



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO
NORDESTE BRASILEIRO**

VANESSA DE SOUSA DO VALE

PARNAÍBA-PI
ABRIL-2015

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO
NORDESTE BRASILEIRO

VANESSA DE SOUSA DO VALE

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

PARNAÍBA - PI
ABRIL – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

V149c Vale, Vanessa de Sousa do.
Caracterização molecular de *Dengue virus* circulantes no nordeste Brasileiro [manuscrito] / Vanessa de Sousa do Vale. – 2015.
61 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

1. *Dengue vírus*. 2. Análise Filogenética. 3. Co-circulação. I. Título.

CDD: 616.9

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Dengue virus* CIRCULANTES NO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

VANESSA DE SOUSA DO VALE

APROVADA EM 01/04/2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso-PI
Presidente

Prof^a. Dr^a. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí *Campus* Ministro Reis Velloso-PI
Membro

Prof^a. Dr^a. Cíntia Martins Perinotto
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso-PI
Membro

DEDICATÓRIA

A minha mãe, minha maior inspiração...

AGRADECIMENTOS

A Deus que abençoa minha vida e tudo que dela floresce...

A minha mãe, Neuza, pelo amor sem medida e todos os outros nobres sentimentos que o acompanham, minha eterna gratidão por acolher e motivar os meus sonhos.

Ao meu irmão, Bruno, pelo carinho e torcida de sempre.

Ao meu pai, Raimundo, pelo amor e apoio incondicional.

A toda minha família, em especial aos meus avós Antônio e Joana, e as tias Maria, Ivoneide e Cleidiane pelas orações e por acreditarem e incentivarem minhas conquistas.

Ao Janilson, de longe a pessoa que mais acredita no meu potencial, pelo amor, companheirismo, força e incentivo diários.

Aos poucos e bons amigos, pelo afeto, cuidado e palavras de motivação em todos os momentos.

A todos do BIOMIC pela parceria, incentivo e ajuda mútua, em especial ao Deuzair pelo auxílio e amizade.

A Tereza, minha companheira de luta e de glória, obrigada pela amizade, contribuição e por dividir comigo todos momentos de felicidade e aflição, não somente relativos a esse trabalho, mas a minha vida.

A Luzeni, por literalmente ter sido luz durante a realização desse trabalho, obrigada pela ajuda e as palavras de fé e otimismo.

A todos do laboratório de Biologia Molecular, em especial a Hianny, pela amizade sincera, acolhida, preocupação e por sempre tentar ajudar de alguma maneira.

Ao prof. Gustavo pelas oportunidades, ensinamentos, confiança, paciência e por estimular meu crescimento e lapidar minhas características profissionais durante esses anos.

A prof. Anna por me contagiar com seu entusiasmo pela microbiologia, por entender minhas aflições e sempre incentivar meu crescimento.

Aos colaboradores de Minas Gerais, em especial a Leandra Figueiredo, pela contribuição valiosa durante a realização deste trabalho.

Ao Mário Branco pela disponibilidade em responder meus questionamentos.

A todos os profissionais servidores da UFPI de Parnaíba, por contribuírem com o crescimento cada vez mais expressivo da nossa instituição, em especial aos mestres, por repassarem seus conhecimentos e valores na formação de profissionais cidadãos.

EPÍGRAFE

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”*

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Dengue virus	12
2.2	Ciclos de transmissão	15
2.3	Aspectos clínicos e patogênese.....	15
2.3.1	Fatores de risco para FHD/SCD	16
2.4	Diagnóstico laboratorial.....	18
2.5	Origem e diversidade genética.....	20
2.6	Epidemiologia da dengue	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	METODOLOGIA.....	29
4.1	Amostras	29
4.2	Extração do RNA e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	29
4.2.1	Transcrição reversa (RT) utilizando iniciador específico D2.....	30
4.2.2	Transcrição reversa (RT) utilizando <i>random hexamers</i>	30
4.2.3	PCR para região junto aos genes <i>C/prM</i>	30
4.2.4	PCR para o gene <i>E</i>	32
4.3	Purificação dos produtos da PCR	33
4.4	Sequenciamento	33
4.5	Análises das sequências	34
4.6	Alinhamento das sequências.....	34
4.7	Análises filogenéticas	34
5	RESULTADOS	35
6	DISCUSSÃO	40
7	PERSPECTIVAS.....	47
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** O Genoma do DENV, com aproximadamente 11kb de comprimento, codifica três proteínas estruturais: C, prM e E e sete não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (adaptado por Guzman et al, 2010). **12**
- Figura 2** Ciclo de transmissão do DENV (adaptado de Whitehead, 2007). **15**
- Figura 3** Comparação entre métodos diagnósticos diretos e indiretos. (Adaptado de Peeling, 2010). **19**
- Figura 4** Risco da dengue global em 2010. (Adaptado de Bhatt, 2013). **25**
- Figura 5** Representação gráfica dos sorotipos identificados em amostras provenientes dos anos de 2012, 2014 e o total nos dois anos analisados. **35**
- Figura 6** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da RT-PCR e controles positivos, utilizando os iniciadores sorotipo-específicos: D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 para amplificação do gene *C/prM*. A amostra 43 representa coinfeção pelos DENV 3 e 4. **36**
- Figura 7** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da RT-PCR e controles positivos, utilizando os iniciadores sorotipo-específicos: D13F/D14R (972 pb), DEN3 1EF/DEN3 2ER (1012 pb) para amplificação do gene *E*. As amostras 50 e 51 haviam positivado como DENV 3 na reação de amplificação dos genes *C/prM*, foram negativas pela amplificação do gene *E*, já a amostra 52 foi positiva para o DENV 1 pelas duas metodologias. L: marcador de peso molecular de 100pb (Ludwing BIOTEC, BR); CP: controle positivo; B: branco). **36**
- Figura 8** Árvore filogenética construída pelo método da Máxima Verossimilhança, mostrando a identificação do genótipo II para as amostras de DENV 4 identificadas no Piauí. A árvore foi construída através do programa PhyML v.3.1 segundo método TIM1 com sítio invariável estimado (TIM1ef+I) para DENV-4, selecionado pelo jModel Test.2010. **39**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos diferentes genótipos de DENV de acordo com sua distribuição geográfica. Adaptado de Weaver & Vasilakis, 2009.	21
Tabela 2	Sequência dos iniciadores descritos por Lanciotti (1992) para amplificação da região de interesse junto aos genes <i>C/prM</i> do DENV, com suas localizações e tamanho do produto da reação PCR.	31
Tabela 3	Sequência dos iniciadores para amplificação da região de interesse no gene <i>E</i> do DENV, com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.	32
Tabela 4	Descrição quanto as manifestações clínicas dos pacientes que sofreram hospitalizações por apresentaram quadro de agravamento por dengue.	37

ABREVIATURAS

- ADE** – Exacerbação dependente de anticorpo (do inglês “Antibody dependent enhancement”)
- C** – Capsídeo
- cDNA** – DNA complementar
- DENV** – *Dengue virus*
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- E** – Envelope
- ELISA** – Teste imunoenzimático (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)
- Fc** – Receptor FC
- FD** – Febre do dengue
- FHD** – Febre hemorrágica do dengue
- GelRed** – Gel corante de ácido nucleico
- HLA** – Antígeno leucocitário humano (do inglês “Human leukocyte antigen”)
- IFN** - Interferon
- IgG** – Imunoglobulina G
- IgM** – Imunoglobulina M
- MMLV** – Transcriptase reversa (do inglês “Moloney Murine LeukemiaVirus Reverse Transcriptase”)
- mRNA** – RNA mensageiro
- MTase** – Metiltransferase
- MV** – Máxima Verossimilhança
- NAAT** – Teste de amplificação de ácidos nucleicos (do inglês “Nucleic acid amplification tests”)
- nm** – Nanômetro
- NS** – Proteína não estrutural (do inglês “Non Structural Protein”)
- PAGE** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- pb** – Pares de base
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)
- PEG** – Polietilenoglicol
- pM** – Picomoles
- prM** – Pré-membrana
- RdRp**- RNA polimerase dependente de RNA
- RNA** – Ácido ribonucleico
- RT** – Transcrição reversa
- RT-PCR** – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês “Reverse transcriptase – polymerase chain reaction”)
- SCD** – Síndrome do Choque da Dengue
- SLEV** - *Saint Louis Encephalites virus*
- SLN** – Sequências de localização nuclear
- UTR** – Região não traduzida (do inglês “Untranslated region”)
- vRNA** – RNA viral
- WNV** - *West Nilo virus*

RESUMO

O *Dengue virus* possui uma extensa diversidade genética que consiste na existência de quatro sorotipos virais (DENV 1-4), estes ainda se subdividem em genótipos e linhagens. O genoma viral é um RNA de fita simples, que produz três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A proteína de envelope (E) interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro, por esta razão o gene *E* possui a mais alta taxa de mutação entre os flavivirus. Análises desse gene permitem acompanhar a evolução viral. As variações genéticas do vírus interferem na replicação eficaz, na virulência e no potencial epidêmico. Sendo assim, a inserção de um novo sorotipo, genótipo ou linhagem em uma determinada região pode levar ao desenvolvimento de epidemias, inclusive associadas a quadros graves. Portanto, o presente trabalho objetiva analisar a circulação dos sorotipos e realizar um estudo em filogenia dos *Dengue virus* circulantes no Estado do Piauí. Amostras de soro sugestivas de infecção pelo DENV, provenientes de instituições públicas e privadas, nas cidades de Teresina e Parnaíba-PI, tiveram o RNA extraído e utilizado como molde para reação de RT-PCR. Na amplificação dos produtos foram utilizados iniciadores específicos para os genes *C/prM* e *E*. Os sorotipos foram identificados conforme o tamanho padrão de bandas obtido na eletroforese em gel de agarose. Amostras de DENV 4 foram purificadas e sequenciadas. Sendo as sequências obtidas, alinhadas e comparadas quanto ao grau de identidade entre os isolados e sequências depositadas no GenBank. Uma árvore filogenética foi construída por análise de Máxima Verossimilhança. A partir das análises foram identificados os quatro sorotipos circulantes no Estado, o que reflete o padrão hiperendêmico do país, isso coloca o Piauí em situação de risco, pois a circulação de múltiplos sorotipos é um fator predisponente para o desenvolvimento de epidemias e formas severas, essa característica tem sido relatada de maneira crescente no país, sobretudo nas faixas etárias mais jovens. O sequenciamento de amostras locais de DENV 4 circulantes em 2012, revelou que elas pertenciam ao genótipo II, semelhante ao que foi descrito em diversas regiões do Brasil. As amostras encontram-se filogeneticamente próximas as sequências que correspondem as primeiras identificações da reintrodução do DENV 4 no país, que ocorreu em 2010 através do Estado de Roraima. Nossas amostras ainda se agruparam próximas a sequências identificadas em São Paulo, Minas Gerais, Pará e Amazonas, o que reafirma a ideia que após sua reintrodução por Roraima o vírus se dispersou para as demais regiões do país. No mesmo subclado estão diversas amostras da Venezuela, Porto Rico e Colômbia, reforçando a hipótese que este vírus pode ter sido introduzido no Brasil através de Roraima, via Caribe, a partir da Venezuela. A rota Caribenha é conhecida como importante via de entrada de novos vírus na América do Sul e conseqüentemente no Brasil. Pesquisas apontam a entrada do sorotipo DENV 2 no país através dessa rota. Estudos de monitoramento da inserção e circulação viral, bem como a caracterização molecular dos DENV são de fundamental importância, sobretudo em regiões endêmicas como o Estado do Piauí, pois permitem a previsão de epidemias e auxiliam no estabelecimento de medidas de controle.

Palavras-chave: *Dengue virus*, Análise filogenética, Co-circulação

1 INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais importante no mundo, trata-se de uma doença emergencial de preocupação internacional, devido a rápida disseminação e interrupção de epidemias para além de fronteiras nacionais (TDR/WHO, 2009). A doença ocorre em áreas tropicais e sub tropicais, sobretudo o Sudeste Asiático, Pacífico e Américas. Estima-se que mais de 50 milhões de infecções ocorram anualmente, incluindo cerca de 500 mil hospitalizações por dengue severa, principalmente em crianças (SAN MARTIN et al, 2010). Esse cenário representa prejuízos exorbitantes para os sistemas públicos de saúde e perdas econômicas consideráveis, devido a incapacidade produtiva provocada no paciente (GUZMAN & KOURI, 2002).

O *Dengue virus* (DENV) possui quatro sorotipos geneticamente distintos (DENV 1-4), que se subdividem em genótipos e linhagens. Qualquer um dos sorotipos virais é capaz de produzir um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de casos assintomáticos ou febres autolimitadas a doenças hemorrágicas severas. A gravidade da doença está condicionada a fatores de risco como: idade, genética do hospedeiro, genética do vírus e infecção secundária por sorotipo heterólogo (BACK & LUNDKVIST, 2013). Este último, é consequência da circulação de múltiplos sorotipos em uma mesma região. Durante a reinfecção por sorotipos distintos ocorre exacerbação da resposta imunológica, levando ao desenvolvimento de complicações hemorrágicas que podem culminar em óbito.

O Brasil está localizado em uma região hiperendêmica, com os quatro sorotipo virais circulando atualmente no país. Os sorotipos DENV 1, 2 e 3 circulam a pelo menos 20 anos (PIRES NETO et al, 2005) e o DENV 4 foi reintroduzido em 2010 (TEMPORÃO et al, 2010). Após esta última introdução, o sorotipo se espalhou rapidamente por vários Estados brasileiros, inclusive o Piauí, que registrou o primeiro caso em 2011(WHO, 2014). Análises sequenciais indicam que o genótipo predominantemente circulante no país é o DENV 4 II, embora o I também tenha sido identificado em casos isolados (NUNES et al, 2012). Acredita-se que o provável local de origem desse sorotipo seja a região do Caribe, que é reconhecidamente uma importante rota de entrada para novos DENV no Brasil (NUNES et al, 2014).

Estudos de monitoramento da introdução e circulação viral, bem como a caracterização genotípica do vírus são de fundamental importância, sobretudo em regiões endêmicas como o

Estado do Piauí. A análise constante da circulação dos sorotipos e da distribuição e inserção de novos genótipos auxiliam na identificação viral e permitem o reconhecimento de áreas de risco para dengue grave, fornecendo as principais informações para implantação de programas efetivos que evitem e controlem epidemias (DETTOGNI et al, 2011; GUZMAN et al, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Dengue virus*

O *Dengue virus* (DENV) integra a família *Flaviviridae* e o gênero *Flavivirus* (GUBLER, 1988), trata-se de vírus icosaédrico com 40-50 nm de diâmetro, envolto em um envelope lipídico (FERREIRA et al, 2008). O genoma viral é um RNA de fita simples, senso positivo, com cerca de 11kb de comprimento e 10.700 nucleotídeos, que codifica uma poliproteína precursora de 3.411 aminoácidos. Após clivagem a proteína precursora é convertida em três proteínas estruturais (Capsídeo, C; Pré-membrana, prM e Envelope, E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (ALVAREZ et al, 2006; CHANG, 1997; CHAMBERS et al, 1990) (**Figura 1**).

