGQVVTYAL NTITNLKVQL -----IRM AEAEMVIHHQ
ZIKV NÃO E MDIISRQDQR GSGQVVTYAL NTFTNLVVQL -----IRN MEAEVLEMQ
55

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2810 2820 2830 2840 2850

CHIK NÃO E NIIHGVVSDE LMAARCATWM NMEVKIIDAV VSQKAPYFCG GFILYDTVAG
DEN1 NÃO E E---LESP-N L-AERVLDWL EKHGA-----ERLKRMAISG
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E D---LENP-H PLEKKITQWL ETKGV-----ERLKRMAISG
DEN4 NÃO E D---MQNP-K GLKERVEKWL KECGV-----DRLKRMAISG
YEFV NÃO E H---VQDCDE SVLTRLEAWL TEHGC-----DRLKRMAVSG
ZIKV NÃO E D---LWLL-R K-PEKVTRWL QSNGW-----DRLKRMAVSG
55

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2860 2870 2880 2890 2900

CHIK NÃO E TACRVADPLK RLFKLGKPLA AGDEQDDRR RALADEVVRW QRTGLTDELE
DEN1 NÃO E DDCVVK-PID DRFATALI-- ALND-----M GKVRKDIPQW EPSKGWNDWQ
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E DDCVVK-PID DRFANALL-- ALND-----M GKVRKDIPQW QPSKGWHDWQ
DEN4 NÃO E DDCVVK-PLD ERFSTSL-- FLND-----M GKVRKDIPQW EPSKGWKNWQ
YEFV NÃO E DDCVVR-PID DRFGLALS-- HLNA-----M SKVRKDISEW QPSKGWNDWE
ZIKV NÃO E DDCVVK-PID DRFAHALR-- FLND-----M GKVRKDTQEW KPSTGWSNWE
55

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2910 2920 2930 2940 2950

CHIK NÃO E -----KAVH SRYEVQGISV VVMSMAT---
DEN1 NÃO E QVPFCSHHFH QLIMKDGREI VVPCRNQDEL VGRARVSQGA GWSLRETACL
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E QVPFCSHHFH ELIMKDGRKL VVPCRPQDEL IGRARISQGA GWSLKETACL
DEN4 NÃO E EVPFCSHHFH KIFMKDGRSL VVPCRNQDEL IGRARISQGA GWSLKETACL
YEFV NÃO E NVPFCSHHFH ELQLKDGRRI VVPCREQDEL IGRGRVSPGN GWMIKETACL
ZIKV NÃO E EVPFCSHHFN KLYLKDGRSI VVPCRHQDEL IGRARVSPGA GWSIRETACL
55

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
2960 2970 2980 2990 3000

CHIK NÃO E -----F-----ASSRS-----
DEN1 NÃO E GKSYAQMWQL MYFHRRDLRL AANAICSAVP VDWVPTSRTT WSIHAHHQWM
DEN2 NÃO E -----
DEN3 NÃO E GKAYAQMWSL MYFHRRDLRL ASNAICSAVP VHWVPTSRTT WSIHAHHQWM
DEN4 NÃO E GKAYAQMWSL MYFHRRDLRL ASMAICSAVP TEWFPTSRTT WSIHAHHQWM
YEFV NÃO E SKAYANMWSL MYFHKRDMRL LSLAVSSAVP TSWVPQGRTT WSIHGKGEWM
ZIKV NÃO E AKSYAQMWQL LYFHRRDLRL MANAICSAVP VDWVPTGRTT WSIHGKGEWM
55

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3010 3020 3030 3040 3050

CHIK NÃO E -----
DEN1 NÃO E TTEDMLSVWN RVWIEENPWM EDKTHVSSWE EVPYLGKRED QWCGSLIGLT

DEN1 EST -----
DEN2 EST -----
DEN3 EST -----
DEN4 EST -----
YFV EST -----
ZIKV EST -----
0 ..*::*.. :..***:.. * :.:*:*: :.:*:*:.. *::*:*:::

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 210 220 230 240 250
CHIK EST FTIPTGAGKP GDSGRPIFDN KGRVVAIVLG GANEGARTAL SVVTWNKDIV
DEN1 EST -----
DEN2 EST -----
DEN3 EST -----
DEN4 EST -----
YFV EST -----
ZIKV EST -----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 260 270 280 290 300
CHIK EST TKITPEGAEE WSLALPVLCL LANTTFPCSQ PPCTPCCYEK EPESTLRMLE
DEN1 EST -----
DEN2 EST -----
DEN3 EST -----
DEN4 EST -----
YFV EST -----
ZIKV EST -----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 310 320 330 340 350
CHIK EST DNVMRPGYYQ LLKASLTCSP HRQRRSTKDN FNVYKATRPY LAHCPDCGEG
DEN1 EST -----MNN QRKKTG-RPS FNMLKRARNR VSTG-----
DEN2 EST -----MNN QRKKAR-NTP FNMLKRERNR VSTV-----
DEN3 EST -----MNN QRKKTG-KPS INMLKVRNR VSTG-----
DEN4 EST -----MN QRKKVV-RPP FNMLKRERNR VSTP-----
YFV EST -----MS GRKAQGKTLG VNMVRRGVRS LSN-----
ZIKV EST -----MKN PKEEIRRIRI VNMLKRGVAR VNPL-----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 360 370 380 390 400
CHIK EST HSCHSPIALE RIRNEATDGT LKIQVSLQIG IKTDDSHDWT KLYMDSHTP
DEN1 EST -----SQ LAKRFS-----
DEN2 EST -----QQ LTKRFS-----
DEN3 EST -----SQ LAKRFS-----
DEN4 EST -----QG LVKRFS-----
YFV EST -----KIKQKT-----
ZIKV EST -----G- GLKRLP-----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 410 420 430 440 450
CHIK EST ADAERAGLLV RTSAPCTITG TMGHFILARC PKGETLTVGF TDSRKI----
DEN1 EST -----KGLLS GQ-GPMKLV AFIAFLRFLA ---IPPTAGI LARWSSFKKN

DEN2 EST -----LGMLQ GR-GPLKLFM ALVAFRLRFLT ---IPPTAGI LKRWGTIKKS
DEN3 EST -----RGLLN GQ-GPMKLV M AFIAFLRFLA ---IPPTAGV LARWGTFKKS
DEN4 EST -----IGLFS GK-GPLRMVL AFITFLRVLS ---IPPTAGI LKRWGQLKKT
YFV EST -----KQIGN RP-GPSRGVQ GFIFFFLFNI LTGKKITAH L KRLWKMLDPR
ZIKV EST -----AGLLL GH-GPIRMVL AILAFRLRFTA ---IKPSLGL INRWGWSVGKK
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
460 470 480 490 500

CHIK EST -SHTCTHPFH HEP-----PVI GRERFHSRPQ HGKELPCSTY VQSTAATAEE
DEN1 EST GAIKVLRGFK KEISSMLNIM NRRKRS---- ----VTMLLM LLPT-----A
DEN2 EST KAINVLRGFR KEIGRMLNIL NRRRRT---- ----AGMIIM LIPT-----V
DEN3 EST GAIKVLKGFK KEISNMLSII NKRKKT---- ----SLCLMM ILPA-----T
DEN4 EST KAIKILTGFR KEIGRMLNIL NGRKRS---- ----TVTLLC LIPT-----V
YFV EST QGLAVLRKVK RVVASLMRGL SSRKRRSHDV LTVQFLILGM LLMT-----G
ZIKV EST EAMEI IKKFK KDLAAMLRII NARKERKRRG ADTSIGIIGL LLTT-----A
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
510 520 530 540 550

CHIK EST IEVHMPPDTP DRTLMTQOSG NVKI-----TV NGQTVRYKCN CGGSNEGLTT
DEN1 EST LAFHL----- ----TTRGG EPHMIVSKQE RGKSLLFK-- ----
DEN2 EST MAFHL----- ----TTRNG EPHMIVSRQE KGKSLLFK-- ----
DEN3 EST LAFHL----- ----TSRDG EPRMIVGKNE RGKSLLFK-- ----
DEN4 EST MAFHL----- ----STRDG EPLMIVAKHE RGRPLLFK-- ----
YFV EST -GVTL----- ----VRKNR WLLLNVTSED LGKT-----
ZIKV EST MAAEI----- ----TRRGS AYYMYLDRSD AGKAISFA-- ----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
560 570 580 590 600

