

FILOGEOGRAFIA DO VÍRUS MAYARO (MAYV)



<https://doi.org/10.22533/at.ed.883182624113>

Data de aceite: 26/11/2024

Thiago Vitor Lemes

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde – ICS, Curso de Biomedicina

Natalia Ichii Paim Costa

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde – ICS, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde (PPGCAS)

Marcos Lázaro Moreli

Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde – ICS, Curso de Biomedicina
Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências da Saúde – ICS, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde (PPGCAS)

desses vírus, assim como ser fonte de dados epidemiológicos e monitoração no ambiente. Sendo assim, o presente estudo buscou elucidar a filogeografia do Vírus Mayaro por meio da análise bayesiana, com auxílio do *software* BEAST®. As sequências de diferentes cepas do Vírus Mayaro (MAYV) são depositadas em bancos de dados, e de acordo com seus aspectos evolutivos, outras cepas passaram a ser identificadas apresentando diferenças genômicas relevantes para a compreensão da manutenção e sobrevivência no ambiente tropical. A recuperação dessas sequências foi obtida por meio do VIPR e confirmadas no banco de dados do GENBANK. A análise molecular e distribuição do MAYV foram realizadas com auxílio de *softwares* de biotecnologia, além do BEAST®, utilizou-se o MEGA® para o alinhamento e montagem do modelo filogeográfico, e o FastTree® para edição da árvore. A filogeografia determinada apontou a variabilidade de distribuição da Febre do Mayaro em seis países diferentes na América Central e, principalmente, América do Sul. A árvore filogeográfica corroborou com outras metodologias presentes na literatura em relação a predominância do genótipo D, e poucas sequências do genótipo L, no

RESUMO: O vírus do Mayaro é um arbovírus negligenciado no Brasil e em diferentes regiões do continente americano. Desde sua identificação inicial no Caribe, este vírus apresenta um significativo potencial de dispersão geográfica de forma silenciosa, assim como diversos agentes patogênicos responsáveis por surtos esporádicos inoportunos. As análises filogeográficas são importantes para avaliar a distribuição

entanto, nosso modelo não identificou o genótipo N, dentre as selecionadas. Por fim, foi possível pressupor a rota de dispersão do Mayaro no continente analisando a semelhança filogenética. Além disso, com o múltiplo alinhamento observou-se alterações pontuais em pares de bases de sequências semelhantes, ao longo da evolução do vírus.

PALAVRAS-CHAVES: Vírus Mayaro; filogeografia; distribuição.

INTRODUÇÃO

O vírus Mayaro, conhecido por MAYV, é considerado um arbovírus, assim como o vírus da dengue (DENV) e o vírus da chikungunha (CHIKV). O MAYV corresponde ao gênero *Alphavirus* e compõe o grupo de algumas doenças de relevância sanitária negligenciadas (ESPOSITO *et al.*, 2017). Certos *Alphavirus* formam o Complexo Semliki, este inclui uma série de vírus responsáveis por doenças clinicamente idênticas, como por exemplo, o CHIKV e o MAYV, patógenos que promovem viroses de sintomatologia parecida e que podem estar em co-circulação (MUÑOZ *et al.*, 2012).

O vírus foi isolado pela primeira vez no ano de 1954, na América Central. Os primeiros relatos ocorreram no Mar do Caribe, onde pesquisadores isolaram este de cinco trabalhadores de Trinidad e Tobago, um país insular. Os infectados desenvolviam atividades no setor rural, e apresentaram, inicialmente, sintomas semelhantes, condicionando a classificação de doença febril. Posteriormente, o vírus foi descrito em outras regiões do continente, voltado a locais com predominância de florestas tropicais, como o Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

A Febre do Mayaro é considerada emergente na América do Sul, surtos pontuais na bacia Amazônica e em outras regiões servem como alerta para possíveis distúrbios voltados a epidemias futuras (VASCONCELOS *et al.*, 2017). Diversos fatores contribuíram para a dispersão do vírus em relação ao seu ambiente natural, dentre eles a proximidade das residências a focos de infecção é um relevante aspecto (FORSHEY *et al.*, 2010).

O MAYV possui uma simples fita de RNA com polaridade positiva, e em geral não ultrapassa 11,5 quilobases (kb) de comprimento. Sua sequência é formada por duas porções de leitura aberta. Após a tradução da fita, cinco complexos proteicos (C-E3-E2-6k-E1) são formados a partir da transcrição do RNA subgenômico sintetizado via sentido negativo da fita, já a sequência genômica promove a formação de uma poliproteína, que será clivada em quatro peptídeos não estruturais (nsP1-4). Até o momento as cepas identificadas em diferentes regiões do continente foram classificadas em D, L e N. O genótipo D é mais amplo e representa as cepas da América do Sul e Caribe, o genótipo L até então é restrito ao Brasil, e o genótipo N identificado apenas no Peru (POWERS *et al.*, 2006; AUGUSTE *et al.*, 2010).

A interação do envelope viral com receptores celulares de alguns *Alphavirus* ainda não foi totalmente compreendida, os fatores que condicionam a entrada do vírus na célula do hospedeiro é foco de pesquisas e de uma caracterização específica, como ocorre com o MAYV (VANCINI *et al.*, 2015).

O ciclo de transmissão é semelhante ao de outros do complexo Simliki, a propagação ocorre por meio de vetores artrópodes do gênero *Haemagogus*, e de alguns animais reservatórios, como primatas não humanos e roedores. Ademais, estudos apontam que o vírus pode ser competente a ponto de se estabelecer em diversos mosquitos, como os *Aedes* sp., o que aumentaria o potencial de epidemias, como ocorre com a dengue (LONG *et al.*, 2011; CARRERA *et al.*, 2018).

Na clínica médica, as infecções agudas apresentam como sintomas iniciais febre e cefaléia, algumas pessoas contaminadas também podem apresentar mialgia, artralgia, calafrios e erupções cutâneas. Os sintomas relatados não possuem especificidade, dessa forma, existe uma preocupação quanto a um diagnóstico correto, devido a semelhança com outras doenças virais (HALSEY *et al.*, 2013).

Apesar do alto potencial patogênico, o estudo sobre o vírus é limitado, e tal fator está relacionado ao baixo índice de mortalidade e a falta de precisão no diagnóstico clínico. A distribuição geográfica do MAYV cresce quando comparada aos descritos iniciais, principalmente em regiões tropicais da América Latina. O tratamento da patogenia converge com o de outras doenças causadas por *Alphavirus*, é necessária uma avaliação dos sintomas durante a evolução, além da utilização de analgésicos. Ademais, a profilaxia consiste em evitar o contato direto com vetores, e zonas de risco (TESH *et al.*, 1999; CHOI *et al.*, 2019). A produção de imunógenos eficientes seria de grande relevância para inibir a dispersão do vírus. Atualmente, existem modelos de ensaio que passam por testes, ainda não aprovados para comercialização (WEISE *et al.*, 2014).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Estrutura e genoma da partícula viral

O vírus do Mayaro é um arbovírus e pertence ao gênero *Alphavirus*. O MAYV está incluso na família Togaviridae e seus aspectos filogenéticos o fazem membro do complexo antigênico da floresta Semliki, um grupo de vírus com características próximas em relação a sítios antigênicos virais. O complexo Semliki é formado por vírus semelhantes, dentre eles o Chikungunya (CHIKV), Semliki Forest e Una. Estes agentes provocam doenças de sintomatologia próxima, além de expressarem reatividade cruzada entre as espécies na resposta sorológica convencional (ESPOSITO *et al.*, 2017).