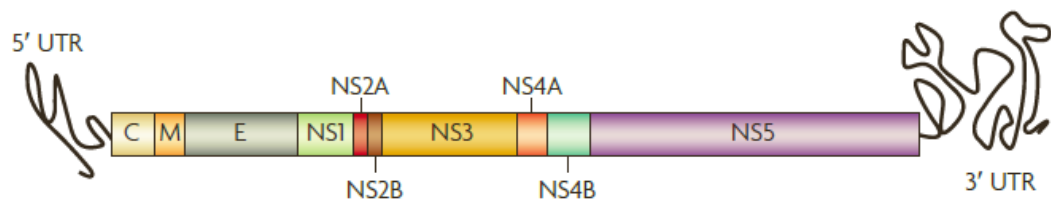


Figura 1: Genoma do DENV, com aproximadamente 11kb de comprimento e seus respectivos genes, codifica três proteínas estruturais: C, prM e E e sete não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (adaptado por Guzman et al, 2010).

As proteínas estruturais são componentes do vírus maduro, já as não estruturais são expressas apenas quando o vírus está infectando a célula, não sendo empacotadas em níveis detectáveis nas partículas maduras, estas estão envolvidas no processo de replicação do genoma viral (ALVAREZ et al, 2006). As propriedades biológicas do vírus estão situadas principalmente na proteína E, incluindo a ligação ao receptor, a hemaglutinação de eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora (GUZMAN & KOURI, 2002; CHANG, 1997).

A matriz de leitura aberta é flanqueada por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR) de aproximadamente 95-135 e 114-650 nucleotídeos respectivamente. A extremidade 5' contém um cap tipo I, similar a um mRNA celular e para que a tradução do RNA viral (vRNA) ocorra, é necessária a tradução inicial dessa região. A extremidade 3' não contém uma calda

poli A, mas termina em uma região conservada em forma de haste-alça, cuja estrutura é similar em todos os flavivirus, acredita-se que essa região esteja envolvida na replicação viral e na tradução (GAMARNIK, 2010; PADMANABHAN et al, 2010; HAHN et al, 1987).

O DENV consiste em quatro sorotipos geneticamente distintos (DENV 1-4) (GUBLER, 1998) e cada sorotipo é ainda subdividido em genótipos e linhagens de acordo com suas variações nucleotídicas. Recentemente um novo sorotipo viral foi descrito, o DENV 5, este foi isolado em transmissão silvestre na Malásia e posteriormente também detectado em humanos, inclusive levando à quadros severos (VASILAKIS, 2013). Essa extensa variabilidade genética tem implicações na gravidade da doença, no padrão de viremia e no surgimento de epidemias (GUZMAN & KOURI, 2002).

A entrada do vírus na célula ocorre por endocitose mediada por receptores, entre eles as lecitinas do tipo C e as famílias TIM e TAM da fosfatidilserina (MEERTENS et al, 2012). A glicoproteína E modifica o receptor de entrada na célula através da interação direta com o sistema imune do hospedeiro, essa proteína é um dos principais alvos da imunidade humoral. Ela é composta por três domínios: domínio I, uma estrutura em β -barril orientado paralelamente a membrana viral; domínio II, portador do peptídeo de fusão e domínio III, responsável pela ligação ao receptor (CHU et al, 2007). Em estágio maduro, a proteína E apresenta-se como um homodímero com peptídeo de fusão inacessível, sua exposição a baixo pH induz sua trimerização e expõe o peptídeo de fusão, de maneira a permitir a junção das membranas viral e celular (MODIS et al, 2004). Por conta da interação direta da proteína E com o sistema imune do hospedeiro, o gene *E* possui a taxa mais alta de mutação entre os *Flavivirus*, condicionando o surgimento de variantes genéticas (DETTOGNI et al, 2011; LAI et al, 2008).

O pH ácido do endossomo desencadeia uma mudança conformacional na estrutura viral e o genoma é liberado no citoplasma (HEINZ et al, 2003). O vRNA senso positivo é convertido em uma única poliproteína que é clivada em proteínas estruturais e não estruturais, a tradução da cadeia é interrompida para a síntese de intermediário de cadeia negativa que serve como molde para o novo vRNA senso positivo. Os múltiplos ciclos de tradução produzem grandes quantidades de proteínas virais, que em conjunto com o vRNA são montadas em novos vírions (BACK, LUNDKVIST, 2013; CLYDE et al, 2006).

A infecção por DENV induz alterações na membrana intracelular e no citoplasma (MILLER et al, 2010; MACKENZIE et al, 1996), essas alterações permitem a ancoragem do

complexo de replicação viral. As proteínas C, prM e E possuem em suas regiões C-terminais, aminoácidos hidrofóbicos que funcionam como sequências de sinal para inserção das mesmas no retículo endoplasmático (SALONEN et al, 2005). Uma vez fixadas, uma peptidase de sinal celular, juntamente com as proteases virais NS2B e NS3, clivam as proteínas estruturais e a proteína NS1 em proteínas individuais (LOBIGS et al, 1993; PETHHEL et al, 1992). A proteína NS3 junto com seu cofator NS2B atua como uma serino protease que cliva as junções entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, e NS4B-NS5, bem como os sítios internos de C, NS2A, NS3 e NS4A (MILLER et al, 2010; BAZAN et al, 1989).

A NS1 é uma glicoproteína com dois locais de glicosilação que são conservados entre os *Flavivirus*, sua função ainda é desconhecida, mas acredita-se que ela facilite a infecção e a patogênese do vírus (LIBRATY et al, 2002). Trata-se de um importante marcador de infecção aguda, uma vez que é secretada ativamente pelas células infectadas e produz forte imunogenicidade (AVIRUTNAN et al, 2010; SCHLESINGER et al, 1987). Os anticorpos produzidos contra NS1 têm sido associados à disfunção endotelial por causarem reatividade cruzada com proteínas presentes nas células do endotélio (LIN et al, 2006).

As pequenas proteínas NS2A, NS4A, NS4B estão menos caracterizadas e descobertas recentes propõe um papel inibitório na transdução de sinal mediada por interferon (IFN). Acredita-se que a natureza hidrofóbica destas proteínas tenha relação com a localização adequada das proteínas virais e do vRNA durante a replicação e montagem do vírus (BACK, LUNDKVIST, 2013).

A NS5 possui três domínios funcionais: uma metiltransferase (MTase) na região N-terminal, sequências de localização nuclear (SLN) e uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) na região C-terminal. A MTase promove a metilação necessária para o nivelamento do genoma viral, as SLN interagem com a NS3 e são reconhecidas por fatores celulares, permitindo o transporte das proteínas para o núcleo, e a RdRp é responsável pela síntese de novos genomas vRNA (MILLER et al, 2010).

Antes da liberação de novas partículas virais, a proteína estrutural prM é processada por uma protease do hospedeiro na proteína M madura (STADLER et al, 1997), acredita-se que a prM impeça as proteínas E de se reorganizarem e se fundirem prematuramente por indução do pH, dessa forma, o evento de maturação é necessário para a infecciosidade (ZHANG et al, 2003; GUIRAKHOO et al, 1992).

2.2 Ciclos de transmissão

O DENV possui dois ciclos de transmissão: um urbano e outro silvestre (**Figura 2**). No primeiro, o vírus circula entre humanos sendo transmitido através de mosquitos do gênero *Aedes*, sobretudo o *Aedes aegypti*. No segundo, o vírus silvestre circula entre hospedeiros primatas não-humanos e diversas espécies de mosquitos *Aedes*, nas florestas da África Ocidental e da Malásia (GUBLER, 1988). O urbano ocorre em ciclos constantes de transmissão mosquito-homem-mosquito, nos quais os vetores adquirem o vírus durante o repasto sanguíneo de humanos infectados no período de viremia e posteriormente o transmitem para indivíduos saudáveis da mesma maneira (GUBLER, 1988).

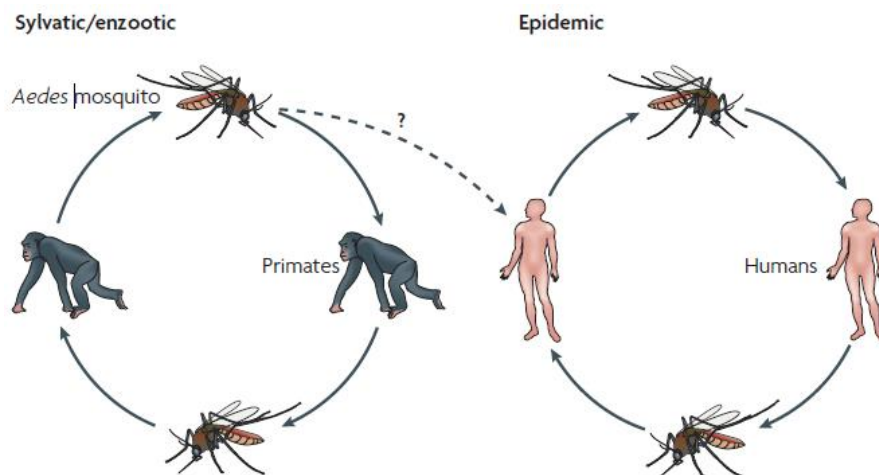


Figura 2: Ciclo de transmissão do DENV (adaptado de Whitehead, 2007).

A disseminação do vírus reflete a distribuição do vetor e a dinâmica de distribuição da doença tem relação direta com o ciclo de vida do mosquito (CARRINGTON, 2014). O rápido crescimento não planejado dos centros urbanos, combinado com o abastecimento de água inadequado e tratamento de esgoto deficiente, tem contribuído de maneira importante para a transmissão do DENV (McCALL, 2008).

2.3 Aspectos clínicos e patogênese

A dengue produz um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam de infecções assintomáticas e autolimitadas a doenças hemorrágicas severas. A OMS adotou durante muito tempo a classificação da doença em: Febre do Dengue (FD), Febre Hemorrágica do Dengue

(FHD) e Síndrome do Choque do Dengue (SCD). A primeira, mais branda, se caracteriza tipicamente por febre alta, dor de cabeça, mialgia, artralgia, dor retro-orbital e rash maculopapular; as últimas, severas, apresentam complicações hemorrágicas como epistaxe, sangramento gengival, sangramento gastrointestinal, hematúria e trombocitopenia (GUZMAN & KOURI, 2002). Recentemente esse arranjo foi revisto e a OMS passou a adotar um novo sistema de classificação para a doença: Dengue, Dengue com sinais de alarme e Dengue grave (WANG et al, 2013), que passou a ser implantado no Brasil em 2014. Manifestações menos comuns da dengue, como o acometimento neurológico, também podem ocorrer (BERKOWITZ, 2015).

2.3.1 Fatores de risco para FHD/SCD

Apesar das constantes pesquisas, a complexa patogênese da dengue ainda é pouco compreendida, sabe-se que a gravidade da infecção pode estar condicionada a vários fatores de risco como: infecção secundária, idade, genética do hospedeiro e do vírus. A primeira pode resultar no fenômeno de Exacerbação Dependente de Anticorpo (ADE) (BACK, LUNDKVIST, 2013; BALMASEDA et al, 2006; HALSTEAD et al, 2007; RICO-HESSÉ et al, 1997).

2.3.1.1 Infecções secundárias

Durante a infecção primária o indivíduo produz anticorpos sorotipo-específicos (homólogos) que conferem imunidade ao longo vida e anticorpos de proteção cruzada (heterólogos) que protegem contra os demais sorotipos por 3 a 4 meses. Na infecção secundária, estes últimos em baixas concentrações não são capazes de neutralizar os sorotipos heterólogos, ao contrário, facilitam a entrada do vírus nas células por meio da formação de complexos vírus-anticorpo que se ligam aos receptores Fc de monócitos e macrófagos, levando ao aumento no número de células infectadas e conseqüentemente nos níveis de viremia. Esse fenômeno é conhecido como Exacerbação Dependente de Anticorpo (ADE) (WHITEHORN et al, 2011; HALSTEAD, 2007). O aumento da carga viral leva a resposta inflamatória intensa com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e uma intensa multiplicação de células T, estes eventos podem culminar em FHD/SCD. (PEREZ et al, 2004; YANG et al, 1995).

Semelhante ao que acontece na resposta humoral, a resposta imune celular também produz células T de memória sorotipo específicas e de reação cruzada durante a infecção primária. Em uma infecção secundária ambas são estimuladas e as células de reação cruzada poderão agravar a infecção (MATHEW et al, 2014; KURANE et al, 1990). Estas reconhecem

epítomos conservados ou alterados que variam entre os sorotipos, isso altera a qualidade da resposta celular e o repertório imunológico envolvido no extravasamento plasmático (CASSETTI, et al 2014; ROTHMAN et al, 1999). Esse fenômeno de baixa afinidade para o sorotipo infectante, mas elevada afinidade para um sorotipo diferente adquirido em uma infecção passada, é referido como “Pecado antigênico original” (*Original Antigenic Sin*) (CASSETTI et al, 2014; MANGADA et al, 2005; ZIVNA et al, 2002).

2.3.1.2 Idade

Crianças e gestantes são consideradas grupos de risco para FHD/SCD (BISWAS et al, 2012). Os bebês e crianças têm manifestações clínicas diferentes dos adultos, principalmente em infecções secundárias, neles a frequência de extravasamento plasmático, gravidade e choque é maior (VERHAGEN & GROOT, 2014; HAMMOND et al, 2005). Isso acontece porque o endotélio vascular é intrinsecamente mais permeável em crianças (GUZMAN & KOURI, 2002). Um grupo particularmente de alto risco para doença severa, são os bebês nascidos de mães com imunidade estabelecida para o DENV, pois caso venham a adquirir uma infecção primária no primeiro ano de vida, estão sujeitos ao fenômeno de ADE pela reação cruzada com os anticorpos maternos (VERHAGEN & GROOT, 2014; MARTINA et al, 2009). No Sudeste asiático a dengue é principalmente uma doença grave e infantil, diferente do que se observa nas Américas, onde a maioria dos casos é de dengue clássica em adultos (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al, 2011; HALSTEAD, 2006), Entretanto esse padrão Asiático vem se difundindo para Américas (SAN MARTIN et al, 2010), essa tendência tem sido justificada pela teoria da infecção viral dinâmica, em que as crianças tornam-se a população susceptível após os adultos terem sido infectados e estarem imunes (FERGUSON et al, 1999)

2.3.1.3 Genética do hospedeiro

Diferentes polimorfismos genéticos do hospedeiro podem ter consequências importantes quanto à susceptibilidade à doença (GUZMAN et al, 2010), evidências desse fato surgiram durante epidemias de dengue em Cuba, onde foram observados um número reduzido de casos de FHD/SCD em pacientes de ascendência africana quando comparados aos de ascendência europeia (GUZMAN & KOURI, 2002). Os polimorfismos dos genes HLA estão entre os mais estudados para associações genéticas com FHD/SCD (MATHEW et al, 2014). Entre os fatores ditos não-HLA, que também estão associados a gravidade da doença, estão o receptor de vitamina D, o receptor Fc γ IIA, o fator de necrose tumoral TNF- α e a interleucina IL-10 (ANDERSON et al, 2014; GUZMAN & HARRIS, 2014). Além desses, os alelos *MICA*

e *MICB* têm sido relacionados a infecções assintomáticas e sintomáticas e os alelos *MICB* e *PLCE1* a susceptibilidade à SCD (KHOR et al, 2011; GARCÍA et al, 2011).