CHIK EST TDKVINNCKI DQCHAAVTNH KNWQYNSPLV PRNAELGDRK GKIHIPFPLA
DEN1 EST TSAGVNMCTL IAMDLGELCE DTMTYKCPRI TE-AEPD--- ----
DEN2 EST TKDGTNMCTL MAMDLGELCE DTITYKCPFL KQ-NEPE--- ----
DEN3 EST TASGINMCTL IAMDLGEMCD DTVTYKCPLI AE-VEPE--- ----
DEN4 EST TTEGINKCTL IAMDLGEMCE DTVTYKCPLL VN-TEPE--- ----
YFV EST FSVGTGNCTT NILEAKYWCP DSMEYNCPNL SPREEPD--- ----
ZIKV EST TTLGVNKCHV QIMDLGHMCD ATMSYEC PML DEGVEPD--- ----
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
610 620 630 640 650

CHIK EST NVTCRVPKAR NPTV TYGKNQ VTML-LYP-- DHPTLLSYRN MGQEPNYHEE
DEN1 EST DVDCWCNAT- DTWV TYGTCS Q-TGEHRRDK RSVALAPHVG LGLET-RTET
DEN2 EST DIDCWCNST- STWV TYGTCT T-TGEHRRDK RSVALAPHVG MGLET-RTET
DEN3 EST DIDCWCNLT- STWV TYGTCT Q-AGEHRRDK RSVALAPHVG MGLDT-RTQT
DEN4 EST DIDCWCNLT- STWV MYGTCT Q-NGERRREK RSVALTPHSG MGLET-RAET
YFV EST DIDCWCYGVE NRVVAYGKCD S-AGRSRRSR RAIDLP THEN HGLKT-RQEK
ZIKV EST DVDCWCNTT- STWV VYGTCH HKKGEARRSR RAVTLPSHST RKLQT-RSQT
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
660 670 680 690 700

CHIK EST WVTHKKEVTL TVPTEGLEVT WGNNEPYKYW PQMSTNGTAH GHPHEIILYY
DEN1 EST WMSSE----- ----GA WKQIQKVETW AL-----RHPGFVIAL
DEN2 EST WMSSE----- ----GA WKHAQRIETW IL-----RHPGFTIMAA

DEN3 EST WMSAE----- -----GA WRQVEKVETW AL-----RHPGFITLAL
DEN4 EST WMSSE----- -----GA WKHAQRVESW IL-----RNPGFALLAG
YFV EST WMTGR----- -----MG ERQLQKIERW FV-----RNPFFAVTAL
ZIKV EST WLESR----- -----EY TKHLIKVENW IF-----RNPGFALVAV
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
710 720 730 740 750
CHIK EST YELYPTMTVV IVSVASFVLL SMVGTAVGMC -VCARRRCIT PYELTPGATV
DEN1 EST FLAHAIGTSI TQKGIIFILL MLVTPSMAMR CVGIGNRDF- VEGLSGATWV
DEN2 EST ILAYTIGTTH FQRVLIFILL TAIAPSMTMR CIGISNRDF- VEGVSGGSWV
DEN3 EST FLAHYIGTSL TQKVVFIFILL MLVTPSMTMR CVGVGNRDF- VEGLSGATWV
DEN4 EST FMAYMIGQTG IQRTVFFVLM MLVAPSYGMR CIGVGNRDF- VEGVSGGAWV
YFV EST TIAYLVGSNM TQRVVIALLV LAVGPAYSAH CIGITDRDF- IEGVHGWTWV
ZIKV EST AIAWLLGSST SQKVIYLVMI LLIAPAYSIR CIGVSNRDF- VEGMSGGTWV
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
760 770 780 790 800
CHIK EST PFLLSLLCCV RTTKA-----
DEN1 EST DVVLEHGSCV TTMAKNKPTL DIELLKTEVT NPAVLRKLCI EAKISNTTTD
DEN2 EST DIVLEHGSCV TTMAKNKPTL DFELIKTEAK QPATLRKYCI EAKLTNTTTD
DEN3 EST DVVLEHGGCV TTMAKNKPTL DIELQKTEAT QLATLRKLCI EGKITNITTD
DEN4 EST DLVLEHGGCV TTMAQKPTL DFELIKTTAK EVALLRKYCI EASISNITTA
YFV EST SATLEQDKCV TVMAPDKPSL DISLETVAID RPAEVRKVCY NAVLTHVKIN
ZIKV EST DVVLEHGGCV TVMAQDKPTV DIELVTTTTS NMAEVRKYCY EASISDMASD
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
810 820 830 840 850
CHIK EST -ATYYEAAAY L-----W NEQQPLFWLQ ALIPLAALIV
DEN1 EST SRCPTQGEAT LVEEQDANFV CRRTFVDRGW GNGCGLFGKG SLLTCAKF--
DEN2 EST SRCPTQGEPT LNEEQDKRFV CKHSMVDRGW GNGCGLFGKG GIVTCAMF--
DEN3 EST SRCPTQGEAI LPEEQDQNYV CKHTYVDRGW GNGCGLFGKG SLVTCAMF--
DEN4 EST TRCPTQGEPEY LKEEQDQQYI CRRDVVDRGW GNGCGLFGKG GVVTCAMF--
YFV EST DKCPSTGEAH LAEENEGDNA CKRTYSDRGW GNGCGLFGKG SIVACAMF--
ZIKV EST SRCPTQGEAY LDKQSDTQYV CKRTLVDVDRGW GNGCGLFGKG SLVTCAMF--
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
860 870 880 890 900
CHIK EST LCNCLKLLPC ---CCKTLAF LAVMSI--GA H-----TV SAYEHVTVIP
DEN1 EST --KCVTKLEG KIVQYENLKY SVIVTVHTGD Q-HQVGNETT EHGTIATITP
DEN2 EST --TCKKNMEG KIVQPENLEY TVVITPHSGE E-HAVGNDTG KHGKEVKITP
DEN3 EST --QCLEPIEG KVVQHENLKY TVIITVHTGD Q-HQVGNDTQ --GVTVEITP
DEN4 EST --SCSGKITG NLVQIENLEY TVVVTVHNGD T-HAVGNDTS NHGVTATITP
YFV EST --TCAKSMSL FEVDQTKIQY VIRAQLVHGA KQENWN TDIKTLKFDA
ZIKV EST --TCSKKMTG KSIQPENLEY RIMLSVHGSQ HSGMIGYETD EDRAKVEVTP
0