Estruturalmente, o MAYV é próximo a maioria dos *Alphavirus*. A partícula viral desses apresenta uma geometria icosaédrica muito específica, sendo relativamente pequena, com diâmetro aproximado de 70 nm, representada na figura 1 (MUKHOPADHYAY *et al.* 2006). Externamente, a partícula madura apresenta um trímero protéico formado pelas proteínas E1 e E2, além de inúmeras subunidades da proteína C que formam o capsídeo na porção interior do vírus (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2011).

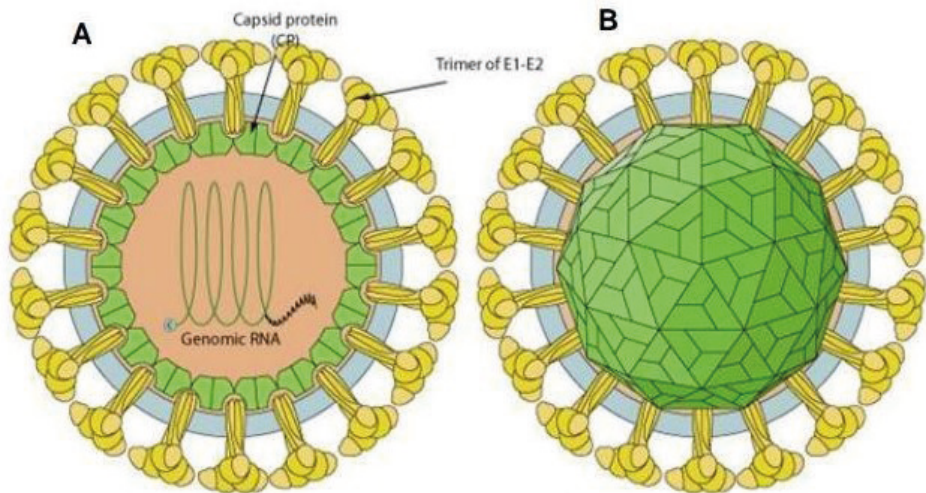


Figura 1-Estrutura da partícula viral

Fonte: *Swiss Institute of Bioinformatics*, 2017.

A filogenia do vírus do Mayaro não apresenta tantas variações ao longo dos anos, primeiramente foram isoladas duas sequências que estão agrupadas em genótipo L, encontrado no Brasil, e genótipo D, distribuído em alguns países de clima tropical (MUÑOZ *et al.*, 2012). Além dos genótipos descritos foi descoberto de forma isolada no Peru outra variação com características intermediárias quanto aos genótipos L e D, classificado como genótipo N (AUGUSTE *et al.*, 2010).

O material genético do vírus codifica proteínas essenciais a sua manutenção, sobrevivência e conexão com seus hospedeiros. O MAYV possui uma simples fita de RNA de polaridade positiva, essa possibilita a formação de complexos protéicos envolvidos na estrutura da partícula viral, além de formar algumas proteínas sem atividade estrutural (Figura 2). A porção 5' promove a codificação de uma glicoproteína não estrutural, e após sua clivagem são formados os peptídeos nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. A formação destes peptídeos é de relevância para eventos associados a transcrição e replicação do material genético do vírus após sua entrada na célula alvo (PAUL *et al.*, 2013). As proteínas estruturais são formadas a partir da extremidade 3', esta codifica para a produção das estruturas E1, E2, importantes pela interação do vírus e ligação com os receptores nas células, o capsídeo (C), além das proteínas E3, 6k e TF, que atuam na relação com a membrana celular após a entrada viral (STRAUSS *et al.*, 1994).

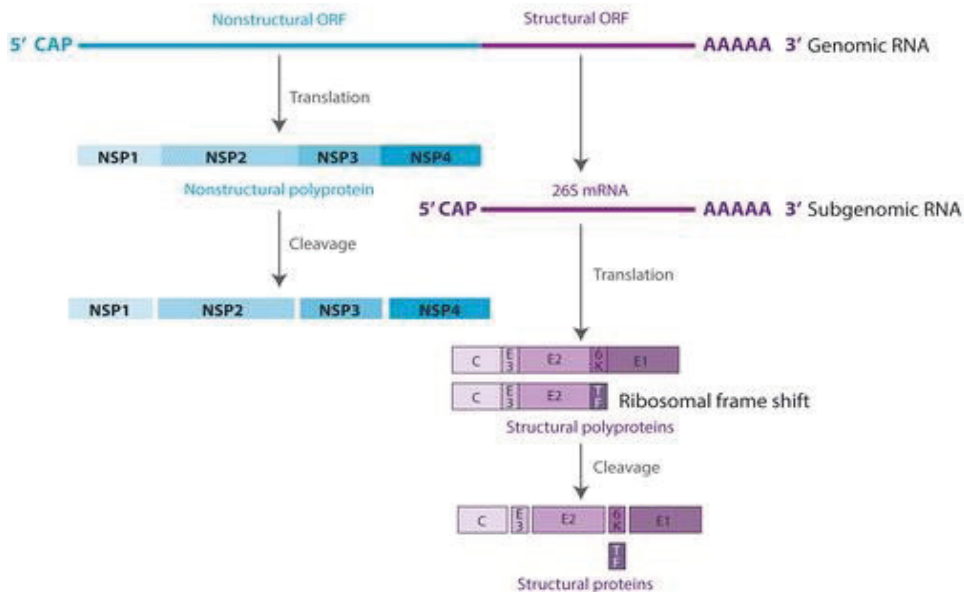


Figura 2-Material genético dos *Alphavirus*

Fonte: Acosta-Ampudia *et al.*, 2018.

Ciclo de Transmissão

A transmissão da Febre do Mayaro é semelhante a de outras viroses por *Alphavirus*. Esta ocorre por meio do repasto sanguíneo e envolve a participação de mosquitos silvestres, sendo os principais vetores os *Haemagogus* pertencentes a família Culicidae (SILVA *et al.*, 2017). A transmissão envolve inicialmente o ambiente silvestre, devido a quantidade de animais reservatórios para o vírus, e o *Haemagogus Janthinomys* considerado o principal vetor para o MAYV (TALARMIN *et al.*, 1998). Conforme a Figura 3, o ciclo de transmissão do vírus é do tipo enzoótico, e segue duas vias: no ciclo selvático o vetor transmite à diversos primatas não humanos que servem como reservatórios, e no ciclo urbano o vetor infecta humanos de forma direta, provocando a doença (SOUZA *et al.*, 2019).