2.3.1.4 Genética do vírus

Existem evidências de que os genótipos asiáticos são mais virulentos e mais propensos a causar hemorragia que os genótipos americanos, mesmo depois de uma infecção secundária (ANDERSON et al, 2006; RICO-HESSÉ et al, 1990). Um mecanismo hipotético sugere que genótipos mais virulentos foram selecionados ao longo do tempo por sua maior capacidade de se replicar em alvos humanos fundamentais, tais como macrófagos e células dendríticas, assim os DENV virulentos irão produzir mais vírus por célula, portanto maior viremia e resposta inflamatória (VASILAKIS et al, 2007).

2.4 Diagnóstico laboratorial

Na ausência de antivirais ou uma vacina eficaz contra o DENV, o diagnóstico rápido tornou-se essencial para o manejo do paciente, a diferenciação de outras doenças com sintomatologia semelhante, a identificação precoce dos casos graves e a intervenção terapêutica (TANG et al, 2012; PARIDA et al, 2008; DEEN et al, 2006). O monitoramento laboratorial permite o desenvolvimento de sistemas de vigilância que investigam surtos, caracterizando o perfil de circulação viral, reconhecendo áreas de risco para FHD/SCD e fornecendo as principais informações para implantação de programas efetivos que evitem e contenham epidemias (GUZMAN et al, 2010; HILAIRE et al, 2008).

A confirmação laboratorial para o DENV envolve métodos diretos e indiretos, os primeiros detectam o vírus ou seus constituintes, enquanto que os últimos, os anticorpos produzidos contra o agente viral (PEELING et al, 2010; TDR/WHO, 2009) (**Figura 3**). Métodos diretos são úteis na identificação precoce, durante a fase aguda quando o vírus e seus componentes podem ser detectados no soro, plasma, sangue total ou tecidos do 4° ao 5° dia após o início dos sintomas. São ditos diretos, o isolamento viral, o ELISA para detecção de antígeno NS1 e a RT-PCR. Já os métodos indiretos são úteis no diagnóstico tardio, do 10° ao 15° dia após o início dos sintomas (LAUGHLIN et al, 2012; TDR/WHO, 2009), nessa categoria o principal método é o ELISA para detecção de IgM ou IgG. O uso combinado desses

testes pode aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, pois permite a identificação eficaz em diferentes estágios da doença (LAUGHLIN et al, 2012).

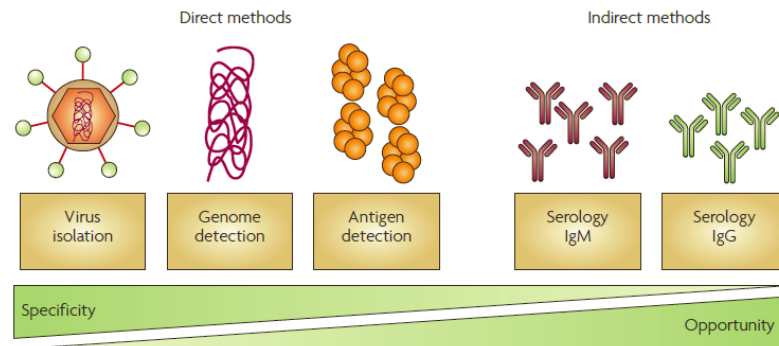


Figura 3. Comparação entre métodos diagnósticos diretos e indiretos. (Adaptado de Peeling, 2010).

O isolamento viral é o método de escolha e utiliza linhagens celulares de mosquito *Aedes albopictus* C6/36, embora células de outros mosquitos (*Aedes pseudoscutellaris*, AP61) e mamíferos (Células Vero, LLC-MK2 e BHK21) também possam ser usadas. O vírus a ser cultivado é obtido a partir do sangue total, soro ou plasma de 3-5 dias após o início dos sintomas ou a partir de tecidos em casos fatais (GUZMAN & KOURI, 2002). Mas são os testes sorológicos os mais comumente utilizados na rotina laboratorial, isso porque, são de fácil manuseio quando comparados a cultura de células e a RT-PCR. Embora seja difícil, se não impossível, que possam ser empregados na identificação de sorotipos específicos, pois os anticorpos produzidos em infecções primárias possuem reatividade cruzada com outros sorotipos DENV e anticorpos produzidos em infecções secundárias possuem alta reatividade cruzada não só com outros sorotipos DENV, mas também com outros flavivirus. Apesar das muitas metodologias disponíveis para detecção de IgG e IgM, o ELISA é o mais utilizado (PEELING et al, 2010; TANG et al, 2012).

O RNA viral pode ser detectado através de testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), usando amostras de tecidos, sangue total ou soro colhidos durante a fase aguda da doença (PEELING et al, 2010). A transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) tem sido aplicada ao diagnóstico da dengue, vigilância molecular e caracterizações genéticas (GUZMAN & KOURI, 2002). Vários protocolos para detecção do DENV foram descritos e validados, utilizando RT-PCR convencional ou RT-PCR em tempo real e variam quanto ao método de extração do RNA, a localização genômica dos iniciadores, especificidade, sensibilidade, detecção dos produtos e identificação dos sorotipos (TANG et al, 2012;

MORITA, 1994; HARRIS et al, 1998; ROSARIO et al, 1998; LANCIOTTI et al, 1992). Trata-se de uma metodologia sensível e específica, no entanto sua sensibilidade está diretamente relacionada à coleta durante o período de viremia (TANG et al, 2012).

2.5 Origem e diversidade genética

Acredita-se que os DENV tenham evoluído a partir de vírus silvestres transmitidos entre primatas não-humanos na África Ocidental e Ásia. (HOLMES & TWIDDY, 2003; GUBLER, 1997). Para averiguar essa hipótese, Wang (2000) através de estudos filogenéticos com o gene *E*, analisou amostras silvestres e humanas e concluiu que as linhagens humanas evoluíram independentemente a partir de introduções dos seus progenitores silvestres na espécie. Sugeriu ainda, que essa evolução do vírus para infecção de hospedeiros humanos, estaria relacionada a modificações no domínio III da proteína de envelope, este fato vai de encontro a outra hipótese, a de que o sistema imune do hospedeiro exerce pressão seletiva sobre a evolução viral (HOLMES & TWIDDY, 2003).

A maior expressão da diversidade genética do DENV está certamente na existência de quatro sorotipos virais, as distâncias filogenéticas entre eles chegam a justificar que alguns autores os classifiquem como “espécies” distintas dentro do gênero *Flavivirus* (KUNO et al, 1998). O surgimento dos diferentes sorotipos provavelmente se deu por repartição ecológica em populações distintas de primatas, de modo que eles evoluíram de forma independente (FERGUSON et al, 1999). A ordem de ramificação mais aceita até hoje, indica que o DENV 4 foi o primeiro a divergir, seguido do DENV 2 e por último, houve a separação entre os DENV 1 e DENV 3 (WANG, 2000).

Cada sorotipo é ainda subdividido em genótipos e linhagens. Essa extensa variabilidade genética é uma característica comum aos vírus de RNA, e deve-se a alta taxa de mutação da RNA polimerase dependente de RNA, as suas rápidas taxas de replicação e suas grandes populações (CHEN & VASILAKIS, 2011; DRAKE & HOLLAND, 1999). Existem indícios de que também possam ocorrer recombinações entre os diferentes sorotipos, quando estes se encontram em infecção simultânea (L'AZOU et al, 2014; HOLMES et al, 1999). Essas variações genéticas são determinantes importantes na replicação eficaz, na virulência e no potencial epidêmico (GUZMAN & HARRIS, 2014).

Os genótipos foram classificados dentro de cada sorotipo, considerando as variações em suas sequências nucleotídicas. O DENV-1 foi dividido em cinco genótipos de acordo com

análises da região de junção dos genes *E/NS1* (RICO-HESSE, 1990), o DENV 2 por sua vez, foi classificado em seis genótipos, considerando a mesma região analisada para o sorotipo anterior e análises complementares da proteína E (TWIDDY, 2002; RICO-HESSE, 1990). Já o DENV 3, foi dividido em quatro genótipos pelo sequenciamento dos genes *M/E* (LANCIOTTI et al. 1994), e por último, o DENV 4 foi classificado em quatro genótipos por análise do gene *E* (CHEN & VASILAKIS, 2011; LANCIOTTI et al, 1997). A distribuição geográfica dos genótipo do DENV está descrita na **Tabela 1**.

TABELA 1 – Classificação dos diferentes genótipos de DENV de acordo com sua distribuição geográfica. Adaptado de Weaver & Vasilakis, 2009.

SOROTIPO	GENÓTIPO	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
DENV 1	I	Sudeste Asiático, China e África Oriental
	II	Tailândia
	III	Vírus silvestre identificado na Malásia
	IV	Ilhas do Pacífico Ocidental e Austrália
	V	Américas, África Ocidental e alguns vírus da Ásia
DENV 2	Asiático 1	Malásia, Tailândia e Ásia
	Asiático 2	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Pacífico e do Oceano Índico, no subcontinente Indiano e no Oriente Médio
	Americano	América Latina e Caribe, subcontinente Indiano e em ilhas do Pacífico
	Asiático/Americano	Tailândia, Vietnã e Américas
	Silvestre	Vírus coletados em humanos, mosquitos ou animais sentinelas na África Ocidental e Sudeste Asiático
DENV 3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e ilhas do Pacífico Sul
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África e Samoa
	IV	Porto Rico, América Latina e Central e Tahiti
DENV 4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Thaiti, Caribe e Américas
	III	Vírus encontrados recentemente na Tailândia
	IV	Vírus silvestres da Malásia

Existem evidências de que alguns genótipos são mais virulentos que outros, pois aparecem mais frequentemente causando quadros hemorrágicos severos (WEAVER & VASILAKIS, 2009). As principais pesquisas nesse sentido, mostram que o genótipo americano do DENV 2, é considerado um genótipo de baixa virulência, pois não possui associação com as formas graves, em contrapartida, o genótipo asiático do mesmo sorotipo tem sido demonstrado como risco aumentado para hemorragias em infecções secundárias (LEITMEYER et al, 1999;

RICO-HESSE et al, 1997). Outro exemplo é o genótipo II do sorotipo DENV 4, que foi apontado como mais virulento e com maior potencial de disseminação (PATIL et al, 2012). De maneira geral os genótipos asiáticos demonstram maior capacidade para causar as formas severas que os genótipos americanos (LEITMEYER et al, 1999), isso acontece porque eles se replicam mais eficientemente tanto em células dendríticas humanas, quanto no vetor *Aedes aegypti* (COLOGNA et al, 2005; ARMSTRONG & RICO-HESSE, 2001)

Levando em conta essa associação entre genótipo e gravidade, existem hipóteses que sugerem que a inserção de diferentes sorotipos ou genótipos de DENV em uma determinada região, pode levar ao surgimento de casos graves da doença e o desenvolvimento de epidemias (WEAVER & VASILAKIS, 2009). Surtos ocorridos no Havaí e no Tahiti entre 2001-02 foram atribuídos a inserção do DENV 1 genótipo IV (IMRIE et al, 2006). Em 1981 a análise de sequências parciais do DENV 2 circulante em Cuba, o primeiro país ocidental a documentar casos de FHD, mostrou que esse vírus era filogeneticamente mais próximo de antigos genótipos de DENV 2 asiáticos, que do genótipo circulante até então (RODRIGUEZ-ROCHE et al, 2014; SARIOL et al, 1999). Na Malásia durante uma epidemia em 1993-94 foi verificada a introdução do DENV 3 genótipo II (de origem tailandesa) que se sobrepôs ao genótipo I que vinha sendo detectado no período (KOBAYASHI et al, 1999). Em 2004 vários surtos provocados por introduções do DENV 4 de origem tailandesa ou indonésia ocorreram na Austrália (HANNA et al, 2006). E na América Central após introdução de um genótipo do Sudeste asiático, surgiram casos hemorrágicos na Venezuela, Brasil, Colômbia e México (PIRES NETO et al, 2005).

Atualmente os quatro sorotipos existem nas Américas e desde 1963 o continente tem experimentado surtos causados pela circulação de pelo menos um genótipo de DENV 1, dois de DENV 2, três de DENV 3 e um de DENV 4 (ALLICOCK et al, 2012). Embora vários sorotipos possam circular em uma mesma região, suas dinâmicas evolutivas e espaciais fazem com que um deles se estabeleça e predomine sobre os demais em determinados períodos de tempo (ZHANG et al, 2005). No Brasil também circulam os quatro sorotipos, os DENV 1, 2 e 3 a pelo menos duas décadas (PIRES NETO et al, 2005) e o DENV 4 desde 2010 (TEMPORÃO et al, 2011). Novas linhagens tem sido introduzidas em intervalos de 7 a 10 anos no país, tendo como principal local de importação desses novos vírus a região do Caribe (NUNES et al, 2014). Essa rápida disseminação dos DENV conta com a importante contribuição do tráfego aéreo (NUNES et al, 2014; ALLICOCK et al, 2012).

O DENV 1 tem sido relatado no Brasil desde 1985, quando foi identificado pela primeira vez no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR et al, 1986), desde sua introdução o genótipo V é o único detectado no país. Drumond (2012), relatou a presença de três linhagens que foram introduzidas em quatro eventos diferentes, a primeira de 1984 a 85, a segunda de 1997-99 e as terceira e quarta entre 2004 e 2007. Os prováveis locais de origem dessas linhagens são o Caribe para as linhagens I e II e a Venezuela para a linhagem III (NUNES et al, 2014).