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
910 920 930 940 950
CHIK EST NTVGVYPYKTL VNRPGYSPMV LEMELQSVTL EPTLSLDYIT CEYKTVIPSP
DEN1 EST QA----PTSE IQLTDYGALT LDC----- SPRTGLDFNE MVLLTMKEKS
DEN2 EST QS----SITE AELTGYGTVT MEC----- SPRTGLDFNE MVLLQMEDKA
DEN3 EST QA----STVE AILPEYGTLG LEC----- SPRTGLDFNE MILLTMKNKA


```

YFV EST      DDLTAAINKG ILVTVNPIAS TND--DEVLI EV-----
ZIKV EST      VDMQTLTPVG RLITANPVIT ESTENSKMML EL-----
0
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1210          1220          1230          1240          1250
CHIK EST      MSCEVPACTH SSDFGGVAII -----KY TASKKKGCAV HSMTNAV TIR
DEN1 EST      ----- EPPFGESYIV VGAGEKALKL SWFKKGSSIG K-MFEATARG
DEN2 EST      ----- EPPFGDSYII IGAEPGQLKL DWFKKGSSIG Q-MFETTMRG
DEN3 EST      ----- EPPFGESNIV IGIGDKALKI NWKYKKGSSIG K-MFEATARG
DEN4 EST      ----- EPPFGDSYIV IGVGDSALTL HWFRKGSSIG K-MFESTYRG
YFV EST      ----- NPPFGDSYII VGRGDSRLTY QWHKEGSSIG K-LFTQTMKG
ZIKV EST      ----- DPPFGDSYIV IGVGDKKITH HWHRSGSTIG K-AFEATVRG
0
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1260          1270          1280          1290          1300
CHIK EST      EADVEVEGNS QLQISFSTAL ASAEFRVQVC STQVHCAAAC HPPKDHI VNY
DEN1 EST      ARRMAILGDT AWDFGSIG-- --GVFT--SV-----G
DEN2 EST      AKRMAILGDT AWDFGSLG-- --GVFT--SI-----G
DEN3 EST      ARRMAILGDT AWDFGSVG-- --GVLN--SL-----G
DEN4 EST      AKRMAILGET AWDFGSVG-- --GLFT--SL-----G
YFV EST      VERLAVMGDT AWDFSSAG-- --GFFT--SV-----G
ZIKV EST      AKRMAVLGDT AWDFGSVG-- --GVFN--SL-----G
0
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1310          1320          1330          1340          1350
CHIK EST      PASHTTLGV- QDISTTAMSW VQKITGGVGL IVAVA-----ALIL
DEN1 EST      KLVHQVFGTA YGVLFSGVSW TMKIGIGILL TWLGLNSRST SLSMTCIAVG
DEN2 EST      KALHQVFGAI YGAAFGVSW TMKILIGVII TWIGMNSRST SLSVSLVLVG
DEN3 EST      KMVHQIFGSA YTALFSGVSW IMKIGIGVLL TWIGLNSKNT SMSFSCIAIG
DEN4 EST      KAVHQVFGSV YTTMFGGVSW MVRILIGLLV LWIGTNSRNT PMAMTCIAVG
YFV EST      KGIHTVFGSA FQGLFGGLNW ITKVIMGAVL IWVGINTRNM TMSMSMILVG
ZIKV EST      KGIHQIFGAA FKSLFSGMSW FSQILIGTLL VWLGLNTKNG SISLTCLALG
0
.....

.....|.....| ..
          1360
CHIK EST      IVVLCVSFSR H-
DEN1 EST      MVTLYLGVMV QA
DEN2 EST      IVTLYLGVMV QA
DEN3 EST      IITLYLGAVV QA
DEN4 EST      GITLFLGFTV QA
YFV EST      VIMMFLSLGV GA
ZIKV EST      GVMIFLSTAV SA
0
.....