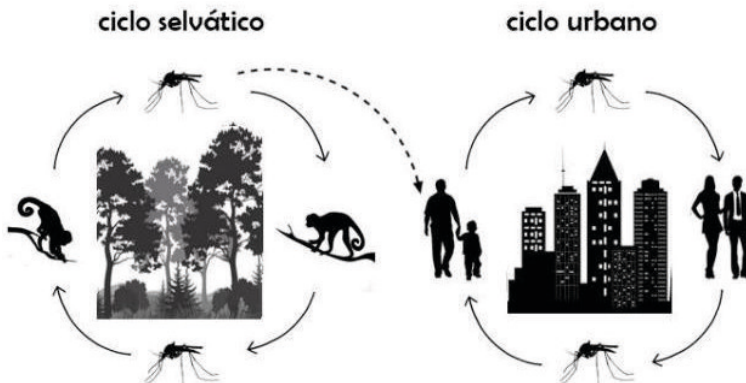


Figura 3-Ciclo de Transmissão

Fonte: Souza, 2019.

Assim como o MAYV, os arbovírus, tipicamente, são patógenos que mantêm o seu ciclo em ambiente silvestre (BERNAL *et al.*, 2021). Entretanto, existem alguns fatores que podem intervir no ciclo de transmissão e dispersão geográfica de tais doenças, principalmente a aproximação da população à e áreas florestais, regiões de alta prevalência das arboviroses. No Brasil, a região da floresta Amazônica é caracterizada pela vasta biodiversidade e distribuição heterogênea das espécies, sendo considerada uma das maiores florestas tropicais do mundo (MYERS *et al.*, 2000). Sendo assim, o ambiente encontrado nesse tipo de floresta é propício para a manutenção do vírus (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Infecção Viral

Pouco se sabe em relação aos mecanismos específicos de entrada do MAYV no interior das células hospedeiras. É de conhecimento científico que os *Alphavirus* utilizam o processo de endocitose celular como forma de infectar seus alvos. O início da infecção se dá com a entrada do material genético do vírus na célula, e o contato entre o envelope viral com a membrana celular é um evento importante para que ocorra todos os processos seguintes de ação viral (MÁS & MERELO, 2013).

Os *Alphavirus* infectam as células via endocitose celular (VANCINI *et al.*, 2013). A invaginação da membrana e a formação de uma vesícula que será internalizada depende de muitas proteínas e fatores de interação viral. Dentro da célula hospedeira a vesícula formada se dissocia e o vírus se abriga nos endossomos, onde as condições ideais de pH favorecem a diversas alterações nas glicoproteínas E1/E2 necessárias para que ocorra a fusão da membrana viral com a membrana endossomal (COLPITTS *et al.*, 2007). O pH ácido da vesícula endossomal é responsável por promover mudanças estruturais nas proteínas externas do vírus, E1 se dissocia de E2 e interage com o endossoma. Após a interação, o capsídeo viral é liberado no interior da célula infectada, e devido a sua desintegração o material genético é liberado para ser replicado e traduzido (LONGO *et al.*, 2010).

Diversas proteínas são estudadas e estão relacionadas com a entrada viral desse grupo de vírus nos hospedeiros, como por exemplo, a proteína TSPAN9, um complexo proteico identificado como fator hospedeiro humano relacionado a infecções por *Alphavirus* (STILES *et al.*, 2016). Assim como o complexo TSPAN9, outras estruturas são alvo de pesquisas como potenciais receptores para o gênero viral mencionado. Algumas estruturas proteicas foram identificadas e estão relacionados com a infecção de vírus artralgênicos, o Mxra8, por exemplo, foi identificado como potencial receptor relevante para MAYV e CHIKV. Esse receptor é responsável por se ligar em proteínas externas do vírus, garantindo a conexão das membranas, processo relevante para que ocorra a infecção (ZHANG *et al.*, 2018).

Após o repasto sanguíneo pelo vetor *Haemagogus Janthinomys* no ser humano, tem-se o início dos processos de infecção viral. A distribuição do MAYV ocorre de maneira sistêmica, logo as partículas virais maduras se dispersam pela corrente sanguínea do hospedeiro. A replicação ocorre principalmente em células do sistema imunológico, como por exemplo os macrófagos, e alcança seus pontos de maior replicação no fígado e baço (TESH *et al.*, 1999).

Epidemiologia

O Mayaro foi descrito pela primeira vez por volta do ano de 1954, no Caribe (ANDERSON *et al.*, 1957). Pesquisadores isolaram o vírus de trabalhadores da zona rural, e todos os infectados apresentaram sintomas de febre aguda. Posteriormente, o vírus se espalhou e foi isolado em diferentes países da América Central e América do Sul, dentre eles Peru, Guiana Francesa, Venezuela, Bolívia e Brasil (AZEVEDO *et al.*, 2009).

As informações epidemiológicas a respeito da identificação do vírus estão baseadas, na maioria dos casos, nos ensaios sorológicos (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). A epidemiologia relata que a prevalência é alta em regiões de florestas tropicais, devido as condições ideais em relação a possíveis hospedeiros e os vetores da doença, como por exemplo os mosquitos (PILATTI *et al.*, 2016). O Ministério da Saúde (2020), classifica a Febre do Mayaro como uma doença viral, febril aguda, sendo que na maioria dos casos, as pessoas contaminadas passam pela infecção sem risco de morte, com sintomas leves que variam de 3 a 5 dias após seu início.

Desde a identificação inicial no Caribe, este foi encontrado em regiões diferentes no continente, além dos casos relatados, foram identificados anticorpos em cidadãos brasileiros distribuídos geograficamente no país (FRANCH *et al.*, 2012). A identificação e incidência do vírus ao longo dos anos, apontam que existe um crescimento na distribuição do MAYV. A presença do vírus alcançou regiões distantes das florestas tropicais, e esta dispersão pode estar associada a urbanização e a possibilidade de novos vetores (TURINO *et al.*, 2015).

A sorologia aponta casos relatados em regiões distantes do continente americano, no entanto, existem alguns interferentes que dificultam a identificação do vírus, como por exemplo a falta de informação em regiões mais precárias (DIAGNE *et al.*, 2020).

Diagnóstico e tratamento

A Febre do Mayaro não possui sintomas específicos, e na maioria dos casos o diagnóstico é dificultado devido a falta de informação sobre o vírus e limitações laboratoriais. A clínica da doença é semelhante a de outras viroses, os pacientes apresentam diversos sintomas em comum, e podem até mesmo apresentar o quadro de co-infecção por estes vírus (MACKAY *et al.*, 2016). A detecção do vírus pode ser realizada por meio de métodos sorológicos, estes avaliam a presença de anticorpos IgM e IgG produzidos na resposta imunológica do hospedeiro quando em contato com o vírus, esses testes apresentam um resultado mais rápido no âmbito laboratorial (IZURIETA *et al.*, 2011). Ademais, os métodos de diagnóstico mais específicos para a Febre do Mayaro se voltam para a detecção do genoma do vírus por meio dos ensaios moleculares, os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) confirmam de forma eficiente a presença do genoma no hospedeiro, diagnosticando a infecção pelo MAYV (LEDNICKY *et al.*, 2016).

Em comum com outras viroses o tratamento da Febre do Mayaro é inespecífico, o paciente passa por avaliação e tem a evolução do quadro acompanhada por alguns dias, os medicamentos utilizados buscam diminuir as dores provocadas (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018). Até o momento não há vacinas comercializadas, existem modelos de ensaio que passam por testes, mas não foram aprovados até então (WEISE *et al.*, 2014).