Já o DENV 2 foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1990 no Rio de Janeiro, quando foi responsável pelos primeiros casos de dengue hemorrágica no país. Em 2007 após sete anos de inatividade ele ressurgiu, ocasionando a epidemia mais grave já registrada no território nacional (FARIA et al, 2013; NOGUEIRA et al, 1990). Análises filogenéticas indicam que pelo menos três linhagens do genótipo Americano-asiático foram introduzidas no país, a linhagem I em 1988-89, a II em 1998-2000 e a III entre 2003-2005 (DRUMOND et al, 2013). A possível origem dessas linhagens, é o Caribe ou a Venezuela para a linhagem I e o Caribe para as linhagens II e III (NUNES et al, 2014). Barcelos Figueiredo (2014) sequenciou amostras de DENV 2 que circularam no Piauí entre 2006 e 2007 e identificou duas linhagens distintas pertencentes ao genótipo Americano-asiático, além disso lançou a hipótese de que possivelmente esse vírus tenha surgido no país através de uma nova rota, diretamente do Caribe para a região Nordeste do Brasil.

O primeiro caso de DENV 3 relatado no país ocorreu em 2000 no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al, 2001) e desde então o único genótipo identificado foi o III. Este genótipo tem sido associado a surtos de dengue grave na Ásia, África e América Latina (FRANCO et al, 2010; AQUINO et al, 2006). Araújo (2012) identificou quatro linhagens circulantes no país, duas delas se estabeleceram: a linhagem I, presente em todo em todo território nacional de 2001-9 e a linhagem II, na região Norte de 2003-8; já as linhagens III e IV foram identificadas em casos isolados na região Norte de 2002-3. As linhagens I, II e III provavelmente foram importadas do Caribe e a IV da Colômbia ou Venezuela (ARAÚJO et al, 2012).

O DENV 4 circulou brevemente na região Norte do país em 1982 (OSANAI et al, 1983). Em 2008 foi identificado em três casos isolados em Manaus (MELO et al, 2009) e depois disso ele ressurgiu apenas em 2010, quando foi detectado inicialmente em Roraima (TEMPORÃO et al, 2011) e depois em diversos Estados das regiões Norte (Roraima, Amazonas, Pará), Nordeste (Bahia, Pernambuco, Piauí) e Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo (SIQUEIRA JR et al, 2011). Análises filogenéticas indicaram que o genótipo predominantemente circulante no país é o II, no entanto, o genótipo I também foi identificado em casos isolados (SOUZA et al, 2011;

NUNES et al, 2012). Acredita-se que o DENV 4 surgiu no Brasil a partir de várias introduções de origens distintas: o Sudeste asiático, o Caribe e a Venezuela (NUNES et al, 2012).

Considerando que as introduções de novos sorotipos, genótipos ou até mesmo linhagens tem consequências importantes quanto ao desenvolvimento de formas graves e o surgimento de epidemias, o sequenciamento viral para identificação e monitoramento do DENV, aparece como uma ferramenta bastante útil para a previsão dos locais de maior risco, possibilitando o direcionamento de políticas públicas (DETTOGNI et al, 2011).

2.6 Epidemiologia da dengue

A dengue é a arbovirose mais importante no mundo, incidente ao longo dos trópicos, as maiores áreas de risco estão no continente asiático e americano (BHATT et al, 2013). A doença evoluiu de esporádica para um grave problema de saúde pública, gerando grandes prejuízos econômicos e sociais devido ao aumento da expansão geográfica, o número de casos e a gravidade da doença (GUZMAN & HARRIS, 2014). Sua incidência aumentou cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos (WHO, 2012), essas altas taxas de transmissão podem ser atribuídas a fatores que favoreçam o contato entre o vetor e o hospedeiro, as alterações climáticas e a evolução do vírus (RUNGE-RANZINGER et al, 2014; MANAKKADAN et al, 2013).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 125 países estão situados em áreas endêmicas, com cerca 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco (MURRAY et al, 2013; WHO, 2012; GUBLER, 2011). Ainda segundo a OMS, anualmente ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de infecções, com aproximadamente 500 mil casos de dengue severa e 20 mil mortes (SHEPARD et al, 2011; GUBLER, 2002). Entretanto, novos estudos indicam que esses números são ainda maiores, Bhatt e colaboradores (2013) estimam que 3,6 bilhões de pessoas estejam atualmente vivendo em áreas de risco, com 390 milhões de infecções ocorrendo anualmente. De acordo com os dados oficiais da OMS a taxa de mortalidade é de 1% a 2,5%, podendo atingir 20% nos casos em que o tratamento adequado não está disponível (DETTOGNI et al, 2011; HALSTEAD, 1997). A **Figura 4** ilustra as regiões mundiais em risco de dengue.

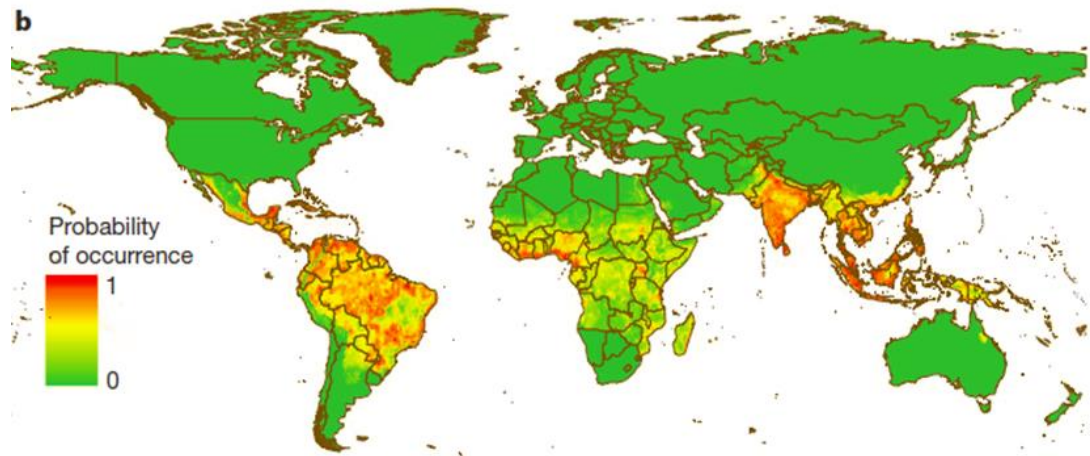


Figura 4. Risco da dengue global em 2010. (Adaptado de Bhatt, 2013).

Em 2010 estima-se que tenham ocorrido 96 milhões de infecções por dengue aparente no mundo, desses 70% ocorreram na Ásia, 34% na Índia, 14% nas Américas, 16% na África e apenas 0,2% nos países da Oceania (BHATT et al, 2013). Na África, Índia e Mediterrâneo os surtos de dengue tem aumentado substancialmente, além disso, tem sido relatadas introduções do DENV na Flórida, no sudeste da França e na Ilha da Madeira (GUZMAN & HARRIS, 2014). Essa expansão da doença deve continuar devido a dinâmica moderna das alterações climáticas, globalização, viagens, comércio e evolução viral (MURRAY et al, 2013).

Nas Américas uma campanha de erradicação do mosquito iniciada no fim de 1940 eliminou a doença, mas durante os anos de 1960 o vetor ressurgiu (GUZMAN & KOURI, 2002), atualmente quase todos os países são hiperendêmicos com ciclos epidêmicos ocorrendo de 3 a 5 anos, essa frequência vem crescendo particularmente na América Latina (MURRAY et al, 2013; FERREIRA, 2012; SHEPARD et al, 2011). Em 2010 mais de 1,6 milhões de casos de dengue foram registrados no continente, sendo 49 mil de dengue severa (MURRAY et al, 2013; WHO, 2012). O padrão epidemiológico observado nas Américas é de dengue clássica em adultos jovens, diferente do Sudeste Asiático, onde predominam as formas graves da doença em crianças (OOI et al, 2006; HALSTEAD, 2006), apesar disso, nas Américas tem sido descrita uma mudança gradual nesse perfil, com aumento do número de casos, sobretudo os graves, em crianças ao longo da década de 2000. (L'AZOU et al, 2014; HALSTEAD, 2006).

No Brasil o primeiro surto de dengue foi registrado em 1981 em Roraima, provocado pelos sorotipos DENV 1 e 4 (TEIXEIRA et al, 2013; OSANAI et al, 1983). Em 1988 ocorreu a primeira grande epidemia no Rio de Janeiro, que posteriormente se espalhou para as regiões Nordeste e Centro-Oeste. Após dois anos uma nova epidemia ocorreu no Rio de Janeiro, agora por ação do DENV 2 (PIRES NETO et al, 2005). Entre 2002 e 2010 foram registrados cerca de quatro milhões de casos de dengue, com epidemias nos anos de 2002, 2008 e 2010, importantes mudanças epidemiológicas ocorreram nesse período. A epidemia de 2002 refletiu a introdução e predomínio do DENV 3 e marcou o aumento do número de formas graves e óbitos da doença no país. Durante a epidemia de 2007 a 2008, marcada pela recirculação do DENV 2, houve um deslocamento do número de casos para crianças menores de 15 anos, tanto de notificações quanto de internações, esse número foi de 17% em 2002 para 27,5% em 2008, isso tem sido justificado pelo acúmulo de imunidade múltipla em adultos, tornando as crianças a população mais susceptível (TEIXEIRA et al, 2008; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al, 2011). Já na epidemia de 2010 causada pelo predomínio do DENV 1, foi observada a ocorrência de óbitos em pacientes com co-morbidades (SIQUEIRA JR et al, 2011).

Ao longo dos anos tem sido observada uma tendência ao aumento de casos graves e óbitos e consequentemente um aumento no número de internações por dengue no Brasil (SIQUEIRA JR et al, 2011). A reintrodução do DENV 4 no país foi identificada no segundo semestre de 2010 em Roraima (TEMPORAO et al, 2011), seguida de casos identificados no Amazonas, Pará, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo e Piauí, que teve o primeiro caso confirmado em 2011 (SIQUEIRA JR et al, 2011; SVS, 2011). Atualmente os quatro sorotipos circulam no país e essa mudança no perfil de circulação é um fator de risco para epidemias, devido à vulnerabilidade da população a este sorotipo (ACOSTA et al, 2011).

No Piauí os primeiros casos de dengue datam de 1994, dois anos mais tarde foi registrada a primeira epidemia, mas somente a partir dos anos 2000 é que a identificação dos sorotipos virais passou a ser realizada. Neste mesmo ano foi identificada a presença do sorotipo DENV 1; o DENV 2 foi identificado em 2002 e no ano seguinte os DENV 1, 2 e 3 foram confirmados (MONTEIRO et al, 2009). A dengue ocorre em todas as regiões do Estado, com maior número de municípios com alta incidência localizados na região norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em 2014 essa taxa foi de 189,1 casos por cem mil habitantes (SVS, 2014) e a maior letalidade já registrada foi de 8,4%, em 2006. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No ano de 2007 ocorreu a maior epidemia já relatada, atingindo uma incidência de 431,78 casos por cem mil habitantes, esta refletiu o cenário nacional, em que a introdução do DENV

2 após sete anos sem atividade, provocou aumentos na incidência e gravidade, principalmente em crianças menores de 15 anos (TEIXEIRA et al, 2013; CAVALCANTI et al, 2011). A ocorrência de sucessivos surtos de dengue em vários municípios e a co-circulação dos quatro sorotipos no Estado, favorecem o surgimento de casos graves (SESAPI, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a circulação dos sorotipos e realizar um estudo em filogenia dos *Dengue virus* circulantes no Estado do Piauí.

3.2 Objetivos específicos

Detectar os sorotipos do *Dengue virus* em amostras de soro de pacientes com sintomatologia sugestiva, no período de 2012 e 2014.

Identificar os sorotipos de *Dengue virus* através de RT-PCR, utilizando iniciadores aleatórios na etapa de transcrição reversa e iniciadores específicos para os genes *C/prM* e *E* na amplificação.

Construir árvore filogenética a partir do sequenciamento da região dos genes *C/prM*, agrupando o DENV 4 identificado no Piauí, com amostras circulantes depositadas no GenBank.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

Foram analisadas 117 amostras de soro de pacientes com casos suspeitos de dengue em diferentes graus, cedidas pelo Laboratório Central Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI) localizado em Teresina-PI; ou pelo Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) e laboratórios privados localizados na cidade de Parnaíba -PI. Estas amostras foram coletadas em média 4,28 dias após o início dos sintomas durante os anos de 2012 e 2014. Algumas foram submetidas a testes sorológicos para detecção do antígeno NS1 ou de anticorpos IgM e/ou IgG anti-dengue nas unidades que as cederam. Para as amostras vindas do LACEN foram obtidos os dados constantes no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), já para as amostras provenientes de Parnaíba, foram obtidas as fichas clínicas quando disponíveis. As amostras foram liberadas para desenvolvimento de pesquisa de acordo com *Declaração e autorização de caráter ético e legal*, concedida pelo LACEN-PI.

4.2 Extração do RNA e transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O RNA viral foi purificado a partir de 140µl de soro utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QUIAGEN, Valencia, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

A reação da Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) é dividida em duas etapas: Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A primeira reação (RT) utilizou iniciador específico para a região *C/prM* (2012) ou *Random Hexamers* (2014). A segunda (PCR) utilizou iniciadores específicos para duas regiões de interesse: os genes *C/prM* e *E*.

4.2.1 Transcrição reversa (RT) utilizando iniciador específico D2

A reação da Transcrição Reversa (RT) ocorreu segundo descrito por Lanciotti (1992), utilizando o iniciador específico para a região *C/prM*: D₂. Para um volume final de 21 µl, a reação foi dividida em três etapas. Na primeira, 7µl de RNA molde e 5µl (10 pM/µl) de primer reverse D₂ foram incubados em termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* a 70°C por 5 min. Na segunda, foram adicionados 4µl do tampão da enzima (5X), 2µl de dTT (0,1M) e 2µl de dNTPs (10mM) e incubados a 42°C por 5 min. Na última etapa foi adicionado 1µl de enzima RT (MMLV) (200U/µl) e a reação incubada a 42°C por 55 min e 72°C por 15min.

4.2.2 Transcrição reversa (RT) utilizando *random hexamers*

Para a reação da Transcrição Reversa (RT) foram utilizados iniciadores *random hexamers*, que correspondem a oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias [d (N)₆] que se ligam ao RNA e permitem a síntese de cDNA. Para um volume final de 26 µl, a reação foi dividida em duas etapas: na primeira, 10 µl de RNA molde e 5 µl de *random hexamers* (50 µM) foram incubados em termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)* a 25°C por 10 min e 70°C por 5 min, em seguida os produtos foram colocadas no gelo para impedir a formação de dímeros; na segunda etapa foram adicionados 5 µl de Tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl), os produtos foram incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

4.2.3 PCR para região junto aos genes *C/prM*

Seguindo o modelo descrito por Lanciotti e colaboradores (1992), as amostras foram submetidas a duas reações de amplificação: RT-PCR e Nested PCR. Na primeira foram utilizados os iniciadores D1 e D2, específicos para uma região conservada entre os quatro sorotipos virais, dessa forma a positividade da reação indica amplificação do DENV independente do sorotipo. Na segunda reação foram utilizados iniciadores que se ligam especificamente a cada um dos sorotipos, TS1, TS2, TS3 e TS4, assim é possível identificar os sorotipos individualmente. A **Tabela 2** lista os iniciadores com sua localização e os tamanhos dos seus respectivos produtos após a PCR.