```

Alignment: CHIKV X ALPHAVIRUS NÃO ESTRUTURAL

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
CHIK - NÃO    MDPVYVDIDA DSAFLKALQR AYPMFEVEPR QVTPNDHANA RAFSHLAIKL
EEEV - NÃO    -EKVHVDLDA DSPFVKSLQR CFPHEIEIAT QVTDNDHANA RAFSHLATKL
MAYV - NÃO    MSKVFDIEA  ESPFLKSLQR AFPAFEVEAQ QVTPNDHANA RAFSHLATKL
WEEV - NÃO    MERIHVDLDA DSPYVKSLQR TFPQFEIEAR QVTDNDHANA RAFSHVATKL

```

60

..:.*:.*:.* :.:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
60 70 80 90 100

CHIK - NAO IEQEIDPDST ILDIGSAPAR RMMSDRKYHC VCPMRS AEDP ERLANYARKL
EEEV - NAO IEGEVDTDQV ILDIGSAPVR HTHSKHKYHC ICPMKS AEDP DRLYRYADKL
MAYV - NAO IEQETEKDTL ILDIGSAPAR RMMSEHTYHC VCPMRS AEDP ERLLYYARKL
WEEV - NAO IESEVDRDQV ILDIGSAPVR HAHSNHRYHC ICPMIS AEDP DRLQRYAERL
60 ***.*:.*:.* *:*:*:*:* *:*:*:*:* .:.*:.*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
110 120 130 140 150

CHIK - NAO ASAAGKVLDR NISEKIGDLQ AVMAVPDAET PTFCLHTDVS CRQRADVAIY
EEEV - NAO RK--SDVTDK CIASKAADLL TVMSTPDAET PSLCMHTDST CRYHGSVAVY
MAYV - NAO AKASGEVVDR NIAAKIDDLQ SVMATPDNES RTFCLHTDQT CRTQAEVAVY
WEEV - NAO KK--SDITDK NIASKAADLL EVMSTPDAET PSLCMHTDAT CRYFGSVAVY
60 *:*:*:*:* .:.*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* :*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
160 170 180 190 200

CHIK - NAO QDVYAVHAPT SLYHQAIKGV RVAYWIGFDT TPFMYNAMAG AYPSYSTNWA
EEEV - NAO QDVYAVHAPT SIYYQALMGV RTIYWIGFDT TPFMYKNMAG AYPTYNTNWA
MAYV - NAO QDVYAVHAPT SLYFQALMGV RTAYWIGFDT TPFMFDTMAG AYPTYATNWA
WEEV - NAO QDVYAVHAPT SIYHQALMGV RTIYWIGFDT TPFMYKNMAG SYPTYNTNWA
60 **:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* :*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
210 220 230 240 250

CHIK - NAO DEQVLKAKNI GLCSTDLTEG RRGKLSIMRG KKMKPCDRVL FSVGSTLYPE
EEEV - NAO DESVLEARNI GLGSSDLHEK SFGKVSIMRK KKLQPTNKVI FSVGSTIYTE
MAYV - NAO DEQVLKARNI GLCSASLTEG HLGKLSIMRK KKMTPSDQIM FSVGSTLYIE
WEEV - NAO DERVLEARNI GLGNSDLQES RLGKLSILRK KRLQPTNKII FSVGSTIYTE
60 *.***:* *:*:*:*:* .:***:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
260 270 280 290 300

CHIK - NAO SRKLLKSWHL PSVFHLKGLK SFTCRCDTVV SCEGYVVKRI TISPGLYGKT
EEEV - NAO ERILLRSWHL PNVFHLKGLK SFTGRCNTIV SCEGYVVKKI TLSPGIYGKV
MAYV - NAO SRLLKSWHL PSVFHLKGRQ SYTCRCDTIV SCEGYVVKKI TMSPGVFGKT
WEEV - NAO DRSLLRSWHL PNVFHLKGLK NFTGRCGTIV SCEGYVIKKI TISPGLYGKV
60 **:*:*:*.* *:*:*:*:*: *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
310 320 330 340 350

CHIK - NAO TGYAVTHHAD GFLMCKTTDT VDGERVSFSV CTYVPATICD QMTGILATEV
EEEV - NAO DNLASTMHRE GFLSCKVTD TLRGERVSFPV CTYVPATLCD QMTGILATDV
MAYV - NAO SGYAVTHHAE GFLVCKTTDT IAGERVSFPI CTYVPSTICD QMTGILATEV
WEEV - NAO ENLASTMHRE GFLSCKVTD TLRGERVSFAV CTYVPATLCD QMTGILATDV
60 ***** *:*:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:* *:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
360 370 380 390 400

CHIK - NAO TPEDAQKLLV GLNQIRIVVNG RTQRNTNTMK NYLLPVVAQA FSKWAKECRK
EEEV - NAO SVDDAQKLLV GLNQIRIVVNG RTQRNTNTMQ NYLLPVVAQA FSRWAREHRA

MAYV - NÃO TPEDAQKLLV GLNQRIVVNG RTQRNTNTMK NYLLPVVSQA FSKWAKEYRL
WEEV - NÃO SVDDAQKLLV GLNQRIVVNG RTQRNTNTMQ NYLLPVVAQA FSRWAREHRA
60 .*****.:* :*:*.**:* ***:*:***: *****.:** :*:..*.:**

....|....||....||....||....||....|
410 420 430 440 450

CHIK - NÃO DMEDEKLLGI RERTLTCCCL WAFKKQKTHT VYKRPDTQSI QKVPAEFDSF
EEEV - NÃO DLEDEKGLGV RERSLVMGCC WAFKTHKITS IYKRPQTQTI KKVPVFNFSF
MAYV - NÃO DQDEKKNMGM RERTLTCCCL WAFKTHKNHT MYKKPDTQTI VKVPSEFNFSF
WEEV - NÃO DLDDEKELGV RERTLTMGCC WAFKTQKITS IYKKPQTQTI KKVPVFNFSF
60 *****.* :*:..*.:**:* ***:*:***: ***:*:***: *.:*:*:*:* *.:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
460 470 480 490 500

CHIK - NÃO VVPSLWSSGL SIPLRTRIKW LLSKVPKTDL IPYSGDAKEA RDAEKEAEEEE
EEEV - NÃO VIPQPTS YGL DIGLRRRIKM LFDACKAPAP IITEADVAHL KGLQDEAEAV
MAYV - NÃO VIPSLWSAGL SIGIRHRIRL LLQSRRVEPL VPS-MDVGEA RAAEREAEEA
WEEV - NÃO VIPRLTSHGL DMGFRRRLKL LLEPTVKPAP AITMADVEHL RGLQQEAEV
60 .***.***** ***:*.**.:**:* ***:*:***: ***:*:***: ***:*:***: ***:*:***: ***

....|....||....||....||....||....|
510 520 530 540 550

CHIK - NÃO REAELTREAL PPLQAAQD-- DVQVEIDVEQ LEDRAGAGII ETPRGAIKVT
EEEV - NÃO AEAEAVRAAL PPLLPEVD-- KETVEADIDL IMQEAGAGSV ETPRRHIVKVT
MAYV - NÃO KEAEDTLAAL PPLIPTAPVL DDIPEVDVEE LEFRAGAGVV ETPRNALKVT
WEEV - NÃO AAAEEIREAL PPLLPEIE-- KETVEAEVDL IMQEAGAGSV ETPRGHIRVT
60 :*:***** *.:*:*:*:* ***:*:***: ***:*:***: ***:*:***: *****.*:*

....|....||....||....||....||....|
560 570 580 590 600

CHIK - NÃO AQPTDHSVGE YLVLSPQTVL RSQKLSLIHA LAEQVKTCTH SGRAGRYAVE
EEEV - NÃO TYPGEEMIGS YAVLSPQAVL NSEKLACIHP LAEQVLMTH KGRAGRYKVE
MAYV - NÃO PQDRDTMVG S YLVLSPQTVL KSVKLQALHP LAESVKIITH KGRAGRYQVD
WEEV - NÃO SYPGEEKIGS YAILSPQAVL NSEKLACIHP LAEQVLMTH KGRAGRYKVE
60 **.*:*:*:* *.:***** .***.*:*:* *.:***** *****.:**:

....|....||....||....||....||....|
610 620 630 640 650

CHIK - NÃO AYDGRILVPS GYAISPEDFQ SLSESATMVY NEREFVNRKL HHIALHGPAI
EEEV - NÃO PYHGRVIVPS GTAIPVDFQ ALSSESATIVF NEREFVNRYL HHIAVNGGAL
MAYV - NÃO AYDGRVLLPT GAAIPVDFQ ALSSESATMVY NEREFINRKL YHIAVHGAAL
WEEV - NÃO PYHGKIVPE GTAVPVDFQ ALSSESATIVF NEREFVNRYL HHIANGGAL
60 :*****:*** :*:..*:*:* *****:*** *****:*:* *****:

....|....||....||....||....||....|
660 670 680 690 700

CHIK - NÃO NTDEESYELV RAERTEHEYV YDVDQRRCK KEEAAGLVLV GDLTNPPYHE
EEEV - NÃO NTDEEYKVV KSTETDSEYV FDIDAKKCVK KG DAGPMCLV GELVDPPFHE
MAYV - NÃO NTDEEGYEV RAESTDAEYV YDVRKQCVK REEAAGLVMI GDLINPPFHE
WEEV - NÃO NTDEEYKTV KTQTDSEYV FDIDARKCVK REDAGPLCLT GDLVDPPFHE
60 ***:*:***: ***:*:***: *****:*:* ***:*.**.:**:* *.:*:*:*:*

....|....||....||....||....||....|
710 720 730 740 750

CHIK - NÃO FAYEGLRIRP ACPYKTAVIG VFGVPGSGKS AI IKNLVTRQ DLVTSKGKEN
EEEV - NÃO FAYESLKTRP AAPHKVPTIG VYGVPDGGKS GIIKSAVTKR DLVVSACKEN
MAYV - NÃO FAYEGLKRRP AAPYKTTVVG VFGVPGSGKS GIIKSLVTRG DLVASGKKN
WEEV - NÃO FAYESLKTRP AAPHKVPTIG VYGVPDGGKS GIIKSAVTKK DLVVSACKEN
 60 *.:****.:** ***** :*.:**.* ***** *****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 760 770 780 790 800
CHIK - NÃO CQEISTDVMR QRNLEISART VDSL LLNGCN RPDVDVLYVDE AFACHSGTLL
EEEV - NÃO CM EI IKDVKR MRGMDIAART VDSVLLNGVK HSDVTLYIDE AFACHAGTLL
MAYV - NÃO CQEIMLDVCR YRDLDMTAKT VDSVLLNGVK QTVDVLYVDE AFACHAGTLL
WEEV - NÃO CAEIIRDVRR MRRMDVAART VDSVLLNGVK HPVNTLYIDE AFACHAGTLL
 60 ****.:**.* ***** :*****:*** *****:*. * :.:**.***.*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 810 820 830 840 850
CHIK - NÃO ALIALVRPRQ KVVLCGDPKQ CGFFNMMQMK VNYNHNICTQ VYHKSISRRC
EEEV - NÃO ALIAIVKPK- KVVLCGDPKQ CGFFNMMCLK VHFNHICTE VYHKSISRRC
MAYV - NÃO ALIATVRPRK KVVLCGDPKQ CGFFNMLQLQ VNFNHNICTE VDHKSISRRC
WEEV - NÃO ALIAIVKPK- KVVLCGDPKQ CGFFNMMCLK VHFNHICTE VYHKSISRRC
 60 *.:**.***.* :*****.*: **.***.*:*. :**.*:***** *.:***:***:

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 860 870 880 890 900
CHIK - NÃO TLPVTAIVSS LHYEGKMRRT NEYNKPIVVD TTGSTKPDG DLVLTCFRGW
EEEV - NÃO TKTVTSIVST LFYDKRMRTV NPCNDKIID TTSTTKPLKD DIILTFCFRGW
MAYV - NÃO TLPITAIVST LHYEGKMRRT NPYNKPVID TTGQTKPNRE DIVLTFCFRGW