Filogenia do vírus Mayaro

A implementação de métodos moleculares para detecção do MAYV possibilitou avanços importantes na realização de sequenciamento dos vírus e filogenia a partir dessas sequências para identificação dos grupos e subgrupos do MAYV a partir de diferentes regiões. Atualmente para o MAYV três genótipos têm sido descritos (D, L e N) com base em sequências parciais das proteínas E1 e E2, sendo o D amplamente distribuído na América do Sul, o genótipo L, supostamente limitado ao Brasil, mas recentemente detectado no Haiti e o genótipo N agrupado em clado separado de apenas uma cepa de MAYV isolada no Peru no ano de 2010 (AUGUSTE *et al.*, 2015). Pezzi *et al.* (2019), e outras filogenias com genomas completos mostraram que o genótipo D incluíam vários clados que segregaram por regiões geográficas como Venezuela, Peru, Bolívia, e Brasil com todos esses isolados altamente conservados (<3%), porém distintos de outros genótipos como o N (5-6%) e (13%) L. No Brasil, os genótipos D e L são os mais prevalentes, e através destes trabalhos os genótipos D encontram-se agrupados com cepas de Peru, Venezuela e Bolívia e o genótipo L agrupado principalmente com apenas duas cepas do Haiti 2014/2015.

JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por arboviroses, durante muito tempo negligenciadas, ganharam destaque devido a surtos esporádicos de dengue e zika. Diversas alterações ambientais e fatores associados a globalização contribuíram para a dispersão dos vetores, e alteração no ciclo viral, promovendo o aumento de pessoas infectadas em diferentes regiões. A reaparição dessas arboviroses também está associada com a capacidade de adaptação dos vírus com seus vetores e com o ambiente, o que viabiliza cada vez mais a distribuição geográfica dos *alphavirus*.

A Febre do Mayaro tem potencial para se tornar uma patogenia com grande distribuição continental, e desencadear futuras epidemias de forma silenciosa. As características filogenéticas e aspectos de interação com vetores e reservatórios viabilizam a manutenção e sobrevivência do vírus por muito tempo, levando a dispersão descontrolada de seu material genético.

A utilização de ferramentas de bioinformática é de grande importância para a análise e investigação de sequências virais, assim como para o seu monitoramento. Atualmente, existem diversos *softwares* desenvolvidos a fim de representar as relações específicas dos vírus e seus parâmetros epidemiológicos. As análises filogeográficas correlacionam aspectos na dispersão e evolução de inúmeras patógenias, tais ferramentas apresentam algoritmos estatísticos eficientes na construção de modelos de árvores filogeográficas, que auxiliam no entendimento sobre os vírus.

Assim como outros arbovírus, o MAYV possui relevante capacidade de dispersão e ressurgimento em diversas regiões. Sendo assim, compreender a distribuição geográfica do vírus e possíveis alterações genéticas se torna uma ferramenta de grande relevância epidemiológica, assim como ser fonte de informações evolutivas da espécie e de todos os genomas analisados para pesquisas, desenvolvimento de antivirais e possíveis métodos de diagnósticos mais específicos.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Construir uma árvore filogeográfica com genes oriundos de cepas de vírus Mayaro a partir de bancos de dados, a fim de compreender o padrão de evolução do vírus e sua dispersão geográfica atual.

Objetivos Específicos

- Recuperar sequências gênicas completas do genoma do vírus Mayaro em bancos de dados;
- Analisar as sequências utilizando *softwares* de múltiplo alinhamento e *score* filogenético;
- Realizar a montagem da Árvore Filogeográfica das sequências selecionadas;
- Identificar a dispersão dos diferentes genótipos com sequências atuais e completas, mediante parâmetros de tempo e localização geográfica.

PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Delineamento da pesquisa

Trata-se de uma pesquisa experimental retrospectiva *in silico* com intuito de monitorar a dispersão do vírus Mayaro e seus genótipos na América do Sul e países do Caribe. A metodologia aplicada foi desenvolvida em etapas sequenciais. A primeira consistiu na verificação e recuperação de sequências do genoma do MAYV a partir de bancos de dados. Os critérios de seleção estavam baseados na busca por genoma completo do vírus e sequências sem duplicidade. Todas as sequências obtidas foram salvas em arquivo de extensão fasta (fas), posteriormente, realizou-se o tabulamento destas, identificando-as por espécie, código nos bancos de dados, origem geográfica, e ano de inclusão (Tabela 1).

Após a obtenção das sequências do vírus, seguiu-se para a segunda etapa. Realizou-se o múltiplo alinhamento de todas as sequências de forma simultânea e montagem de um modelo de árvore filogenética, por meio do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA®), versão 11 (TAMURA *et al*, 2021). O *software* citado possui grande especificidade para esse tipo de alinhamento, o que viabilizou a sua utilização na pesquisa. A instalação do MEGA® contempla um programa de pacotes de extensão com diversas funcionalidades, e o recurso de extensão *Muscle (ClustalW)* foi selecionado a fim de alinhar e avaliar a presença do sinal filogenético entre estas sequências.

A terceira etapa da pesquisa consistiu na construção de um modelo de árvore filogenética com todas as sequências selecionadas e alinhadas em etapas anteriores. Para isso, também foi utilizado o MEGA®, obteve-se o melhor parâmetro estatístico e construção do modelo filogenético a ser usado posteriormente.

Por fim, a filogenia do vírus foi associada a sua geografia e ambiente de dispersão, utilizando o *software* BEAST® (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) versão 6.1. O programa é eficaz para análise de filogenias e históricos evolutivos por meio de árvores, e seu algoritmo utiliza-se de ferramentas de probabilidade e proporção usando o método *Bayesian Monte Carlo Markov Chain* (SUCHARD *et al.*, 2018).

Por conseguinte, todos os dados obtidos foram analisados, avaliando assim a dispersão do vírus em diferentes países e alterações filogenéticas ao longo de sua evolução.

RECUPERAÇÃO DOS GENES

Conforme descrito anteriormente, a primeira etapa consistiu na busca de sequências genéticas do vírus do Mayaro em banco de dados. A verificação das sequências foi realizada por meio do banco de dados do VIPR (Vírus Pathogen Resource- <https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=vipr>) e foram conferidas no GENBANK (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O período de obtenção dessas se deu entre os dias

11 e 23 de Abril de 2022. As sequências de nucleotídeos dos bancos de dados são disponibilizadas ao público de forma gratuita e estão em constante atualização.

No seguinte estudo, as sequências do MAYV foram identificadas de acordo com a região, ano, cepa, e código nos bancos de dados. Os parâmetros de seleção utilizados foram a distribuição geográfica, perfis sequenciais completos, ausência de duplicidade, hospedeiro humano, e proximidade com a cepa referência selecionada.

Primeiramente utilizou-se o banco de dados presente no VIPR, onde o primeiro filtro de identificação selecionado foi a busca por sequências e cepas, especificando a taxonomia Togaroviridae, família viral do MAYV. Em uma nova página, adicionou-se outros filtros que auxiliaram na busca: genoma completo, hospedeiro humano, e ausência de duplicidade dos genomas do vírus. Todas as sequências encontradas no VIPR foram confirmadas no banco de dados do Genbank.