TABELA 2 - Sequência dos iniciadores descritos por Lanciotti (1992) para amplificação da região de interesse junto aos genes *C/prM* do DENV, com suas localizações e tamanho do produto da reação PCR.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	POSIÇÃO	PRODUTO
<i>C/prM</i>	Forward D1	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAACCG	134-161	511pb
	Reverse D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	
	TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482pb
	TS2	CGCCACAAGGCCATGAACAG	232-252	119pb
	TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290pb
	TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392pb

A reação de PCR para amplificação dessa região utilizou os iniciadores D1 e D2. Para um volume final de 25 µl foram utilizados: 2,5µl de tampão (10x), 2µl de MgCl₂ (25mM), 0,3µl de dNTPs (10mM), 0,1µl de *Primer forward* – D1 (10 pM/ µl), 0,1µl de *Primer reverse* – D2 (10pm/µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 5µl de cDNA para cada amostra e 17,25µl de H₂O estéril. Depois de misturados, os reagentes foram submetidos a diferentes ciclos de temperatura gerados em termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)*. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 94°C por 5min, com 35 ciclos de amplificação (94 °C por 1 min; 58°C por 1 min; 72°C por 1 min), seguidos de uma extensão final por 10 min a 72°C.

Os amplificadores obtidos na PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corados com GelRedTM (Uniscience). Um produto de 511 pb era esperado para amplificação da região junto aos genes *C/prM*, que corresponde à região flanqueada pelo par de iniciadores D1 e D2, dentro da qual está uma região de consenso entre os sorotipos virais.

A segunda reação para tipagem do vírus (Nested-PCR), utilizou iniciadores específicos para cada sorotipo: TS1, TS2, TS3 e TS4. Inicialmente os produtos da primeira reação (RT-PCR) foram diluídos em água estéril de acordo com a sua positividade, amostras positivas diluídas de 1:5 e negativas de 1:19. Para um volume final de 25 µl foram utilizados: 2,5µl de tampão (10x), 2µl de MgCl₂ (25mM), 0,3µl de dNTPs (10mM), 0,1µl de D1 (10 pM/ µl), 0,1µl de TS1 (10 pM/ µl), 0,1µl de TS2 (10 pM/ µl), 0,1µl de TS3 (10 pM/ µl), 0,1µl de TS4 (10 pM/ µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 5µl do produto diluído inicialmente e 14,45µl de H₂O estéril. As

reações foram submetidas a 95°C por 3 minutos, com 30 ciclos de amplificação (94 °C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto), seguidos ao final por 10 minutos a 72°C. Os amplificadores obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com GelRed™ (Uniscience). Os produtos esperados para amplificação do gene *C/prM*, que corresponde à região flanqueada por cada par de iniciadores das reações estão listados na **Tabela 2**.

4.2.4 PCR para o gene *E*

Para a amplificação do gene *E* foram utilizados iniciadores sorotipo-específicos desenvolvidos por colaboradores (BARCELOS FIGUEIREDO et al, 2014; ROCHA et al, 2013). Dessa forma os produtos obtidos a partir da RT-PCR permitiram a identificação específica de cada sorotipo em uma única reação. A **Tabela 3** lista os iniciadores e os tamanhos dos seus respectivos produtos após a PCR.

TABELA 3 - Sequencia dos iniciadores para amplificação da região de interesse no gene *E* do DENV, com seus sorotipos específicos e tamanhos do produto da reação de PCR.

Sorotipo	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto
DENV 1	D13F	AGCCAAAATATCAAACACCAC	972 pb
	D14R	AAAGGTGGTTCTGTCTCAATG	
DENV 2	DEN2 3EF	GTTACGGGACATCTCAA	651 pb
	DEN2 4ER	GTTCTTTATTTTCCAGC	
DENV 3	DEN3 1EF	CAATGAGATGTGTGGGAG	1012 pb
	DEN3 2ER	CTTCTTTCTTCAACACAA	
DENV 4	DEN4E-F	TATAGGATCCCGATGCGTAGGAGTAGGAAAC	1212 pb
	DEN4E-R	AGCAAGCTTTTATGTGGACTCAAACATCTTGCC	

Para um volume final de 25 µl foram utilizados: 2,5µl de tampão (10x), 2,0µl de MgCl₂ (25mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de cada um dos iniciadores D13F, D14R, D2 3EF, D2 4ER, D3 1EF, D3 2ER, D4 EF e D4 ER (10 pM/ µl), 0,25µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 3µl de cDNA e 14,35µl de H₂O estéril. Depois de misturados os reagentes foram submetidos a diferentes ciclos de temperatura gerados em termociclador *Thermal Cyclers (Amplitherm®)*. As condições da PCR para a amplificação de *E*, foram: desnaturação inicial por 94°C por 5min, com 30 ciclos de amplificação (94 °C por 45 seg; 56°C por 1 min; 72°C por 1:30 min), seguidos de uma extensão final por 10 min a 72°C. Os amplificadores obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com

GelRed™ (Uniscience). Os produtos esperados para amplificação do gene *E*, que corresponde a região flanqueada por cada par de iniciadores, estão listados na **Tabela 3**.

4.3 Purificação dos produtos da PCR

Os amplicons foram sequenciados diretamente. Para a purificação foi utilizada a solução de PEG 8000 20%, 2,5 M NaCl, de acordo com o protocolo descrito por Rosenthal (1993) com algumas modificações. Ao volume do produto de PCR, foi adicionado o mesmo volume da solução de PEG 8000, essa mistura foi homogeneizada em vortex e incubada a 37° C por 15 minutos. Após esse período o produto foi centrifugado a 14.000 x *g* por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento restante foi lavado duas vezes com etanol 80% gelado, o sobrenadante descartado e o sedimento seco a 37° C. 12µl de água ultra pura estéril foram adicionados para ressuspensão do DNA purificado, após eluição o DNA foi incubado em banho-maria a 37° por 15 minutos.

4.4 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado através do método dideoxi descrito por Sanger (1977), em sequenciador automático capilar ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit “ABI Prism R Big Dye M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as especificações de reação e leitura do fabricante.

Nas reações de sequenciamento foram utilizados aproximadamente 120 ng do DNA de cada amplicon purificado, acrescidos dos respectivos iniciadores específicos senso e antissenso (5µM). Cada amplicon foi sequenciado em ambas as direções (forward e reverse). As reações foram feitas em placas de 96 poços seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Alemanha). Em seguida, as reações de sequenciamento foram precipitadas para eliminação dos iniciadores não utilizados e o DNA purificado ressuspensão em formamida HI DI.

4.5 Análises das sequências

A montagem e visualização das sequências finais foi feita com a análise dos cromatogramas obtidos por meio dos programas Chromas Lite™ (Technelysium Pty Ltd), Phred, Cross-match, Phrap e CAP3, disponíveis no sítio eletrônico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por meio do endereço: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.

As sequências obtidas foram comparadas as disponíveis em depósito no banco de dados Gen Bank por meio de um alinhamento no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information”, utilizando o programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- *Basic Local Aligment Tool*, Altschul *et al.*, 1990). As sequências de nucleotídeos que foram compatíveis à região amplificada e analisada neste trabalho, foram selecionadas para análises comparativas.

4.6 Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 (HIGGINS *et al.*, 2010) implementado no pacote MEGA 6.1 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>) e MUSCLE (EDGAR, 2004), disponível no sítio eletrônico <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>. Durante a revisão dos alinhamentos ajustes foram feitos manualmente, quando necessário.

4.7 Análises filogenéticas

A seleção do melhor modelo para a construção das árvores filogenéticas foi feita por meio do programa JModel Test (POSADA, 2011). Para construção das árvores filogenéticas foi utilizado o programa PhyML v.3.1 (GUINDON *et al.*, 2010) com 100 replicatas de *bootstrap*, empregando o critério *Akaike Information Criterion* (AIC). A análise por Máxima Verossimilhança (MV) foi feita utilizando o método TIM1 com sítio invariável estimado (TIM1ef+I) para DENV-4. As árvores filogenéticas foram visualizadas no FigTree v.1.4.0 (RAMBAUT, 2007).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 117 amostras, desse total 60 eram referentes ao ano de 2012 e as demais ao ano de 2014. A maioria delas foi submetida a testes sorológicos diretos para detecção do antígeno NS1 e/ou indiretos, para detecção de anticorpos IgM, nas instituições que as disponibilizaram para nossa posterior análise molecular. As amostras apresentaram altos índices de positividade para esses testes, ao final 47,86% foram positivas para alguma dessas metodologias, 29,91% positivaram para detecção do antígeno NS1 e 21,36% para o anticorpo IgM.

As análises por RT-PCR positivaram em 17,94% do total de amostras. Os quatro sorotipos virais, DENV 1-4, foram identificados nos dois anos analisados, sendo o DENV 3 o mais prevalente, representando 76,19% das identificações, seguido do DENV 2 com 14,28%, do DENV 4 com 9,52% e por último do DENV-1 com 4,76% (**Figura 5**).

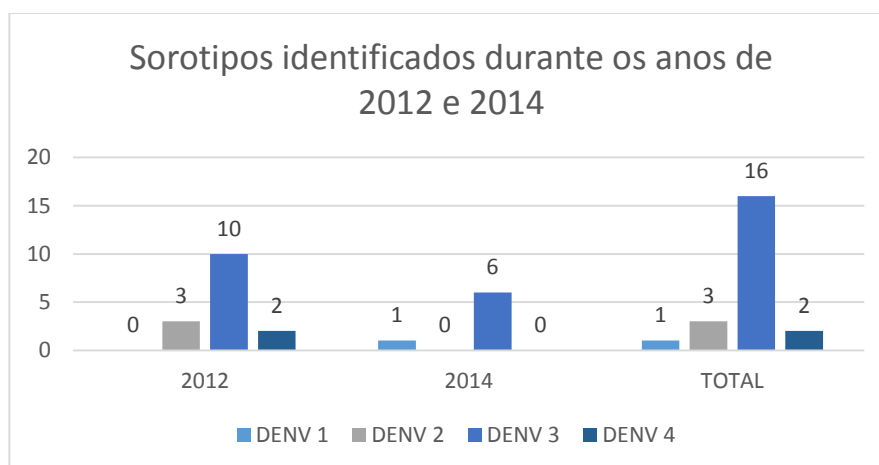


Figura 5. Representação gráfica dos sorotipos identificados em amostras provenientes dos anos de 2012, 2014 e o total nos dois anos analisados.

Durante o ano de 2012 o índice de positividade foi de 21,66%. Neste ano todas as análises foram feitas através da amplificação da região de junção dos genes *C/prM*, que ocorre em duas etapas, na primeira, o amplificado indica infecção por DENV independentemente do sorotipo, já na segunda, os produtos são sorotipo específicos. Apenas uma amostra não foi positiva na reamplificação. Ao longo do ano foram identificados os sorotipos DENV 2, DENV 3 e DENV 4. Em três amostras foram verificadas coinfeções, ou seja, a presença de mais de um sorotipo viral, sendo em duas a coinfeção pelos sorotipos DENV 3 e DENV 4 e em uma pelos sorotipos DENV 2 e DENV 3 (**Figura 6**).

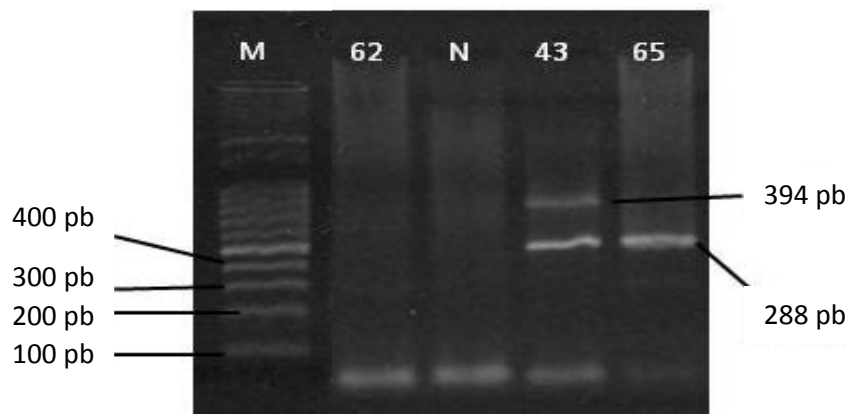


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da RT-PCR e controles positivos, utilizando os iniciadores sorotipo-específicos: D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 para amplificação do gene *C/prM*. A amostra 43 representa coinfeção pelos DENV 3 e 4.

No ano de 2014, 14,03% das amostras foram positivas por RT-PCR. As análises foram feitas através da amplificação de duas regiões, a região junto aos genes *C/prM* e o gene *E*. Ao contrário da primeira, em que a identificação do sorotipo só acontece após duas etapas, a reação de amplificação do gene *E* identifica o sorotipo em uma única etapa. Através da amplificação dos genes *C/prM* foram identificados dois sorotipos: DENV 1 e DENV 3, apenas uma amostra não foi positiva na reamplificação. As amplificações do gene *E* identificaram apenas o sorotipo DENV 1, amostras positivas para DENV 3 por amplificação de *C/prM*, não positivaram quando a região amplificada foi o gene *E*. Entretanto o sorotipo DENV 1 foi positivo pelas duas metodologias (**Figura 6**). Neste ano o sorotipo predominante foi o DENV 3, representando 85,71% do total de identificações, seguido do DENV 1 com 14,28% dos casos.

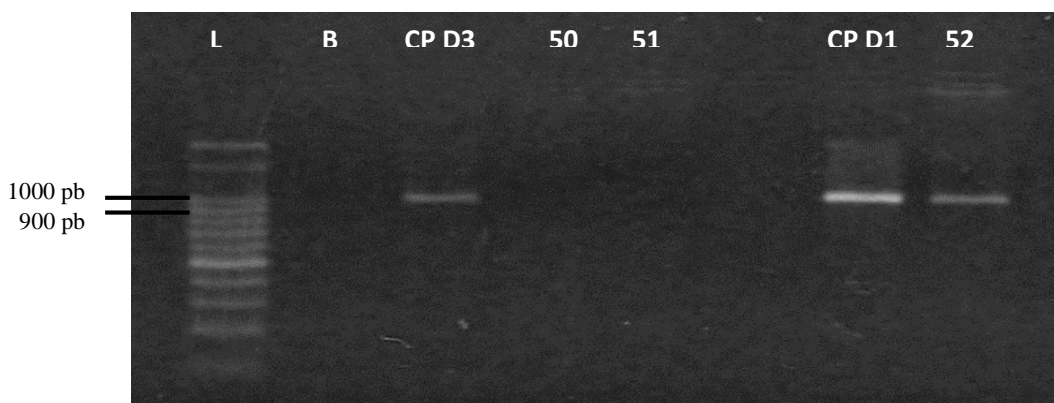


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos da RT-PCR e controles positivos, utilizando os iniciadores sorotipo-específicos: D13F/D14R (972 pb), DEN3 1EF/DEN3 2ER (1012 pb) para amplificação do gene *E*. As amostras 50 e 51 haviam positivado como DENV 3 na reação de amplificação dos genes *C/prM*, foram negativas pela amplificação do gene *E*, já a amostra 52 foi positiva para o DENV

l pelas duas metodologias. L: marcador de peso molecular de 100pb (Ludwing BIOTEC, BR); CP: controle positivo; B: branco.