WEEV - NÃO TQTVTAIVST LFYDKRMRTV NPCADKIID TTGTTKPHKD DLILTFCFRGW
 60 :***:***** **.*:***** **.***.*:*. :*.:**.***.* :.:***:*****

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 910 920 930 940 950
CHIK - NÃO VKQLQIDYRG HEVMTAAASQ GLTRKGVYAV RQKVNENPLY ASTSEHVNVL
EEEV - NÃO VKQLQIDYKN HEIMTAAASQ GLTRKGVYAV RYKVNENPLY AQTSEHVNVL
MAYV - NÃO VKQLQLDYRG HEVMTAAASQ GLTRKGVYAV RMKVNENPLY AQSSEHVNVL
WEEV - NÃO VKQLQIDYKN HEIMTAAASQ GLTRKGVYAV RYKVNENPLY SQTSEHVNVL
 60 **.*:.....: :*.:***:..: :*.:**.***.* :**.***.*: :.:***:***:*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 960 970 980 990 1000
CHIK - NÃO LTRTEGKLVW KTLSGDPWIK TLQNPCKGNE KATIKEWVE HASIMAGICN
EEEV - NÃO LTRTEKRIVW KTLAGDPWIK TLTASYPGNF TATLEEWQAE HDAIMAKILE
MAYV - NÃO LTRTEGRLVW KTLSGDPWIK TLSNIPKGNF TATLEDWQRE HDTIMRAITQ
WEEV - NÃO LTRTEKRIVW KTLAGDPWIK TLTAKYPGDF TASLDDWQRE HDAIMARVLD
 60 *****: :**.*:***:* *.:**.***.*: *.:**.***.* :.:***:***.*

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 1010 1020 1030 1040 1050
CHIK - NÃO HQVTFDTFQK KANVCWAKSL VPILETAGIK LNDRQWSQII QAFKEDRAYS
EEEV - NÃO TPASSDVFQK KVNVCWAKAL EPVLATANIT LTRSQWET-I PAFKDDKAYS
MAYV - NÃO EAAPLDVFQK KAKVCWAKCL VPVLETAGIK LSATDWSAII LAFKEDRAYS
WEEV - NÃO KPQTADVDFQK KVNVCWAKAL EPVLATANIV LTRQQWET-L HPFKHDRAYS
 60 ***:.....* :*.***** **.*:.....**.* **.***.***.* :.:***:***.*

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1060      1070      1080      1090      1100
CHIK - NAO PEVALNEICT RMYGVDLDSG LFSKPLVSVH YADNHWDNRP GGKMFQFNPE
EEEV - NAO PEMALNFFCT RFFGVDIDSG LFSAPTIVPLT YTNEHWDNSP GPNMYGLCMR
MAYV - NAO PEVALNEICT KIYGVLDLDSG LFSAPRVSLH YTTNHWDNSP GGRMYGFSVE
WEEV - NAO PEMALNFFCT RFFGVDLDSG LFSAPTIVALT YRDQHWDNSP GKNMYGLNRE
60      .*:.*:***** ***.**.*:****. *:.*:*.***. ....:***** :*..*:*:*

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1110      1120      1130      1140      1150
CHIK - NAO AASILERKYP FTKGKWNNTNK QICVTTRRIE DFNPNNTNIIP ANRRLPHSLV
EEEV - NAO TAKELARRYP CILKAVDTRGR VADVRTDTIK DYNPLINVVP LNRRLPHSLV
MAYV - NAO AANRLEQQHP FYRGRWASGQ V-LVAERKTQ PIDVTCNLIP FNRRLPHTLV
WEEV - NAO VAKELSRYP CITKAVDTRGR VADIRNNTIK DYSPTINVVP LNRRLPHSLI
60      ****:.*:*: *:*.*:***** **:*.*:***. ....:***** ***.*****.

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1160      1170      1180      1190      1200
CHIK - NAO AEHRPVKGER MEWLVNKING HHVLLVSGYN LVLPTKRVTW VAPLGIRGAD
EEEV - NAO VTHRYTGNGD YSQLVTKMTG KTVLVV-GTP MNIPGKRVET LGPSP--QCT
MAYV - NAO TEYHPIKGER VEWLVNKIPG YHVLLVSEYN LILPRRKVTW IAPPTVTGAD
WEEV - NAO VDHKGQGTDD HSGFLSKMKG KSVLVI-GDP ISIPGKKVES MGPLP--TNT
60      .*:.*:***.* **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1210      1220      1230      1240      1250
CHIK - NAO YTYNLELGLP ATLGRYDLVI INIHTPFRIH HYQQCVDHAM KLQMLGGDSL
EEEV - NAO YKAELDLGIP AALGKYDIIF INVRTPYRHH HYQQCEDHAI HHSMLTRKAV
MAYV - NAO LTYDLDLGLP PNAGRYDLVF VNMHTPYRLH HYQQCVDHAM KLQMLGGDAL
WEEV - NAO IRCDLDLGIP SHVGKYDIIF VNVRTPYRNH HYQQCEDHAI HHSMLTCKAV
60      :*:*:*:*:*: *:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1260      1270      1280      1290      1300
CHIK - NAO RLLKPGGSLI IRAYGYADRT SERVVCVLGR KFRSSRALKP PCVTSNTEMF
EEEV - NAO DHLNKGTCI ALGYGTADRA TENIISAVAR SFRFSRVCQP KCAWENTEVA
MAYV - NAO YLLKPGGSLI LSTYAYADRT SEAVVTALAR RFSSFRAVTV RCVTSNTEVF
WEEV - NAO HHLNTGGTCV AIGYGLADRA TENIITAVAR SFRFTRVCQP KNTAENTEV
60      :*:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1310      1320      1330      1340      1350
CHIK - NAO FLFSNFDNGR RNFTTHVMNN QLNAAFVQQA -TRAGCAPSY RVKRMEDIAKN
EEEV - NAO FVFFGKDNGN HLQDQDRLSV VLNNIYQGST QHEAGRAPAY RVVRGDITKS
MAYV - NAO LLFTNFDNGR RTVTLHQTNQ KLSSIYAGTV LQAAGCAPAY AVKRADIATA
WEEV - NAO FVFFGKDNGN HTHDQDRLGV VLDNIYQGST RYEAGRAPAY RVIRGDISKS
60      **:*..*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1360      1370      1380      1390      1400
CHIK - NAO DEECVVNAAN PRGLPGDGVC KAVYKKWPES FKN SATPVGT AKTVMCGTYP
EEEV - NAO NDEVIVNAAN NKGQPGGGVC GALYRKWPGA FDKQPVATGK AHLVKH-SPN
MAYV - NAO IEDAVVNAAN HRGQVGDGVC RAVARKWPQA FRNAATPVGT AKTVKCDETY
WEEV - NAO ADQAIVNAAN SKGQPGSGVC GALYRKWPAA FDRQPIAVGT ARLVKH-EPL
60      **:*..*:*: *:*.*:***** **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*: **:*:*:*:*:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1410      1420      1430      1440      1450
CHIK - NAO VIHAVGPNFS NYSESEGDRE LAAAYREVAK EVTRLGVNSV AIPLLSTGVY
EEEV - NAO VIHAVGPNFS RLSENEGQDK LSEVYMDIAR IINNERFTKV SIPLLSTGIY
MAYV - NAO IIHAVGPNFN NTSEAEGRD LAAAYRAVAE EINRLSISSV AIPLLSTGIF
WEEV - NAO IIHAVGPNFS KMPEPEGDLK LAAAYMSIAS IVNAERITKI SVPLLSTGIY
60      .:***:*** *****:* ***** ***** ***** ***** **:*:**:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1460      1470      1480      1490      1500
CHIK - NAO SGGKDRLTQS LNHLFTALDS TDADVVIYCR DKEWEKKIAE AIQMRTQVE-
EEEV - NAO AGGKDRVMQS LNHLFTAMDT TDADITIYCL DKQWESRIKE AITRKESVEE
MAYV - NAO SAGKDRVHQ S LSHLLAAMDT TEARVTIYCR DKTWEQIKT VLQNRSATE-
WEEV - NAO SGGKDRVMQS LHHLFTAFDT TDADVTIYCL DKQWETRIIE AIHRKESVEI
60      **:***:*** *:*:**:*** ***** **:*:**:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1510      1520      1530      1540      1550
CHIK - NAO LLDEHISVDC DIIRVHPDSS LAGRKGYSTT EGSLYSYLEG TRFHQTAVDM
EEEV - NAO LTEDDRPVDI ELVRVHPLSS LAGRPGYSTT EGKVYSYLEG TRFHQTAKDI
MAYV - NAO LVDELQFEV NLTRVHPDSS LVGRPGYSTT DGTLYSYMEG TRFHQAALDM
WEEV - NAO -LDDDKPVDI DLVRVHPNSS LAGRPGYSVN EGKLYSYLEG TRFHQTAKDI
60      *:***:*** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1560      1570      1580      1590      1600
CHIK - NAO AEVYTMWPKQ TEANEQVCLY ALGESIESIR QKCPVDDADA SSPPKTVPCL
EEEV - NAO AEIYAMWPNK QEANEQICLY VLGESMNSIR SKCPVEESEA SSPPHTIPCL
MAYV - NAO AEITTLWPRV QDANEHICLY ALGETMDNIR ARCPVEDSDS STPPKTVPCL
WEEV - NAO AEIHAMWPNK SEANEQICLY ILGESMSSIR SKCPVEESEA SAPPHTLPCL
60      ***** :***** *****:**: ***** *****:**:

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1610      1620      1630      1640      1650
CHIK - NAO CRYAMTPERV TRLRMNHVTS IIVCSSFPLP KYKIEGVQKV KCSKVMLFDH
EEEV - NAO CNYAMTAERV YRLRMAKNETQ FAVCSSFQLP KYRITGVQKI QCSKPVIFSG
MAYV - NAO CRYAMTPERV TRLRMHHTKD FVVCSSFQLP KYRIPGVQVR KCEKVMLFDA
WEEV - NAO CNYAMTAERV YRLRSAKKEQ FAVCSSFLLP KYRITGVQKL QCSKPVLFSG
60      :.***:*** **:*:**:*** ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1660      1670      1680      1690      1700
CHIK - NAO NVPSRVSPRE YKSPQETAQE VSSTTSLTHS -----
EEEV - NAO TVPPAIHPRK FASVTVEDTP VVQPERLVPR RPAPPVPVPA RIPSPCTST
MAYV - NAO APPASVPVQ YLTNQSETTI -----SLS -----
WEEV - NAO VVPPAVHPRK YAEIILETPP PPATTTVICE -----PTVPE RIPSPVISRA
60      *:*:**:*** *****:**: ***** ***** *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1710      1720      1730      1740      1750
CHIK - NAO -----QFDL SVDGE----- -ELPAPSDLE ADAPIPEPTP -DDRAVLTLP
EEEV - NAO NGSTTSIQSL GEDQS----- ----- ASASSGAEIS VDQVSLWSIP
MAYV - NAO -----SFSI TSDSS----- -SLSTFPDLE SAEELDHDSQ -SVRPALNEP