Trinta e cinco sequências foram recuperadas utilizando os filtros e parâmetros de seleção citados. A cepa BNI-1 (KJ013266) isolada na Guiana Francesa em 2013 está classificada como referência no banco de dados do GENBANK, assim esta foi selecionada para a padronização e análise das demais para o alinhamento. Foi realizada a análise individual de forma visual de cada sequência, avaliando as proteínas codificadas pelo genoma e comparando cada genoma com a sequência referência citada. De todos os 35 genótipos recuperados, apenas um não foi selecionado para a pesquisa, cepa FPI_2162, visto que apresentou uma variação muito ampla quando comparado com a cepa BNI-1. As outras 34 sequências recuperadas, foram analisadas e consideradas aptas para o alinhamento.

Durante a análise, todas as regiões que não codificariam proteínas essenciais para o vírus foram excluídas, e as sequências remontadas de acordo com a sequência de pares de bases responsáveis pela produção proteica.

Múltiplo Alinhamento

O alinhamento múltiplo buscou estabelecer possíveis homologias entre as cepas selecionadas, essa atribuição da biotecnologia permitiu e facilitou a estimativa temporal de divergências entre os organismos, em relação a um ancestral em comum. Tal método foi de grande auxílio na caracterização da filogenia do vírus, e o alinhamento adequado obtido garantiu uma boa precisão na construção do modelo filogenético que foi realizado em sequência.

As trinta e quatro sequências selecionadas e classificadas como aptas para a pesquisa foram salvas em um único arquivo em formato fasta, esse formato foi determinado por ser o formato correspondente aos *softwares* que seriam utilizados. As sequências validadas foram alinhadas por meio do *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA®), este possui um amplo pacote de extensão e diversas funções, que foram suficientes para a obtenção de resultados satisfatórios no experimento. Além disso, a versão 11 está disponível de forma gratuita ao público de interesse. O algoritmo *Muscle* (*Clustal W*) é uma extensão implementada dentro do programa de pacotes do *software* MEGA®, este foi utilizado para a realização do alinhamento das cepas, sendo o responsável por determinar todas as homologias existentes, e as possíveis diferenças decorrentes da evolução do vírus, como por exemplo, troca de bases por mutação e deleções.

Após a corrida das sequências pelo *Muscle* (*Clustal W*) o alinhamento já estava concluído. Foi realizada uma minuciosa análise e comparação das regiões homólogas, além daquelas que se apresentavam de forma diferente entre todas as sequências. Realizou-se também, a tradução dos códons genéticos, por meio do mesmo *software*, a fim de analisar a sequência de aminoácidos responsáveis pelas proteínas de importância do vírus. A análise permitiu comparar as trincas de pares de bases do alinhamento com aquelas já observadas nos bancos de dados, o que corroborou a precisão do alinhamento realizado. Por fim, o arquivo foi salvo em pasta específica para o *upload* na construção do modelo filogenético.

Modelo filogenético

Ainda utilizando os pacotes de extensão do *software* MEGA®, versão 11, realizou-se a escolha de um modelo de substituição de nucleotídeos que melhor se ajustaria as sequências selecionadas. Na aba *Models*, selecionou-se a extensão *Find Best DNA* e *upload* do arquivo (fasta) com as sequências, o modelo determinado para a construção da árvore foi (GTR+G+I), sendo utilizado para estimar a dispersão evolutiva entre as 34 sequências. Após a determinação do melhor modelo de aplicação, seguiu-se para a montagem da árvore, o método estatístico utilizado foi o *Maximum Likelihood*, responsável por determinar o parâmetro de máxima verosimilhança entre os dados analisados. Além disso, aplicou-se o *Bootstrap method* para a filogenia, validando em 1000 pseudoréplicas.

Uma única corrida foi realizada usando o modelo de substituição dos nucleotídeos GTR+G+I validando 5 categorias gama, e os resultados obtidos foram amostrados a cada 1000 etapas, como determinado pelo *Bootstrap*.

Filogeografia do vírus

A filogeografia foi realizada por um algoritmo bayesiano atribuído no *software* de análises moleculares BEAST[®], versão 6.1, que utiliza um método eficaz na estimação em conjuntos da história demográfica e dispersão das sequências incluídas. A partir do modelo filogenético obtido anteriormente, montou-se uma árvore coalescente, representando a distribuição do vírus relacionado com o tempo de identificação. O método utilizado pelo *software* é algoritmo *Bayesian Monte Carlo Markov Chain* (MCMC), que promove a inferência, via métodos estatísticos, das sequências genéticas e fornece a correlação destas com o tempo, distribuição, e evolução molecular.

Para as análises, primeiramente, as sequências foram carregadas pelo BEAUti[®], dentro das extensões do *software* BEAST[®]. O arquivo quando submetido foi salvo e exportado por este em um formato compatível com a análise bayesiana do *software*. Em seguida as sequências alinhadas em um novo formato de saída foram atribuídas a análise do método MCMC.

Todos os parâmetros para a construção da filogeografia já haviam sido obtidos anteriormente com a árvore modelo, desse modo, aplicou-se o modelo (GTR+G+I) em *Maximum Likelihood* validando 5 categorias gama e 1000 réplicas.

A edição da árvore foi realizada pelo programa FastTree[®], e por fim, obteve-se a árvore filogeográfica do vírus do Mayaro consenso em função das 34 sequências analisadas. Realizou-se a interpretação e análise dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram recuperadas 34 sequências, dentre as quais não foi encontrada nenhuma cepa de fora do continente americano depositada no banco de dados do VIPR. O Brasil foi o país com maior número de sequências, foram recuperadas 17. Além do Brasil, na América do Sul recuperou-se 1 na Guiana Francesa, 8 no Peru, 1 na Venezuela e 2 na Bolívia. Na América Central obteve-se 1 sequência em Trinidad e Tobago e 4 no Haiti. Também não foi identificada nenhuma cepa na América do Norte, conforme a figura abaixo.

CEPA	CÓDIGO	PAÍS	TAMANHO	HOSPEDEIRO	ANO
Acre27	KM400591	Brasil	11273	Humano	2004
BeH342916	KY618131	Brasil	11423	Humano	1978
BeH343155	MK57244	Brasil	11206	Humano	1978
BeH394885	KY618132	Brasil	11416	Humano	1981
BeH407	MK573238	Brasil	11224	Humano	1955
BeH428890	MK573239	Brasil	11224	Humano	1984
BeH473130	KY618133	Brasil	11535	Humano	1988
BeH504639	KY618134	Brasil	11512	Humano	1991
BeH505465	KY618135	Brasil	11612	Humano	1991
BeH506151	MK57241	Brasil	11206	Humano	1991
BeH743921	KY618136	Brasil	11381	Humano	2008
BeH744141	KY618137	Brasil	11381	Humano	2008
BeH744173	KY618138	Brasil	11381	Humano	2008
BeH758762	KY618139	Brasil	11365	Humano	2009
BeH792430	KY618140	Brasil	11480	Humano	2012
BNI-1	KJ013266	Guiana	11376	Humano	2013
BR/Sinop/H307/2015	MH513597	Brasil	11147	Humano	2015
BR/SJRP/LPV01/2015	KT818520	Brasil	11438	Humano	2014
FPI_1738	KY026197	Peru	11438	Humano	-
FPI_1766	KY026195	Peru	11456	Humano	-
FPI_179	KY026200	Peru	11433	Humano	-
FPY_0046	KY026198	Peru	11440	Humano	-
FPY_0122	KY026199	Peru	11443	Humano	-
FSB0311	MK573245	Bolívia	11206	Humano	2002
Haiti-0380/2014	MK837006	Haiti	11429	Humano	2014
Haiti-0729/2014	MN138459	Haiti	11429	Humano	2014
Haiti-1/2014	KY985361	Haiti	11462	Humano	2014
Haiti-1/2015	KX496990	Haiti	11462	Humano	2015
Venezuela-1/2016	MK288026	Venezuela	11441	Humano	2016
IQT4235	MK070491	Peru	11413	Humano	1997
Iqu2950	MK573243	Peru	11206	Humano	2000
Obs2209	MK573242	Peru	11206	Humano	1995
TRVL 4675	MK570492	Trinidad	11424	Humano	1954
Uruma	MK573246	Bolívia	11206	Humano	1955