Em relação a epidemiologia das amostras positivas por RT-PCR, verificamos que: o sexo feminino foi o mais acometido e a média de idade foi de 28,61 anos. Quanto a gravidade dos casos clínicos, a maioria das amostras positivas, 76,19%, apresentou sintomas característicos de dengue clássica, os mais relatados foram febre, cefaléia, mialgia e artralgia. Cinco pacientes, 23,80%, foram internados por apresentarem quadro de agravamento por dengue, destes, três evoluíram para cura e dois para óbito. Dos pacientes que sobreviveram, dois casos ocorreram em 2012, uma paciente do gênero feminino de 34 anos com complicações hemorrágicas e o outro, uma paciente do mesmo sexo de 42 anos no terceiro trimestre de gestação; o terceiro caso ocorreu em 2014 em uma criança de 8 anos que desenvolveu FHD. Quanto aos casos que evoluíram para óbito, ambos ocorreram em 2014, um em uma paciente do gênero feminino de 78 anos e o outro em um paciente do gênero masculino de 54 anos, neste último caso ocorreu uma manifestação menos comum da dengue, o acometimento neurológico, com paresia dos membros superiores e inferiores.

Considerando fatores como o sorotipo identificado e a gravidade do quadro clínico foram selecionadas cinco amostras para o sequenciamento. A descrição das mesmas está ilustrada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Descrição quanto as manifestações clínicas dos pacientes que sofreram hospitalizações por apresentaram quadro de agravamento por dengue.

Amostra	Ano	Idade	Manifestações clínicas	Evolução	Sorotipo
PI-32	2012	23	Febre, cefaleia, mialgia e artralgia	Cura	DENV 3 e DENV 4
*PI-43	2012	42	Febre, cefaléia, mialgia, artralgia, plaquetopenia, leucopenia	Cura	DENV 3 e DENV 4
PI-50	2014	78	Astenia, hipotensão, dor abdominal, plaquetopenia e leucopenia	Óbito	DENV 3
PI-51	2014	54	Mialgia, paresia dos membros superiores e inferiores	Óbito	DENV 3
PI-52	2014	8	Febre, cefaleia, mialgia, hemorragia conjuntival	Cura	DENV 1

*paciente no 3^a trimestre de gestação.

As amostras de 2014 identificadas como DENV 1 e DENV 3 ainda estão em análise, para o sequenciamento e construção das árvores filogenéticas. Para as amostras de 2012, na tentativa de obter resultados com a menor interferência possível, foram

sequenciados apenas os sorotipos DENV 4 das coinfeções. Priorizou-se este sorotipo em virtude da sua recente introdução no país e no Piauí.

Após o sequenciamento a partir da região de junção dos genes *C/prM*, as amostras de DENV 4 referentes ao ano de 2012 produziram uma sequência de 271 nucleotídeos cada uma (D4BR_PI_PI-32_2012 e D4BR_PI_PI-43_2012). Ao serem alinhadas através do BLAST, estas apresentaram 100% de homologia com as sequências das primeiras amostras brasileiras de DENV-4 depositadas no GenBank em 2011, sob números de acesso HQ822125 e JN559741. Ambas correspondem a amostras de Roraima, onde acredita-se que o vírus tenha sido introduzido no país.

Uma árvore filogenética foi produzida pelo método da Máxima Verossimilhança através programa PhyML versão 3.1 (**Figura 7**). Nesta, as amostras identificadas no Piauí agruparam-se dentro do genótipo II e formaram um subclado com outras amostras isoladas no Brasil, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Roraima, Pará e Amazonas, e em outros países americanos: Venezuela, Colômbia e Porto Rico, situados de acordo com a distribuição geográfica desse genótipo, que corresponde a Indonésia, Malásia, Thaiti, Caribe e Américas.

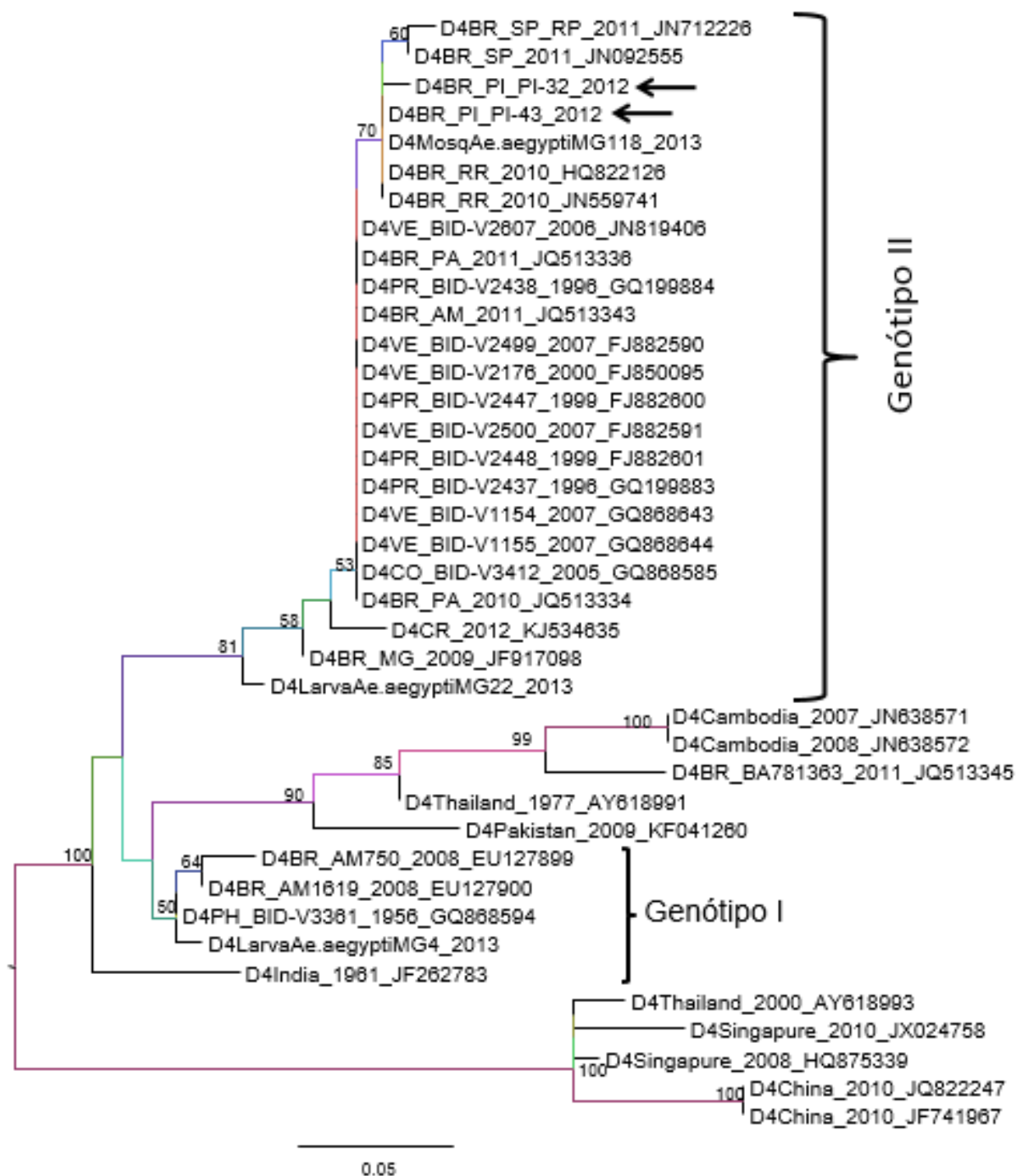


Figura 8. Árvore filogenética construída pelo método da Máxima Verossimilhança, mostrando a identificação do genótipo II para as amostras de DENV 4 identificadas no Piauí. A árvore foi construída através do programa PhyML v.3.1 segundo método TIM1 com sítio invariável estimado (TIM1ef+I) para DENV-4, selecionado pelo jModel Test.

6 DISCUSSÃO

A maioria das amostras analisadas neste estudo foi previamente submetida a testes sorológicos nas instituições parceiras. Estes métodos são os mais utilizados no diagnóstico de rotina da dengue, principalmente devido ao seu fácil manuseio e baixo custo. Entretanto são reconhecidamente menos específicos que os métodos moleculares (PEELING et al, 2010). Percebemos que os índices de positividade por esses métodos foram ligeiramente maiores que os obtidos por RT-PCR. Essa variação entre as metodologias pode ser atribuída por exemplo, ao período de coleta, como descrito por Santiago (2013), Huhtamo (2010) e Poersch (2004), em que os métodos diretos como a RT-PCR são mais eficientes durante o período de viremia. Após o quinto dia, os métodos mais úteis passam a ser os indiretos, como as sorologias para detecção do anticorpo IgM. Assim, amostras coletadas após o período de viremia podem ter dificultado sua confirmação por RT-PCR.

Outro fator interferente no diagnóstico molecular, diz respeito ao armazenamento e manipulação das amostras, pois o vRNA é muito sensível as alterações de temperatura e requer condições específicas de armazenamento a -70°C (TDR/WHO, 2009). Como esse método não faz parte das rotinas laboratoriais, os profissionais não estão habituados a manipular as amostras com o devido cuidado e isso acaba ocasionando a degradação do material genético, o que inviabiliza a reação. Barkham (2005) também relatou essa perda em seu estudo. Apesar disso, identificamos amostras positivas por RT-PCR que foram negativas pelas demais metodologias, o que reafirma a eficiência do método.

Uma consideração importante, é que os testes sorológicos podem apresentar falso-positivos devido a reatividade cruzada com outros flavivirus (GUZMAN et al, 2010). No Brasil, além do DENV e de surtos esporádicos de febre amarela (CÂMARA et al, 2013), outros flavivirus de importância médica tem sido identificados, como o *Saint Louis Encephalites virus* (SLEV), que recentemente teve seu primeiro genoma sequenciado a partir de uma amostra brasileira (VEDOVELLO et al, 2015), e o *West Nilo virus* (WNV), cujo primeiro caso do país foi identificado no Piauí em novembro de 2014 (WHO, 2014). Em virtude disso, consideramos possível que casos provocados por outros flavivirus, possam ser erroneamente diagnosticados com DENV, como foi relatado por Rocco (2005), em que um caso de SLEV no Estado de São Paulo foi confirmado por RT-PCR após sorologia inconclusiva para DENV.

As análises por RT-PCR foram positivas em 17,94% das amostras, resultados semelhantes (16,9%) foram descritos por Gurukumar (2009). Amplificamos duas regiões do genoma viral, a junção dos genes *C/prM* e o gene *E*. A primeira corresponde a metodologia de Lanciotti (1992), que é bem caracterizada e amplamente utilizada na tipagem viral. Apesar disso, alguns autores tem apontado resultados falso negativos pelo uso desse método (CHIEN et al, 2006; REYNES et al, 2003). A explicação está possivelmente nas alterações genômicas do DENV, que por ser um vírus de RNA está em constante processo de recombinação (STEINHAUER et al, 1992). Como o método já foi descrito a alguns anos, supõe-se que a região de anelamento dos iniciadores tenha sofrido mudanças em alguns vírus, o que impediria a amplificação do fragmento investigado na reação. Em nosso estudo o método foi capaz de identificar os quatro sorotipos virais, demonstrando que ainda é eficiente para os vírus circulantes na região. Ainda assim, podemos supor que sua viabilidade vem reduzindo ao longo dos anos a partir de observações em nosso laboratório.

A amplificação do gene *E* por sua vez, permite identificar mudanças recentes e acompanhar a evolução viral. Essa região possui a mais alta taxa de mutação entre os flavivirus, isso acontece por que ela interage diretamente com o sistema imune do hospedeiro e portanto sofre forte pressão evolutiva (DETTOGNI et al, 2011; CHEN et al, 2003). Assim as análises dessa região refletem melhor a dinâmica evolutiva do vírus. Sua principal desvantagem é que os iniciadores precisam ser frequentemente redesenhados, uma vez que essa região sofre mutações constantes. O fato foi descrito anteriormente para Lanciotti, os iniciadores muitas vezes perdem a complementariedade com os locais de ligação e isso impede que a reação aconteça. Essa dificuldade foi demonstrada em nosso estudo, quando percebemos que as amostras positivas para o DENV 3 pela amplificação de *C/prM* não positivavam em reações para o gene *E*. Acreditamos ser provável que as amostras circulantes atualmente no Estado, possuam mudanças em relação as sequencias analisadas para construção dos iniciadores. Isso é compreensível, uma vez que esses iniciadores foram desenhados por colaboradores no Estado de Minas Gerais, para amostras circulantes naquela região.

As características epidemiológicas apresentadas pelas amostras positivas por RT-PCR: sexo feminino mais acometido, média de idade de 28,61 anos e forma clínica predominante a doença branda; vão de encontro a outros estudos que descrevem esse padrão (CAVALCANTI et al, 2010; SIQUEIRA JR et al, 2011). Esses achados são semelhantes ao descrito para o cenário nacional, que por sua vez, reflete o padrão

epidemiológico das Américas, em que a doença se manifesta principalmente como dengue clássica em adultos jovens; diferentemente do Sudeste Asiático, em que predominam as formas graves da doença em lactentes e crianças (HALSTEAD, 2006). Ao longo dos anos o Brasil tem registrado um aumento no número de casos graves, principalmente em menores de 15 anos, padrão que se assemelha ao descrito para o Sudeste Asiático. Esse fato foi particularmente observado no país ao longo dos anos de 2007 e 2008, após a reintrodução do DENV 2 (BARCELOS FIGUEIREDO et al, 2014; TEIXEIRA et al, 2013). Essa mudança foi descrita em vários Estados brasileiros (CAVALCANTI et al, 2011; ROCHA & TAUIL, 2009; COSTA & FAÇANHA, 2008). No Piauí, Santos (2012) registrou que em 2007 o número de notificações em menores de 10 anos de idade, foi quase três vezes superior ao observado no ano anterior, com as formas graves da doença predominando nessa faixa etária. A principal justificativa para essa mudança, diz respeito ao acúmulo de imunidade contra os múltiplos sorotipos pelos adultos, o que torna as crianças a população susceptível após aqueles terem sido infectados e estarem imunes (TEIXEIRA et al, 2013; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al, 2011).