```

WEEV - NÃO P-SAESLLSL GGVSFSSSAT RSSTAWSYD RRFVVTADVH QANTSTWSIP
60 ****:***** **::*:** *:***** *****.* ** *****.

....|....||....||....||....||....|
1760 1770 1780 1790 1800

CHIK - NÃO P--TIDN--- ----- FSAVSDWVMN T AP
EEEV - NÃO SATGFDVRTS SLSLEQPTF PTMVVEAEIH ASQGLWSIP SITGSETRAP
MAYV - NÃO -----ÐÐ ----- HQPTPTAELA T-----HP
WEEV - NÃO SAPGLDVQLP SD----- -VTDSHWSIP SASGFVTRP
60 :*.**:.**:* :***.::::: :*.**.*.:. **:***.....

....|....||....||....||....||....|
1810 1820 1830 1840 1850

CHIK - NÃO VAPRRRRRGK NLNVTCDERE GNVLPMA SVR F----FRADL HSIVQETA EI
EEEV - NÃO SPSPQDSRPS TPSASGSHAS VDLITFDSVA EILED FSRSP FQFLSEIKPI
MAYV - NÃO VPPPRPNRAR RLAAARVQVQ VEVHQP----- PSNQPTKPI
WEEV - NÃO SVQDLTA--- ----- -ECAKPRGLA EIMQDFNTAP FQFLSDYRPV
60

....|....||....||....||....||....|
1860 1870 1880 1890 1900

CHIK - NÃO RD TAA---SL QAPLSV---- -ATEPNQLPI SFGAPNETFP ITFGDFDEGE
EEEV - NÃO PAPRTRVN-- NMSRSADTIK PIPKPRKCQV KYTQ-----
MAYV - NÃO PAPRTSLRPV PAPRRY---- -VPRP---VV ELWPLETID VEFGAPTEE-
WEEV - NÃO PAPRRRPI-- PSPRSTASAP PVPKPRR--T KYQQ-----
60

....|....||....||....||....||....|
1910 1920 1930 1940 1950

CHIK - NÃO IESLSSELLT FGDFSPGEVD DLTDSDWSTC SDTDELXLD RAGGYIFS SD
EEEV - NÃO ----- PPGVAR AISAAEFDEF VR-RHSNXRY EAGAYIFS SE
MAYV - NÃO -----ESDIT FGDFSA---- ----SEWETI S---NSSXLG RAGAYIFS SD
WEEV - NÃO ----- PPGVAR AISEAELDEY IR-QHSNXRY EAGAYIFS SE
60

....|....||....||....||....||....|
1960 1970 1980 1990 2000

CHIK - NÃO TGPGLHQORS VRQTVLPVNT LEEVQEEKCY PPKLDEVKEQ LLLKKLQESA
EEEV - NÃO TQGGHLQOKS TRQCKLQYPI LERSVHEK FY APRLDLEREK LLQKKLQ LCA
MAYV - NÃO VGPGLHQOKS VRQHDLEVPI MDRVIEEKVY PPKLDEAKEK QLLLKLQ MHA
WEEV - NÃO TQGGHLQOKS VRQCKLQEP I LDRAVHEKYY APRLDLEREK MLQKKLQ LCA
60

....|....||....||....||....||....|
2010 2020 2030 2040 2050

CHIK - NÃO SMANRSRYQS RKVENMKATI VQRLKGGCKL YLMSETPKVP TYRTTYPAPV
EEEV - NÃO SEGNR SRYQS RKVENMKAIT VERLLQGIGS YLSAEPQVPE CYKVTPAPM
MAYV - NÃO TDANRSRYQS RKVENMKATI IDRLKQGSAY YVSAADKAV TYHVRYAKPR
WEEV - NÃO SEGNR SRYQS RKVENMKAIT AERLISGLGT YLSSEVNPVE CYRVNYPVPI
60

....|....||....||....||....||....|
2060 2070 2080 2090 2100

CHIK - NÃO YSPPINIRLS NPESAVAACN EFLARNYPTV ASYQITDEYD AYLD MVDGSE


```

                2410          2420          2430          2440          2450
CHIK - NÃO  RSACAAFIGD DNIHGVVSD ELMAARCATW MNMEVKIIDA VVSQKAPYFC
EEEV - NÃO  TSPCAAFIGD DNIVKGVVSD ALMAERCATW LNMEVKIIDA VVGKAPYFC
MAYV - NÃO  NSACAAFIGD DNVVHGVVSD KLMAIDRCATW VNMEVKIIDA VMCIKPPYFC
WEEV - NÃO  TSACAASIGD DNIVHGVVSD TLMAERCATW LNMEVKIIDA VIGIKAPYFC
60

```

```

                2460          2470          2480          2490          2500
CHIK - NÃO  GGFILYDTVA GTACRVADPL KRLFKLGKPL AAGDEQDDDR RRALADEVVR
EEEV - NÃO  GGFIVVDQIT GTACRVADPL KRLFKLGKPL PLDDDQDVDR RRALHDEAAR
MAYV - NÃO  GGFLVYDHVT RTACRIADPL KRLFKLGKPL PADDCQEDR RRALYDEVKK
WEEV - NÃO  GGFILVDQIT GTACRVADPL KRLFKLGKPL PVDDTQDCDR RRALHDEAMR
60

```

```

                2510          2520          2530          2540          2550
CHIK - NÃO  WQRTGLTDEL EKAVHSRYEV QGISVVVMSM ATFASSRNF EKLRGPVVTI
EEEV - NÃO  WNRIGITEEL VKAVESRYEV NYVSLIITAL TCLASSVSNF KHIRGHPITL
MAYV - NÃO  WSRSLGSEI EVALASRYRL EGSYNLLAM STFAHSMKNF SALRGPVIHL
WEEV - NÃO  WNRIGITDEL VKAVESRYEI ILAGLIITSL STLAESVKNF KSIRGSPITL
60

```

```

        ....|
CHIK - NÃO  YGGPK
EEEV - NÃO  YG---
MAYV - NÃO  YGGPK
WEEV - NÃO  YG---
60

```

Alignment: CHIKV X ALPHAVIRUS ESTRUTURAL

```

                10          20          30          40          50
CHIK EST  -----MEFI PTQTFYNRRY QP-----RP-W APRPTIQVIR PRPRPQRQAG
EEEV EST  MFPYPTLNYP PMAPINPMAY RDPNPPRQ-V APFRP-----PLAA
MAYV EST  -----MDFL PTQVFYGRRW RPRMPPRP-W RPRMP-----TMQRPDQQR
WEEV EST  MFPYPQLNFP PVYPTNPMAY RDPNPPRCRW RPFPR-----PLAA
49
::*:::**** ::*::*::: ::**.....: *****:*:* **:*::*:*