Tabela 1- Sequências

Das seqüências recuperadas, observou-se grande proximidade e homologia após o alinhamento realizado. Como já era esperado, a filogenia entre as cepas é próxima, apresentando poucas variações de nucleotídeos e, conseqüentemente, de proteínas. As cepas KY618133 (Brasil), KY618135 (Brasil), MH51597 (Brasil) e KY98561 (Haiti) apresentaram alterações equivalentes, principalmente na substituição de Timinas por Citosinas (Figura 4).

Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*								
1. gb:KM400591 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
2. gb:KY618131 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
3. gb:MK573244 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
4. gb:KY618132 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
5. gb:MK573238 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
6. gb:MK573239 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
7. gb:KY618133 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
8. gb:KY618134 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
9. gb:KY618135 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
10. gb:MK573241 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
11. gb:KY618136 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
12. gb:KY618137 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
13. gb:KY618138 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
14. gb:KY618139 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
15. gb:KY618140 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
16. gb:KJ013266 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
17. gb:MH513597 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G
18. gb:KT818520 Organis	A	T	G	T	C	G	A	A	G	T	C	T	T	T	G	T	A	G	A	T	A	T	C	G	A	G	G	C	C	G

Figura 4- Alinhamento Múltiplo

Figura 4. Ilustração da substituição de Timinas por Citocinas observadas durante o alinhamento múltiplo das seqüências filogenéticas.

O melhor parâmetro de ajuste para a substituição de nucleotídeos entre as seqüências selecionadas foi obtido após o múltiplo alinhamento. O modelo determinado pelo algoritmo do *software* MEGA apresentou como resultado o parâmetro (GTR+G+I), conforme a tabela 2.

Model	#Param	BIC	AICc	InL	Invariant	Gamma
GTR+G+I	75	67396,54925	66584,35928	- 33217,16436	0,359705707	0,519223935
GTR+G	74	67448,7118	66647,35063	- 33249,66043	n/a	0,226782743
TN93+G	71	67466,52724	66697,65254	- 33277,81257	n/a	0,220171975
TN93+G+I	72	67472,59454	66692,89101	- 33274,43141	0,523560436	1,064275121
K2+G	67	67688,01986	66962,46061	- 33414,21809	n/a	0,194077096
K2+G+I	68	67694,94408	66958,55595	-33411,2654	0,525422408	0,890102627
T92+G	68	67704,69514	66968,30702	- 33416,14093	n/a	0,194461064
T92+G+I	69	67712,38085	66965,16385	- 33413,56898	0,476316354	0,697590418
HKY+G	70	67734,09568	66976,04982	- 33418,01159	n/a	0,187555844
HKY+G+I	71	67743,53015	66974,65545	- 33416,31402	0,316141593	0,382229793
GTR+I	74	68001,65874	67200,29757	- 33526,13391	0,396040499	n/a

Tabela 2- Modelo de ajuste

A árvore filogeográfica obtida é importante para compreender melhor os aspectos evolutivos do vírus do Mayaro ao longo do tempo, sendo que de uma raiz surgem novas sequências observadas na ponta dos ramos dessa. Nossa árvore do MAYV foi construída por meio do programa BEAST® (utilizando 1000 réplicas) após o alinhamento das sequências com o programa *Muscle*, incluído como extensão no MEGA®. Para a edição da árvore, utilizou-se o

o programa FastTree®. Cada ramificação obtida representa um clado, sendo possível nessa árvore filogenética encontrar com mais clareza, cerca de 2 cladogramas principais, com ramificações secundárias.

Os ramos distribuídos em cladogramas na árvore demonstraram apenas cepas pertencentes aos genótipos D e L, e não foi identificada nenhuma correspondente ao genótipo N. O tamanho das sequências (11058) e o método de análise bayesiana utilizado apresentou divergências quanto a determinação genotípica descrita em filogenias com diferentes metodologias.

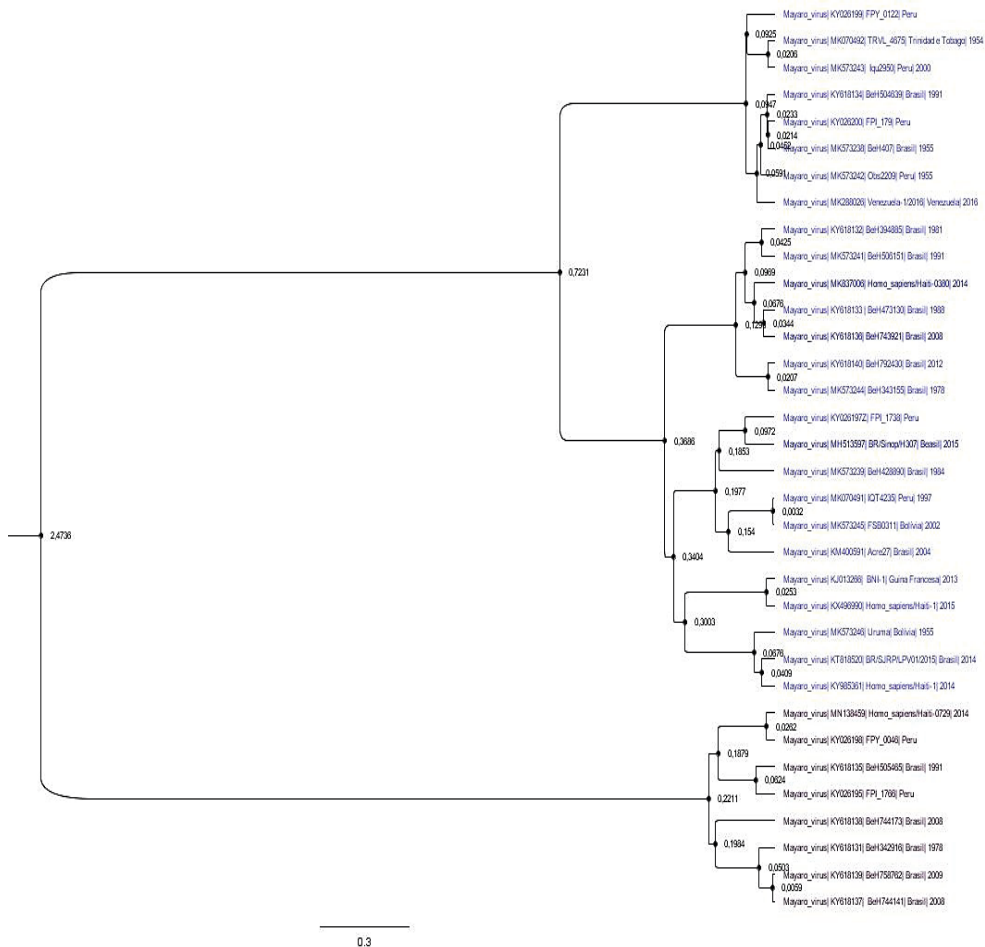


Figura 5-Filogeografia do vírus

Figura 5. Árvore Filogeográfica construída com base em 34 sequências presentes no VIPR e Genbank, a partir do genoma completo isolado em humanos, gerada pelo programa *BEAST*[®]. O modelo de substituição foi o GTR+G+I. Os genótipos D são destacados em azul e o genótipo L em marrom.