Embora a maioria dos casos tenha se desenvolvido com sintomatologia branda, foram observados cinco casos de internação decorrentes de agravamento por dengue. Destes, três evoluíram para cura e dois para óbito. Estes últimos aconteceram no ano de 2014, o que reflete o crescente aumento no número de casos graves e óbitos registrados no país. Segundo o Ministério da Saúde, neste mesmo ano o Piauí registrou três óbitos por dengue em comparação a um óbito no ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Dentre os pacientes que sobreviveram, dois pertenciam a grupos de risco para o desenvolvimento das formas severas. A primeira foi uma criança de 8 anos de idade que desenvolveu hemorragia conjuntival, o maior risco relacionado a esse grupo, tem sido atribuído a permeabilidade vascular aumentada nessa faixa etária (GUZMAN et al, 2010). O segundo caso foi uma mulher de 42 anos no terceiro trimestre de gestação, essa condição tem sido associada a complicações maternas e fetais. Machado (2013) descreveu um aumento da mortalidade em mulheres nessa situação. Leite (2014) em um estudo com gestantes no nordeste brasileiro, relatou um índice de 10,6% de infecção recentes e chamou atenção para outra condição de risco, que consiste na presença de anticorpos IgG no sangue materno e no cordão umbilical em mais de 95% dos casos. Isso leva a crer, que muitos recém nascidos possuem anticorpos anti-dengue transitórios de origem materna e

caso venham a adquirir a doença durante o primeiro ano de vida, esses anticorpos podem favorecer o agravamento da doença em função do fenômeno de ADE (VERHAGEN & GROOT, 2014).

Dos casos que evoluíram para óbitos, um correspondia a uma mulher de 78 anos que apresentou hipotensão grave, provavelmente decorrente do extravasamento plasmático característico dos casos de choque por dengue (GUZMAN & KOURI, 2002). E o outro, a um homem de 54 anos que desenvolveu uma manifestação menos comum da doença, o acometimento neurológico com paresia dos membros superiores e inferiores. Este foi inicialmente reportado com diagnóstico de dengue e com o surgimento das complicações, recebeu também o diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré. Esta doença se caracteriza como uma neuropatia inflamatória desmielinizante, que pode se desenvolver após infecções, sobretudo virais (ORSINI et al, 2010). Ferreira (2005) e Orsini (2010) também demonstraram a associação entre essa síndrome e a infecção por DENV. Embora os mecanismos ainda não sejam compreendidos, sabe-se que a relação entre as duas está na resposta imune, pois os mesmos mediadores inflamatórios são encontrados nas duas patologias (SULEKHA et al, 2004).

O Brasil está localizado em uma região hiperendêmica, onde atualmente circulam os quatro sorotipos virais (PIRES NETO et al, 2005). Como consequência disso, o país vem apresentando uma tendência ao aumento no número de casos graves e óbitos, já que a circulação de múltiplos sorotipos é um fator predisponente para o desenvolvimento de epidemias e formas severas (SIQUEIRA et al, 2011). Em reflexo ao cenário nacional, durante os dois anos analisados, nosso estudo identificou os quatro sorotipos virais no Estado do Piauí. Essa co-circulação também foi relatada por Bastos (2012) no Estado do Amazonas e Villabona-Arenas (2014) em São Paulo. Isso coloca o Piauí em situação de alto risco para o desenvolvimento das formas graves, é possível visualizar a confirmação dessa situação, quando considerarmos que em 2014 houve um aumento na incidência e na mortalidade no Estado quando comparadas ao ano anterior. Em 2013 foi registrada uma taxa de incidência de 139,9 casos por cem mil habitantes e um óbito, já em 2014 esses números foram de 189,1 casos por cem mil habitantes e três óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde a distribuição nacional dos sorotipos virais em 2014 foi a seguinte: o DENV 1 foi o mais prevalente, correspondendo a 83,3% dos casos identificados no ano, seguido do DENV 4 com 15,1%, do DENV 2 com 1,3% e por último do DENV 3 com 0,3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). No Piauí, neste mesmo ano,

identificamos os sorotipos DENV 1 e 3 e diferentemente no cenário nacional, o sorotipo mais prevalente foi o DENV 3 com 87,5% dos casos identificados ao longo daquele ano. Durante os dois anos analisados o DENV 3 representou 76,19% das amostras positivas, seguido do DENV 2 com 14,28%, do DENV 3 com 9,52% e DENV 1 com 4,76%. O que sugerimos é que um país de grandes proporções como o Brasil, apresenta variações no padrão de circulação viral ao longo do seu território, isso ocorre devido as dinâmicas de evolução e circulação do vírus.

Outro achado importante em nosso estudo são as coinfeções identificadas durante o ano de 2012, essa é uma situação característica de regiões hiperendêmicas como o Piauí, onde circulam vários sorotipos virais. No Brasil diversos estudos tem relatado infecções por mais de um sorotipo, como Bona (2012), Bastos (2012) e Figueiredo (2011). Outros países endêmicos como Taiwan (WANG et al, 2003) e Peru (MAMANI et al, 2008), também relatam casos de coinfeções.

O surgimento do DENV 4 em 2008 causou preocupação no país, haja vista que a presença de um sorotipo contra o qual a população não possui imunidade representa um risco acentuado para o número de infecções, incluindo os casos graves (TEMPORÃO, 2011). Através do sequenciamento da junção dos genes *C/prM*, identificamos que o DENV 4 circulante em amostras locais pertence ao genótipo II, em concordância com o cenário nacional que apontou esse achado em vários estudos (ACOSTA et al, 2011; SOUZA et al, 2011; NAVECA et al, 2012; NUNES et al, 2012). Embora esse seja o genótipo em ampla circulação no país, o genótipo I também foi identificado em casos isolados (NUNES et al, 2012; SOUZA et al, 2011) e em mosquitos em Manaus (FIGUEIREDO et al, 2013). Devido a dinâmica viral entendemos que um deles tende a se sobrepor sobre o outro, entretanto as evidências da circulação de dois genótipos aumentam ainda mais os riscos de desenvolvimento de epidemias e formas graves no país (ALLICOCK et al, 2012). Neste contexto destacamos a importância de estudos que identifiquem precisamente as linhagens virais e as mutações que possam resultar em aumento da virulência e transmissão, dessa maneira os eventos de dispersão e circulação podem ser melhor compreendidos (BONA et al, 2012; DRUMOND et al, 2012).

As amostras de DENV 4 analisadas neste estudo agruparam-se em um subclado do genótipo II, muito próximas as amostras identificadas em Roraima por Nunes (2012) e Acosta (2011), (HQ822125 e JN559741 respectivamente). Essas descrições correspondem aos primeiros depósitos de sequências do DENV 4 em amostras brasileiras. Além disso, também agruparam-se próximo a amostras identificadas em São Paulo,

Minas Gerais, Pará e Amazonas, o que reafirma a ideia de que após sua reintrodução em Roraima o vírus se dispersou para as demais regiões do país, como sugerido por Siqueira (2010). O genótipo I encontrado em casos isolados no país é apontado por sido introduzido através do Sudeste asiático (TEMPORÃO et al, 2011).

No mesmo subclado foram agrupadas ainda, diversas amostras da Venezuela e algumas de Porto Rico e da Colômbia, isso reforça a hipótese apontada por muitos autores, de que este vírus se originou no Caribe e chegou ao Brasil através de pelo menos três introduções, duas a partir da Venezuela para Roraima e uma da Colômbia para o Amazonas (SOUZA et al, 2011; NUNES et al, 2012). A rota Caribenha é conhecida como importante via de entrada de novos vírus na América do Sul e conseqüentemente no Brasil. Acredita-se que não somente o DENV 4, mas outros sorotipos e suas linhagens tenham sido introduzidos no país através dessa rota (NUNES et al, 2014; ARAÚJO et al, 2012).

A inserção de novos vírus é comumente descrita no Brasil pelas regiões Norte e Sudeste, entretanto Barcelos Figueiredo (2014) através de análises em amostras de DENV 2 que circularam no Piauí durante os anos de 2006 e 2007, sugeriu uma nova rota de entrada no país através deste Estado. Por meio de estudos filogenéticos os autores verificaram que essas amostras se agruparam muito próximas as isoladas no Rio de Janeiro, que é sugerido como o local entrada do vírus no país entre 2007 e 2008 (DRUMOND et al, 2013). No entanto as amostra identificadas no Nordeste já circulavam entre 2006 e 2007, o que levou a hipótese de que o vírus em questão, teria sido inserido na região Nordeste anteriormente a região Sudeste. Considerando a proximidade geográfica entre o Piauí e o Caribe e a importância da descoberta, destacamos aqui a necessidade de estudos em vigilância para detectar, caracterizar e traçar a evolução do DENV nessa região.

Concluimos que atualmente no Piauí circulam os quatro sorotipos virais, essa característica hiperendêmica coloca o Estado em situação de risco para o desenvolvimento de epidemias e formas graves da doença. O último sorotipo a ser introduzido foi o DENV 4 em 2011. Através de análises filogenéticas nós identificamos que as amostras de DENV 4 circulantes nesse período pertencem ao genótipo II, semelhantemente ao que é descrito em muitas regiões do país. O agrupamento dessas amostras juntamente com vírus da Venezuela, reforçam a hipótese mais difundida entre os autores, a de que este genótipo se originou no Caribe e possivelmente chegou ao Brasil através da Venezuela.

Diante disso, reforçamos a necessidade da vigilância epidemiológica contínua e dos estudos filogenéticos que monitorem a entrada e circulação dos DENV no Brasil, particularmente no Piauí, a fim de fornecer informações importantes sobre a disseminação, genética e evolução do vírus. A caracterização em genótipos virais, por sua vez, nos permite inferir que determinados vírus possam relacionar-se com uma maior propensão a epidemias e doença grave.

7 PERSPECTIVAS

Pretendemos revisar os iniciadores utilizados na amplificação do gene *E* para o sorotipo DENV 3, afim de conseguirmos viabilizar a reação. Insistimos na amplificação deste gene, porque além de prevermos a defasagem da amplificação dos genes *C/prM* com o passar dos anos, esperamos estabelecer os sequenciamentos das amplificações do gene *E*. Análises a partir dessa região são mais fiéis às amostras recentes e permitem acompanhar melhor a evolução viral, já que esse gene está em constante processo de mutação.

Esperamos também concluir as análises das amostras de DENV 1 e 3 amplificadas durante o ano de 2014, estas serão sequenciadas e árvores filogenéticas construídas, afim de reconhecermos os genótipos aos quais pertencem. A partir disso, todas as análises realizadas neste trabalho para o DENV 4, serão estendidas aos sorotipos DENV 1 e 3.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta PO, Maito RM, Granja F, Cordeiro Jda S, Siqueira T, Cardoso MN, Corado Ade L, Barletta-Naveca RH, Naveca FG. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1979-80; author's reply 1980-1.

Allicock OM, Lemey P, Tatem AJ, Pybus OG, Bennett SN, Mueller BA, Suchard MA, Foster JE, Rambaut A, Carrington CV. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2012 Jun;29(6):1533-43.

Alvarez DE, Lodeiro MF, Filomatori CV, Fucito S, Mondotte JA, Gamarnik AV, et al. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *Novartis Found Symp* 2006; 277: 12032; discussion 1325, 251-3.

Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 88692.

Anderson KB, Gibbons RV, Cummings DA, et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. *J Infect Dis* 2014; 209: 360–68.

Aquino VH, Anatriello E, Gonçalves PF, DA Silva EV, Vasconcelos PF, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vazquez C, Moran M, Figueiredo LT. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Oct;75(4):710-5.

Araújo JM, Bello G, Romero H, Nogueira RM. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1784.

Armstrong PM, Rico-Hesse R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2001 Summer;1(2):159-68.

Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med* 2010; 207: 793806.

Back AT, Lundkvist A. Dengue viroses – an overview. *Infect Ecol Epidemiol*. 2013 Aug 30;3.

Balmaseda A, Hammond SN, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:44956.

Barcelos Figueiredo L, Sakamoto T, Leomil Coelho LF, de Oliveira Rocha ES, Gomes Cota MM, Ferreira GP, de Oliveira JG, Kroon EG. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. *PLoS One*. 2014 Aug 15;9(8):e104516.

Barkham TM, Chung YK, Tang KF, Ooi EE. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Feb;100(2):142-8. Epub 2005 Oct 4.

Bastos Mde S, Figueiredo RM, Ramasawmy R, Itapirema E, Gimaque JB, Santos LO, Figueiredo LT, Mourão MP. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jun;45(3):393-4.

Bazan JF, Fletterick RJ. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* 1989; 171: 6379.

Berkowitz AL, Raibagkar P, Pritt BS, Mateen FJ. Neurologic manifestations of the neglected tropical diseases. *J Neurol Sci.* 2015 Feb 15;349(1-2):20-32

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013 Apr 25;496(7446):504-7

Biswas HH, Ortega O, Gordon A, Standish K, Balmaseda A, et al. Early Clinical Features of Dengue Virus Infection in Nicaraguan Children: A Longitudinal Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(3): e1562.

Bona AC, Twerdochlib AL, Navarro-Silva MA. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jun;45(3):297-300.

Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 81620.

Câmara FP, de Carvalho LM, Gomes AL (2013) Demographic profile of sylvatic yellow fever (SYF) in Brazil from 1973 to 2008. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 107(5): 324–327.

Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front Immunol.* 2014 Jun 17;5:290.

Cassetti MC, Halstead SB. Consultation on dengue vaccines: progress in understanding protection, 26-28 June 2013, Rockville, Maryland. *Vaccine.* 2014 May 30;32(26):3115-21.

Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jan;17(1):132-4.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990). *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44:649–688

Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In: Gubler DJ, Kuno G, eds. Dengue and dengue haemorrhagic fever. New York: CAB International. 1997

Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011 Sep;3(9):1562-608.

Chen W-J, Wu H-R, Chiou S-S (2003) E/NS1 modifications of Dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells. *Intervirology* 46:289–295

Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr;44(4):1295-304.

Chu JH, Chiang CC, Ng ML. Immunization of flavivirus West Nile recombinant envelope domain III protein induced specific immune response and protection against West Nile virus infection. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2699-705.

Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80: 1141831.

Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol*. 2005 Jan;79(2):853-9.

Costa CA, Façanha GP. [Dengue virus serotypes in children of Manaus, State of Amazonas, 2008]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Mar-Apr;44(2):249-51.

Deen, J.L., Harris, E., Wills, B., Balmaseda, A., Hammond, S.N., Rocha, C., Dung, N.M., Hung, N.T., Hien, T.T., Farrar, J.J., 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 368, 170–173.

Dettogni RS, Louro ID. Phylogenetic characterization of Dengue virus type 2 in Espírito Santo, Brazil. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):71-80.

Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Nov 23;96(24):13910-3.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain / lineage replacement. *Arch Virol*. 2012 Nov; 157 (11): 2061-73.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil : dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One*. 2013; 8 (3): e59422.