```

```

                60          70          80          90          100
CHIK EST  QLAQLISAVN KLTMRVAVPQQ KPRNRKKNK QRQKKQAPQ- NDPK-QKKQP
EEEV EST  QIEDLRRSIA NLTQKQAPN PPAGPP---- AKRKKPAPSL SLETKKRP
MAYV EST  QMQQLIAAVS TLALRQNAAP PQRGKKKQ-P -RRKKPKPQP EKPK-QEQK
WEEV EST  QIEDLRRSIA NLTQKQSPN PPPGPP---- PKKKKSAPKP KPTQ-PKPKK
49
*****:*:* :***** :**:*:* **.*:*:*:*

```

```

                110          120          130          140          150
CHIK EST  PQKKPAQKK KPGRRERMCM KIENDCIFEV KHEGKVMGYA CLVGDKVMKP
EEEV EST  PPAKKQKRKP KPGKRQRMCM KLESDKTFPI MLNGQVNGYA CVVGGRVFKP
MAYV EST  P-QQKKAPKR KPGRRERMCM KIEHDCIFEV KHEGKVTGYA CLVGDKVMKP
WEEV EST  QQAKKTKRKP KPGKRQRMCM KLESDKTFPI MLNGQVNGYA CVVGGRLMKP

```

49

:**. .***:*.** *****:**: *****.* **:*****

....|....||....||....||....||....|
160 170 180 190 200

CHIK EST AHVKGTTIDNA DLAKLAFKRS SKYDLECAQI PVHMKSDASK FTHEKPEGYY
EEEEV EST LHVEGRIDNE QLAAIKLKKA SIYDLEYGDV PQCMKSDTLQ YTSKPPGFY
MAYV EST AHVPGVIDNA DLARLSYKKS SKYDLECAQI PVAMKSDASK YTHEKPEGHY
WEEV EST LHVEGKIDNE QLAAVKLKKA SMYDLEYGDV PQNMKSDTLQ YTSKPPGFY
49 ***:***** *:***:**: *:**:***. *:**:** **:**:***..

....|....||....||....||....||....|
210 220 230 240 250

CHIK EST NWHHGAVQYS GGRFTIPTGA GKPGDSGRPI FDNKGRVVAI VLGGANEGAR
EEEEV EST NWHHGAVQYE NNRFTVPRGV GGKGDSDGRPI LDNKGRVVAI VQGGVNEGSR
MAYV EST NWHYGAVQYT GGRFTVPTGV GKPGDSGRPI FDNKGPVVAI VLGGANEGTR
WEEV EST NWHHGAVQYE NGRFTVPRGV GGKGDSDGRPI LDNRGRVVAI VLGGANEGTR
49 **:***:**. ***:**:*** :***:**... *:**:*** *:**:***:

....|....||....||....||....||....|
260 270 280 290 300

CHIK EST TALS SVVTWNK DIV-TKITPE GAEWWSLA-L PVLCLLANTT FPCSQPPCTP
EEEEV EST TALS SVVTWNQ KGVTVKDTPE GSEPWSLA-- TVMCLLANIT FPCDQPPCMP
MAYV EST TALS SVVTWNK DMV-TKITPE GTVEWAASTV TAMCLLTNIS FPCFQPSCAP
WEEV EST TALS SVVTWNQ KGVTIKDTPE GSEPWSLV-- TALCVLSNVT FPCDKPP---
49 ***:**:***.**:** *:**:***. **:***:**: *:**:***..*

....|....||....||....||....||....|
310 320 330 340 350

CHIK EST CCYEKEPEST LRMLEDNVMR PGGYQLLKAS LTCSP-HRQR RSTKDNFNVY
EEEEV EST CCYEKNPHET LTMLEQNYDS RAYDQLLDAA VKCNA-RRTR RDLDTHTFTQY
MAYV EST CCYKGPPEPT LRMLEENVNS EGYDILLHAA VYCRNSSRSK RSTANHFNAY
WEEV EST VCYS LAPERT LDVLEENVDN PNYDTLLENV LKCP S-RRPK RSITDD F
49 *:**:***. **:**:*** *:**:***. *:**:***. *:**:***. *:**:***:

....|....||....||....||....||....|
360 370 380 390 400

CHIK EST KATRPYLAHC PDCGEGHSCH SPIALERIRN EATDGLTKIQ VSLQIGIKTD
EEEEV EST KLARPYIADC PNCGHS-RCD SPIAIEEV RG DAHAGVIRIQ TSAMFGLKRH
MAYV EST KLTRPYVAYC ADCGMGHSCH SPAMIENIQA DATDGLTKIQ FASQIGLTKT
WEEV EST TLTSPYLGFC PYCRHSAPCF SPIKIENVWD ESDDGSIRIQ VSAQFGYNQA
49 **:***:**. **:**:*** *:**:***. **:***:**: *:**:*** *:**:***:

....|....||....||....||....||....|
410 420 430 440 450

CHIK EST DSHDWTCLRY M---DSHTPA DAERAGLLVR TSAPCTITGT MGHFILARCP
EEEEV EST GV----DLAY MSFMNGKTQK SIKIDNLHVR TSAPCSLVSH HGYYILAQCP
MAYV EST DTHDHTKIRY A---EGHDIA EAARSTLKVH SSSECTVTGT MGHFILAKCP
WEEV EST GTADVTKFRY MSFDHDDHIK EDSMDKIAIS TSGPCRRLGH KGYFLLAQCP
49 ***:**:*** *:**:*** *:**:***. *:**:***. *:**:***. *:**:***:

....|....||....||....||....||....|
460 470 480 490 500

CHIK EST KGETLTVGFT DSRKISHTCT HPPHHEPPVI GRERFHSRPQ HGKELPCSTY
EEEEV EST PGDTVTVGFH DGNP-RHTCR LAHKVEFRPV GREKYRHPPE HGVELPCNRY

```

MAYV EST   PGERISVSFV DSKNEHRTCR IAYHHEQRLI GRERFTVRPH HGIELPCTTY
WEEV EST   PGDSVTVSIT SGAS-ENSCT VEKKIRKRFV GREEYLFPPV HGKLVKCHVY
49         *:***:***: .:***:***: *****: :*:***:*** *****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510      520      530      540      550
CHIK EST   VQSTAATAEE IEVHMPPDTP DRTLMTQQSG NVKITV-NGQ TVRYKCNCGG
EEEV EST   THKRADQGHY VEMHQPLVG DHSLLSIHSA KVKITVPSGA QVKYCKCPD
MAYV EST   QLTTAETSEE IDMHMPPDIP DRTILSQQSG NVKITV-NGR TVRYSSSCGS
WEEV EST   DHLKETSAGY ITMHRPGPHA YKSYLEEASG EVYIKPPSGK NVTYECKCGD
49         *:****:*** :**:*:*** :**:*:*** :*...*** *...***:***

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      560      570      580      590      600
CHIK EST   SNEGLTTTDDK VINNCK-IDQ CHAAVTNHKN WQYNSPLVPR NAELGDRKGG
EEEV EST   VREGITSSD- HTTCTDVKQ CRAYLIDNKK WVYNSGRLPR GEG-DTFKGG
MAYV EST   QAVGTTTTDDK TINSCT-VDK CQAYVTSHTK WQFNSPFVPR RMQ-AERKGG
WEEV EST   YSTGIVSTRT KMNCGTKAKQ CIAYKSDQTK WVFNSPDLIR HTD-HSVQGG
49         ***:***:*** :*~*~*~*~* :*~*~*~*~* :*~*~*~*~* :*~*~*~*~*

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      610      620      630      640      650
CHIK EST   IHIPFPLANV TCRVPKARNP TVTYGKNQVT MLLYPDHPTL LSYRNMGQEP
EEEV EST   LHVPFVPVKA KCIATLAPEP LVEHKHRTLI LHLHPDHPTL LTTRSLGSDA
MAYV EST   VHIPFPLINT TCRVPLAPEA LVRSKGREAT LSLHPIHPTL LSYRTFGAER
WEEV EST   LHIPFRLTPT VCPVPLAHTP TVTKWFKGIT LHLTATRPTL LTTRKLGSLA
49         .*:*****: *~*~*~*~* :*~*~*~*~* :*~*~*~*~* :*~*~*~*~*

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      660      670      680      690      700
CHIK EST   NYHEEWVTHK KEVTLTVPTE GLEVTWGNNE PYKYWPQMSY NGTAHGHPHE
EEEV EST   NPTRQWIERP TTVNFTVTGE GLEYTWGNHP PKRVWAQESG EGNPHGWPHV
MAYV EST   VFDEQWITAQ TEVTIPVPE GVEYQWGNHK PQRVVALTTE EGKAHGWPHE
WEEV EST   DATAEWITGT TSRNFSVGRE GLEYVWGNHE PVRVWAQESA PGDPHGWPHE
49         .....:***: *~*~*~*~* *****:~*~*~*~* *~*~*~*~* :*~*~*~*~*

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      710      720      730      740      750
CHIK EST   IILYYYELYP TMTVVIIVSVA SFVLLSMVGT AVGMVCVARR RCITPYELTP
EEEV EST   VVVYYYNRYP LTTIIGLCTC VAIIMVSCDH PCGSFSGLRN LCITPYKLAP
MAYV EST   IIEYYYGLHP TTTIVVIRV SVVLLSFAA SVYMCVVART KCLTPYALTP
WEEV EST   IIIHYYHRHP VYTVIVLCGV ALAILVGTAS SAACIAKARR DCLTPYALAP
49         .....

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      760      770      780      790      800
CHIK EST   GATVPFLLSL LCCVRTTKAA TYEAAAYLW NEQQPLFWLQ ALIPLAALIV
EEEV EST   NAQVPILLAL LCCIKPTRAD DTLQVLNVLW NNNQNFFWMQ TLIPLAALIV
MAYV EST   GAVVPVTIGV LCCAPKAHAA SFAEGMAYLW DNNQSMFWME LTGPLALLIL
WEEV EST   NATVPTALAV LCCIRPTNAE TFGETLNHLW FNNQPFLWAQ LCIPLAALVI
49         .....

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      810      820      830      840      850

```

```

CHIK EST   LCNCLKLLPC CCKTLAFLAV MSIGAHTVSA YEHVTVIPNT VGVVPYKTLVN
EEEV EST   CMRMLAALFC CGP--AFLLV ---CGAWAAA YEHTAVMPNK VGIPYKALVE
MAYV EST   ATCCARSLLS CCKG-SFLVA MSIGSAVASA YEHTAIIPNQ VGFPYKAHVA
WEEV EST   LFRC---FSC CMP---FLLV AGVCLGKVDA FEHATTVPNV PGIPYKALVE
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          860          870          880          890          900
CHIK EST   RPYGSPMVLE MELQSVTLEP TSLDYITCE YKTVIPSPYV KCCGTAECKD
EEEV EST   RPGYAPVHLQ IQLVNTRIIP STNLEYITCK YKTKVPSPVV KCCGATQCTS
MAYV EST   REGYSPLTLQ MQVIETSLEP TLNLEYITCD YKTKVPSPVV KCCGTAECRT
WEEV EST   RAGYAPLNLE ITVVSSELTP STNKEYVTCR FHTVIPSPQV KCCGSLECKA
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          910          920          930          940          950
CHIK EST   KSLPDYSCKV FTGVYPFMWG GAYCFDAEN TQLSEAHVEK SESCKTEFAS
EEEV EST   KPHPDYQCQV FTGVYPFMWG GAYCFCDTEN TQMSEAYVER SEECSIDHAK
MAYV EST   QDKPEYKCAV FTGVYPFMWG GAYCFCDSEN TQMSEAYVER ADVCKHDHAA
WEEV EST   SSKADYTCRV FGGVYPFMWG GAQCFCDSEN TQLSEAYVEF APDCTIDHAV
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          960          970          980          990          1000
CHIK EST   AYRAHTASAS AKLRVLYQGN NI-TVAAYAN GDHAVTVKDA KFVVGPMSSA
EEEV EST   AYKVHTGTVQ AMVNITYGSV TWRADVYVN GETPAKIGDA KLIIGPLSSA
MAYV EST   AYRAHTASLR AKIKVTYGTV NQ-TVEAYVN GDHAVTIAGT KFIFGPVSTP
WEEV EST   ALKVHTAALK VGLRIVYGNT TA-HLDTFVN GVTPGSSRD LKVIAGPISAA
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1010         1020         1030         1040         1050
CHIK EST   WTPFDNKIVV YKGDVYNMDY PPFAGRPGQ FGDIQSRTPE SKDVYANTQL
EEEV EST   WSPFDNKVVV YGHEVYNYDF PEYGTGKAGS FGDLQSRTST SNDLYANTNL
MAYV EST   WTPFDTKILV YKGELYNQDF PRYGAGQPGR FGDIQSRTLD SRDLYANTGL
WEEV EST   FSPFDHKVVI RKGLVYNYDF PEYGAMKPGA FGDIQASSLD ATDIVARTDI
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1060         1070         1080         1090         1100
CHIK EST   VLQRPAAGTV HVPYSQAPSG FKYWLKERGA SLQHTAPFGC QIATNPVRAV
EEEV EST   KLQRPAAGIV HTPFTQAPSG FERWKRDKGA PLNDVAPFGC SIALEPLRPE
MAYV EST   KLARPAAGNI HVPYTQTPSG FKTWQKDRDS PLNAKAPFGC IIQTNPVRAM
WEEV EST   RLLKPSVKNI HVPYTQAVSG YEMWKNNSGR PLQETAPFGC KIEVEPLRAS
49
.....

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          1110         1120         1130         1140         1150
CHIK EST   NCAVGNIPIS IDIPDAAFTR VVDAPSVTDM SCEVPACTHS SDFGGVAIIK
EEEV EST   NCAVGSIPIS IDIPDAAFTR ISETPTVSDL ECKITECTYA SDFGGIATLP
MAYV EST   NCAVGNIPVS MDIADSAFTR LTDAPVISEL TCTVSTCTHS SDFGGIAVLS
WEEV EST   NCAVGHIPIS IDIPDAAFVR SSESPTILEV SCTVADCIYS ADFGGSLTLQ
49
.....

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1160          1170          1180          1190          1200
CHIK EST  YTASKKKGKCA VHSMTNAVTI READVEVEGN SQLQISFSTA LASAEFRVQV
EEEV EST  TNPVKQETVQ FIVHQVLQLL KRMTSPLLRA GSFTFFHFSTA NIHPAFKLQV
MAYV EST  YKVEKSGRCD IHSHSNVAVL QEVSIETEGR SV--IHFSTA SASPSFVVSV
WEEV EST  YKADREGHCP VSHSSTAVL KEATTHVTAV GSITLHFSTS SPQANFIVSL
49
      .....

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1210          1220          1230          1240          1250
CHIK EST  CSTQVHCAAA CHPPKDHIVN YPASHTTLGV QDISTTAMSW VQKITGGVGL
EEEV EST  CTSGITCKGD CKPPKDHIVD YPAQHTESFT SAISATAWSW LKVLVGGTSA
MAYV EST  CSSRATCTAK CEPPKDHVVT YPANHNGVTL PDLSSSTAMTW AQHLAGGVGL
WEEV EST  CGKKTTCNAE CKPPADHIIG EPHKVDQEFQ AAVSKTSWNW LLALFGGASS
49
      .....

```

```

      ....|....| ....|....| .
                1260          1270
CHIK EST  IVAVAALILI VVLCVS-FSR H
EEEV EST  FIVLGLIATA VVALVLFHR H
MAYV EST  LIALAVLILV IVTCVT-LRR -
WEEV EST  LIVVGLIVLV CSSMLINTRR -
49
      .....

```