Pezzi *et al.* (2019), construiu uma árvore filogenética do Mayaro com 56 cepas validando até mesmo aquelas isoladas de mosquitos, e obteve a filogenia do vírus em genótipos D, L e N. Em contrapartida, a pesquisa validou apenas cepas isoladas, exclusivamente, de humanos e somente aquelas que apresentaram similaridade com a cepa referência selecionada. Além disso, na árvore filogeográfica obtida em nossa pesquisa, estão inseridas duas cepas não utilizadas na filogenia de Pezzi (MK573246 e MK573239), atualizando a análise filogenética do vírus.

Com a análise bayesiana foi possível identificar dois grandes clados principais e as ramificações obtidas apresentam as cepas de acordo com a semelhança entre suas sequências, podendo sugerir a dispersão geográfica do vírus em função do tempo. Observou-se no grande clado superior o agrupamento de cepas da Bolívia, Venezuela, Brasil e Peru, admitindo a rota do vírus entre países geograficamente próximos, corroborando com as filogenias descritas, além disso, entre essas sequências a filogenia apresentou predominância do genótipo D. Algumas cepas do Brasil e Peru que se agruparam no clado inferior, apresentaram-se bem semelhantes, e com predominância no genótipo L.

A sequência referência na pesquisa, isolada na Guiana Francesa, se apresentou próxima a cepa haitiana isolada em 2015, e ambas agrupadas no clado superior, assim como as sequências isoladas na América do Sul. Ademais, a cepa do Haiti isolada em 2014 foi agrupada de forma intermediária as cepas brasileiras, regiões distantes no mapa continental. Também foi possível observar em clados secundários a semelhança entre a cepa de Trinidad e Tobago com o Peru, regiões geograficamente distantes (Figura 7). A dispersão do vírus entre regiões distantes, pode ser explicada por meio de pessoas infectadas que transitam no continente, os “viajantes”, determinando a dispersão. (Figura 6).



Figura 6- Rota do Mayaro

Fonte: Blog da Geografia (2020) , modificado por Thiago Lemes.

CONCLUSÃO

A árvore filogeográfica com base nas 34 sequências do MAYV indicou através da configuração da árvore consenso apresentada pelo programa de análise bayesiana BEAST®, a presença de dois grandes cladogramas principais, um superior contendo sequências do genótipo D, principalmente, com sequências de países como Brasil, Peru, Bolívia e Venezuela, e um clado menor contendo sequências predominantemente do Brasil e do Peru.

Ao identificar a semelhança filogenética do vírus, tornou-se possível pressupor a rota de dispersão e sua distribuição de forma atualizada. A pesquisa demonstrou que a filogenia do vírus ainda se apresenta pouco variável, com alterações pontuais em sequências semelhantes. O alinhamento das 34 selecionadas indicou a presença de mudanças em pares de bases, no entanto, com a pesquisa não foi possível determinar a resposta e possíveis modificações provenientes dessas alterações. Pressupõe-se que tais divergências filogenéticas sejam resultados de evolução do vírus, contribuindo para uma maior sobrevivência do mesmo.

Outrossim, de acordo com os parâmetros obtidos e ano de isolamento das sequências, tornou-se possível atribuir a rota do Mayaro no continente. Assim como apresentado (Figura 5), a cepa de Trinidad e Tobago foi agrupada no mesmo clado que cepas brasileiras e a venezuelana, entende-se, então que a dispersão ocorreu de Trinidad para a Venezuela, e, posteriormente, desta para o Peru. Devido a proximidade regional, as cepas distribuídas no Brasil poderiam apresentar origem tanto das cepas peruanas, assim como da Bolívia e a própria Venezuela. Ademais, a cepa da Guiana Francesa, referência na pesquisa, se apresentou semelhante a isolada no Haiti em 2015, países próximos.

A filogeografia determinada é importante para que se entenda a distribuição desses vírus. De acordo com o demonstrado, as variações se apresentaram entre países geograficamente próximos, mas também observou-se uma dispersão entre regiões um pouco mais distantes com cepas filogeneticamente semelhantes (Venezuela e Brasil).

É necessário aprofundar mais em estudos de monitoramento e dispersão de vírus negligenciados. Os parâmetros obtidos por estas análises determinam diversos aspectos epidemiológicos de relevância científica que precisam ser explorados a fim de evitar surpresas inoportunas.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, Fernando. *et al.* Mayaro virus infection in amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n. 10, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001846>.

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny. *et al.* Mayaro: an emerging viral threat?. **Emerging Microbes e Infections**. v. 7, p. 1-11, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>.

AUGUSTE, Albert J. *et al.* Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerg Infect Dis.** v. 21, n. 10, p. 742- 750, 2015. <https://dx.doi.org/10.3201%2Faid2110.141660>.

BRASIL. Febre do Mayaro. Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-mayaro>. Acesso em: dez. 2021.

CARRERA, Jean-Paul. *et al.* Infecção humana e equina com alfavírus e flavivírus no Panamá durante 2010: um estudo transversal de contatos domiciliares durante um surto de

encefalite. **Am J Trop Med Hyg.** v.98, n.6, p. 1798–804, 2018. <https://dx.doi.org/10.4269%2Fajtmh.17-0679>.

COLPITTS, Tonya. *et al.* Venezuelan equine encephalitis virus infection of mosquito cells requires acidification as well as mosquito homologs of the endocytic proteins Rab5 and Rab7. **Virologia.** v. 369, p. 78-91, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.012>.

CHOI, Hyeree. *et al.* Protective immunity by an engineered DNA vaccine for Mayaro vírus. **Plos Neglected Tropical Diseases.** Fev. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007042>.

DIAGNE, Cheikh T. *et al.* Patogênese do Vírus Mayaro e Mecanismos de Transmissão. **Patógenos** v. 9, no. 9, p. 738. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090738>.

ESPOSITO, Danillo; FONSECA, Benedito. O vírus Mayaro será o responsável pelo próximo surto de um vírus transmitido por artrópodes no Brasil?. **Brazil J Infect Dis.** v. 21, p. 540– 544, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>.

FIGUEIREDO, Mario; FIGUEIREDO, Luiz. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 47, p. 677-683, 2014. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0246-2014>.

FORSHEY, Brett M. *et al.* Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Negl Trop Dis.** <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000787>. ago. 2010.

GANJIAN, Niloofar; RIVIERE--CINNAMOND, Ana. Mayaro na América Latina e no Caribe. **Rev Panam Salud Publica.** 2020. doi: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.14>.

GUBLER, Duane J. Dengue e febre hemorrágica da dengue. *Clin Microbiol Reviews.* v. 11, n. 3, p. 480–496.2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.3.480>.

HALSHEY, Eric. *et al.* Infecção pelo vírus Mayaro, região da Bacia do Amazonas, Peru, 2010–2013. **Emerg Infect Dis.** v. 19, n. 11, p. 1839-1842, 2013. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130777>.

HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana. Chikungunya Virus and Its Mosquito Vectors. **Doença zoonótica transmitida por vetores.** v.15, n. 4, p. 231–240. 2015. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1745>.

KOSTYUCHENKO Victor. *et al.* The structure of barmah forest virus as revealed by cryo- electron microscopy at a 6-angstrom resolution has detailed transmembrane protein architecture and interactions. **Journal of Virology.** 2011. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.05015-11>.

LANDIS, Michael J. *et al.* Bayesian Analysis of Biogeography when the Number of Areas is Large. **Systematic Biology.** v. 62, ed. 6, p. 789–804, nov. 2013. doi: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt040>.

- LAROQUE, Plautino O. *et al.* Levantamento soroepidemiológico para arbovírus em macaco-prego-galego (*Cebus flavius*) de vida livre no Estado da Paraíba e em macaco-prego (*Cebus libidinosus*) de cativeiro do Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 34, n. 5, p. 462-468, mai. 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/F7fdZvNDspJVD4XbZXzWC5H/?lang=pt&format=pdf>.
- LEDNICKY, John. *et al.* Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerg Infect Dis.** v. 22, no. 11, 2016. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2211.161015>.
- LONG, Kanya C. *et al.* Transmissão experimental do vírus Mayaro por *Aedes aegypti* **Am J Trop Med Hyg.** v. 85, n. 4, p. 750-757, 2011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0359>.
- LONGO, Li. *et al.* Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature.** v. 468, p. 705–708. 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature09546#citeas>.
- MACKAY, Ian. *et al.* Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city?. **Elsevier.** v. 18, p. 724-734. 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.007>.
- MARZ, Manja. *et al.* Challenges in RNA virus bioinformatics. *Bioinformatics*, v. 30, ed. 13. 1, p. 1793–1799, jul. 2014. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu105>.
- MÁS, Vicente; MELERO, José A. Entry of Enveloped Viruses into Host Cells: Membrane Fusion. Em: Mateu M. (eds) *Structure and Physics of Viruses*. **Subcellular Biochemistry.** V. 68, p. 467-487. Springer, 2013. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_16.
- MYERS, Norman. *et al.* Hotspots de biodiversidade para prioridades de conservação . **Nature** , v. 403 (6772), p. 853 - 858 . 2000.<https://doi.org/10.1038/35002501>.
- MUÑOZ, Manuel; NAVARRO, Juan Carlos. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica - Revista del Instituto Nacional de Salud, Bogotá.** v. 32, p. 286-302. 2012. Disponível em: <https://core.ac.uk/reader/228613520>.
- MUKHOPADHYAY, Suchetana. *et al.* Mapping the Structure and Function of the E1 and E2 Glycoproteins in Alphaviruses. **Structure.** vol. 14, p. 63-73, 2006. Doi <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.07.025>.
- PAREDES, Angel M. *et al.* Conformational changes in Sindbis virions resulting from exposure to low pH and interactions with cells suggest that cell penetration may occur at the cell surface in the absence of membrane fusion. **Virology.** v. 324(2), p. 373-386. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.046. PMID: 15207623.
- PAUL, David; BARTENSCHLAGER, Ralf. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol.* v. 2.2, p. 32-48, mai. 2013. <https://dx.doi.org/10.5501%2Fwjv.v2.i2.32>.
- PILATTI, Maira. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes infectados com o vírus Mayaro (MAYV) em Mato Grosso. **TCC-Biomedicina**, 2016. Disponível em: <https://www.repositoriodigital.univag.com.br/index.php/biomedicina/article/viewFile/66/66>.
- POWERS, Ann M. *et al.* Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **Am J Trop Med Hyg.** v. 75, p. 461-469. set. 2006. PMID: 16968922. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16968922/>.
- RICARDO, Izurieta. *et al.* Mayaro virus: the jungle flu. **Dovepress.** v. 10, p. 9-17, 2018. Disponível em : <https://pdfs.semanticscholar.org/c097/0664c6662a9801b00df55e39a8acf4a5ef01.pdf>.

RODRIGUES, Roger. *et al.* Predição de antígenos peptídicos MAYV para testes de imunodiagnóstico por imunoinformática e simulações de dinâmica molecular. **Scientific Reports**. v.9, 2019. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50008-3>.

SEMENZA, Jan C; SUK, Jonathan E. Doenças transmitidas por vetores e mudanças climáticas: Uma perspectiva europeia. **FEMS Microbiol Lett**. v. 365(2), 2018. doi: 10.1093/femsle/fnx244.

SILVA, Jordam. Aspectos ecológicos de vetores putativos do Vírus Mayaro e Vírus Oropuche em estratificação vertical e horizontal em ambientes florestais e antropizados em uma comunidade rural no Amazonas. Dissertação (Mestre em Saúde Coletiva), do Instituto Leônidas e Maria Deane. Manaus, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/23337/2/Disserta%20c3%a7%20c3%a3o%20Jordam%20Silva%202017.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2020.

SOUZA, Ana. Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV). Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/35453/1/2019>.

STILES, Katle M; KLELLAN, Margaret. Role of TSPAN9 in Alphavirus Entry And Early Endosomes. **Journal of Virology**. v. 90, n. 9, 14 de abr. 2016. <https://doi.org/10.1128/JVI.00018-16>.

STRAUSS, J H; STRAUSS E G. "The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**. vol. 58,3, p. 491-562, setembro de 1994. doi:10.1128/mr.58.3.491-562.1994.

SUCHARD, Mark A. *et al.* Integração de dados filogenéticos e filodinâmicos bayesianos usando BEAST 1.10. **Virus Evolution**. v. 4, e. 1, jan. 2018. doi:10.1093/ve/vey016.

TAMURA, Koichiro. *et al.* MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. vol.38. p. 3022-3027, jul. 2021. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TESH, Robert B. *et al.* Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clin Infect Dis**. v. 28, n. 1, p. 67-73, 1999. <https://doi.org/10.1086/515070>.

TURINO, Fernanda. A rota do vírus Mayaro. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2362&sid=32>.

VANCINE, Ricardo; HERNANDEZ, Raquel and BROWN, Dennis. Alphavirus Entry into Host Cells. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v. 129, p. 33-62. 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.10.002>.

VANCINE, Ricardo. *et al.* Alphavirus genome delivery occurs directly at the plasma membrane in a time- and temperature-dependent process. **J. Virol**. v. 87, p. 4352-9. 2013. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.03412-12>.

VASCONCELOS, Pedro. *et al.* Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saude Pública**. v. 17, p.155-164. 2017. doi: <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2001000700025>.

WEISE, William J. *et al.* A novel live-attenuated vaccine candidate for mayaro Fever. **PLoS Negl Trop Dis**. Publicado em 07 de agosto de 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002969>.

WHITE, Judith. *et al.* Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. **Quarterly Reviews of Biophysics**. v. 16, n. 2, p. 151-195, 1983. doi:10.1017/S0033583500005072.