Edgar RC MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004 Mar 19;32(5):1792-7. Print 2004.

Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, dos Santos FB. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil:

molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2095.

Ferguson N, Anderson R, Gupta S. The effect of antibody-dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19;96(2):790-4.

Ferguson NM, Donnelly CA, Anderson RM. Transmission dynamics and epidemiology of dengue: insights from age-stratified sero-prevalence surveys. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354: 75768.

Ferreira GL. Global dengue epidemiology trends. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54 (Suppl 18):S5–S6.

Ferreira GP, Trindade GS, Vilela JM, Da Silva MI, Andrade MS, Kroon EG. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles. *J Microsc*. 2008 Jul;231(Pt 1):180-5.

Ferreira MLB, Cavalcanti CG, Coelho CA, Mesquita SD. Manifestações Neurológicas de Dengue: Estudo de 41 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63(2-B):488-93.

Figueiredo ML, Alfonso HL, Amarilla AA, Figueiredo LT, Aquino VH, Costa CA, Luz SL. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virol J*. 2013 Feb 19;10:60.

Figueiredo RM, Naveca FG, Oliveira CM, Bastos Mde S, Mourão MP, Viana Sde S, Melo Mdo N, Itapirema EF, Saatkamp CJ, Farias IP. Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011 Nov-Dec;53(6):321-3.

Franco L, Di Caro A, Carletti F, Vapalahti O, Renaudat C, Zeller H, Tenorio A. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Euro Surveill*. 2010 Feb 18;15(7). pii: 19490.

Gamarnik A. Role of the dengue virus 5' and 3' untranslated regions in viral replication. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research*. Norfolk, UK: Caister Press; 2010, pp. 5578.

García G, del Puerto F, Pérez AB, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Hum Immuno l* 2011; 72: 904–07.

Gubler D J. Dengue. in *Epidemiology of arthropod-borne viral diseases*. ed Monath T. P. (CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla), 1988 pp 223–260.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D J, Kuno G, editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York, N.Y: CAB International; 1997. pp. 1–22.

Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*. 2011 Dec;39(4 Suppl):3-11

Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 2002 Feb;10(2):100-3.

Gubler, DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jul;11(3):480-96.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010 May;59(3):307-21.

Guirakhoo F, Bolin RA, Roehrig JT. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* 1992; 191: 92131.

Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, Bhagat A, Singh A, Shah PS, Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* 2009 Jan 23;6:10.

Guzman M, Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002 Jan;2(1):33-42.

Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2014 Jan 31;385(9966):453-65.

Guzman MG, Sierra B, Kouri G, Farrar J, Simmons C. Host and virus determinants of susceptibility and dengue disease severity. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research.* Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010, pp. 79102.

Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol.* 1987 Nov 5;198(1):33-41.

Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev. Panam Salud Pública.* 2006; 20 (6): 407-15

Halstead SB. Epidemiology of Dengue and Dengue hemorrhagic fever. CAB International. In: Gubler DJ, Kuno G (eds) New York,1997 pp 23–44

Halstead, S.B. Dengue. *Lancet* 2007; 370: 1644-52.

Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(6):1063e70.

Hanna JN, Ritchie SA, Richards AR, Taylor CT, Pyke AT, Montgomery BL, Piispanen JP, Morgan AK, Humphreys JL. Multiple outbreaks of dengue serotype 2 in north Queensland, 2003/04. *Aust N Z J Public Health.* 2006 Jun;30(3):220-5.

Harris E, Roberts G, Smith L, et al. Typing of dengue virus in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2634–39.

Heinz FX, Allison SL. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res* 2003; 59: 6397.

Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci*. 1992 Apr;8(2):189-91.

Hilaire, G.M. et al. An analysis of the dengue fever infections in Barbados 2003-2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal Virology* 2008; 5:152, 2008

Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003 May;3(1):19-28.

Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol*. 1999 Mar;16(3):405-9.

Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. *J Clin Virol*. 2010 Jan;47(1):49-53.

Imrie A, Zhao Z, Bennett SN, Kitsutani P, Laille M, Effler P. Molecular epidemiology of dengue in the Pacific: introduction of two distinct strains of dengue virus type-1 [corrected] into Hawaii. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Jun;100(4):327-36.

Khor CC, Chau TN, Pang J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat Genet* 2011; 43: 1139–41.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004 Jun;5(2):150-63.

Kuno G, Chang GJJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol*. 1998 72, 73–83.

Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Rothman AL, Livingston PG, et al. Human immune responses to dengue viruses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1990; 21: 65862.

Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 2008; 82: 663143.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992 Mar;30(3):545-51.

Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 1997; 78: 2279–86.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994 Jan;75 (Pt 1):65-75.

Laughlin CA1, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, Fauci AS. Dengue research opportunities in the Americas. *J Infect Dis*. 2012 Oct 1;206(7):1121-7.

L'Azou M, Taurel AF, Flamand C, Quénel P. Recent epidemiological trends of dengue in the French territories of the Americas (2000-2012): a systematic literature review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov 6;8(11):e3235.

Leite RC, Souza AI, Castanha PM, Cordeiro MT, Martelli CT, Ferreira AL, Katz L, Braga C. Dengue infection in pregnancy and transplacental transfer of anti-dengue antibodies in Northeast, Brazil. *J Clin Virol*. 2014 May;60(1):16-21.

Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4738-47.

Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002; 186: 11658.

Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol* 2006; 19: 12732.

Lobigs M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 621822.

Machado CR, Machado ES, Rohloff RD, Azevedo M, Campos DP, de Oliveira RB, Brasil P. Is pregnancy associated with severe dengue? A review of data from the Rio de Janeiro surveillance information system. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 May 9;7(5):e2217.

Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 1996; 220: 23240.

Mamani E, Figueroa D, García MP, Garaycochea Mdel C, Pozo EJ. [Concurrent infections by two dengue virus serotypes during an outbreak in northwestern Peru, 2008]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010 Mar;27(1):16-21.

Manakkadan A1, Joseph I, Prasanna RR, Kunju RI, Kailas L, Sreekumar E. Lineage shift in Indian strains of Dengue virus serotype-3 (Genotype III), evidenced by detection of lineage IV strains in clinical cases from Kerala. *Virol J*. 2013 Jan 29;10:37.

Mangada MM, Rothman AL. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4- T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 2005; 175: 267683.

Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):564e81.

Mathew A, Townsley E, Ennis FA. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiol.* 2014 Mar;9(3):411-25.

McCall PJ, Lenhart A. Dengue control. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 79.

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe.* 2012 Oct 18;12(4):544-57.

Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e390.

Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e390.

Miller S, Romero-Brey I, Bartenschlager R. The dengue virus replication complex. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research.* Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010, pp. 3554.

Ministério da Saúde. Controle da dengue no Piauí, 2008.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências - 2010. Corresponde ao período de 27/06 a 3/07/2010.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004; 427: 3139.

Monteiro ESC, Coelho ME, Cunha IS, Cavalcante MAS, Carvalho FAA. Aspectos epidemiológicos e vetoriais da dengue na cidade de Teresina, Piauí – Brasil, 2002 a 2006. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 2009 18 (4): 365-374. ISSN 1679-4974.

Morita K, Meomoto T, Honda D, et al. Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1994; 44: 54–58

Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol.* 2013 Aug 20;5:299-309.

Naveca FG, Souza VC, Silva GA, Maito RM, Granja F, Siqueira T, Acosta PO. Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. *J Virol.* 2012 Feb;86(3):1897-8.

Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Oct;96(7):925-6.

Nogueira RM1, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990 Apr-Jun;85(2):253.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC Jr, Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2012 Nov;18(11):1858-64.

Nunes MR, Palacios G, Faria NR, Sousa EC Jr, Pantoja JA, Rodrigues SG, Carvalho VL, Medeiros DB, Savji N, Baele G, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF, Lipkin WI. Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 17;8(4):e2769.

Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12 (6): 887-93.

Orsini M, Freitas MRG, Nascimento OJM, Catharino MAS, Mello MP, Reis CHM, Carvalho RW. Síndrome de Guillain-Barré pós infecção por dengue: Relato de caso. *Ver Neurocienc* 2010; 18(1): 24-27.

Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4.

Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983 Jan-Feb;25(1):53-4.

Padmanabhan R, Strongin AY. Translation and processing of the dengue virus polyprotein. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research*. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2010, pp. 1334.

Parida, M.M. et al. Rapid and real-time detection technologies for emerging viroses of biomedical importance. *J. Biosci*. 33 617-628, 2008.

Patil JA , Cherian S , Walimbe AM , Bhagat A , Vallentyne J , KAKADE M , Shah PS , Cecilia D . Influência dos eventos evolutivos no subcontinente indiano na filogeografia de dengue tipo 3 e 4 vírus. *Infect Genet Evol*. 2012 Dec; (8) 12: 1759-1769.

Peeling, RW; Artsob, H; et al. Evolution of diagnostic tests: dengue. *Nature*, 2010

Perez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vazquez S, Cabrera MV, et al. IL-10 levels in dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* 2004; 73: 2304.

Pethel M, Falgout B, Lai CJ. Mutational analysis of the octapeptide sequence motif at the NS1-NS2A cleavage junction of dengue type 4 virus. *J Virol* 1992; 66: 722531

Pires Neto RJ, Lima DM, de Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BA. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jun;38(6):843-52. Epub 2005 Jun 1.

Poersch CO , Pavoni DP , Queiroz MH , de Borba L , S Goldenberg , dos Santos CN , Krieger MA . Dengue infecções por vírus: comparação de métodos para diagnosticar a doença aguda. *J Clin Virol.* 2005 Apr; 32 (4): 272-7.

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008 Jul;25(7):1253-6.

Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, Buekens P 2010. Maternal dengue and pregnancy outcomes a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 65: 107–18.

Rambaut, A. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. *FigTree.* 2007.

Reynes JM, Ong S , C Mey , Ngan C , Hoyer S , Sall AA . Detecção molecular Melhoria do sorotipo 1 variantes do vírus da dengue. *J Clin Microbiol.* agosto de 2003; 41 (8): 3864-7.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997; 230: 244-51.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 1990 Feb;174(2):479-93.

Rocco IM , Santos CL , Bisordi I , Petrella SM , Pereira LE , Souza RP , Coimbra TL , Bessa TA , Oshiro FM , Lima LB , Cerroni MP , Marti AT , Barbosa VM , Katz G , Suzuki A . St. Louis vírus da encefalite: primeiro isolamento de um ser humano no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2005 Set-Out; 47 (5): 281-5. Epub 16 de novembro de 2005.

Rocha ES, Oliveira JG, Santos JR, Rodrigues GO, Figueiredo LB, Pessanha JE, Proietti FA, Fonseca FG, Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Recombinant envelope protein-based enzyme immunoassay for IgG antibodies is comparable to neutralization tests for epidemiological studies of dengue infection. *J Virol Methods.* 2013 Jan;187(1):114-20.

Rocha LA, Taail PL. [Dengue in children: clinical and epidemiological characteristics, Manaus, State of Amazonas, 2006 and 2007]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009 Jan-Feb;42(1):18-22.

Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jan 4;5(1):e935.

Rodriguez-Roche R, Hinojosa Y, Guzman MG. First dengue haemorrhagic fever epidemic in the Americas, 1981: insights into the causative agent. *Arch Virol*. 2014 Dec;159(12):3239-47.

Rosario D, Alvarez M, Díaz J, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Pan Am J Public Health* 1998; 4: 1–5.

Rosenthal A, Coutelle O, Craxton M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res*. 1993 Jan 11;21(1):173-4.

Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 1999; 257: 16.

Runge-Ranzinger S1, McCall PJ, Kroeger A, Horstick O. Dengue disease surveillance: an updated systematic literature review. *Trop Med Int Health*. 2014 May 28.

Salonen A, Ahola T, Kaariainen L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 285: 13973.

San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckenoghe A, et al. (2010) The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82: 128–135

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.

Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, Medina F, Colón C, Margolis H, Muñoz-Jordán JL. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Jul 11;7(7):e2311.

Santos LS. Vigilância Epidemiológica do Dengue vírus nos anos de 2006-2012, no Estado do Piauí: Tipagem molecular para busca dos sorotipos atualmente circulantes. 22 de março de 2013. Dissertação - Universidade Federal do Piauí.

Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Dec;61(6):994-1000.

Schatzmayer HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa. An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 8 (1986), pp. 245–246.

Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 1987; 68: 8537.

Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Vol. 45 Nº19, 2014

Secretaria de Vigilância em Saúde. Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 26 de 2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

SESAPI. Plano de Contingência da Dengue: Estado do Piauí – 2010. Secretaria de Saúde do Estado do Piauí, 2010.

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84(2):200–207.

Siqueira Jr JB, Vinhal LC, Said RFC, Hoffmann JL, Martins J, Barbiratto SB, Coelho GE. Dengue no Brasil: tendências e mudança na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. Ministério da Saúde, 2011.

Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumioto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky Mdo C, Santos CL. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Dec;5(12):e1439.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 1997; 71: 8475–81.

Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 1992 Dec 15;122(2):281–8.

Sulekha C, Kumar S, Philip J. Guillain-Barre Syndrome following Dengue Fever: Report of 3 Cases. *Ind Ped* 2004;41:948–50.

Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: na update. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012 10(8), 895–907

Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008 Oct;14(10):1663.

Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Dec 19;7(12):e2520.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011 May;17(5):938–40.

Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2002 Aug;Chapter 2:Unit 2.3.

Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, Lloyd G, Holmes EC. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology.* 2002 Jun 20;298(1):63–72.

Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology* 2007; 358: 40212.

Vasilakis N. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, Bangkok, Thailand 2013.

Vedovello D, Drumond BP, Marques RE, Ullmann LS, Fávoro EA, Terzian AC, Figueiredo LT, Teixeira MM, Junior JP, Nogueira ML. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. *Arch Virol*. 2015 Mar 5.

Verhagen LM, de Groot R. Dengue in children. *J Infect*. 2014 Nov;69 Suppl 1:S77-86.

Villabona-Arenas CJ, de Oliveira JL, Capra Cde S, Balarini K, Loureiro M, Fonseca CR, Passos SD, Zanotto PM. Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Feb 27;8(2):e2620.

Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci*. 2013 Jun 13;20:37.

Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 2000; 74: 322734.

Wang WK, Chao DY, Lin SR, King CC, Chang SC. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003 Jun;36(2):89-95.

Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):523-40.

Whitehead, S.S. et al. Prospects for a Dengue virus vaccine. Nature Publishing Group, 2007.

Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine*; 2011, 29: 72218.

WHO TDR Global Alert and Response Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever [webpage on the Internet]. Geneva: World Health Organization (WHO); 2013 [cited March 3, 2013]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>.

WHO. Global Alert and Response (GRA). West Nile virus – Brasil 15 de December 2014 [Acesso em: 14 de março de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/15-december-2014-wnv/en/>.

WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020. Geneva: WHO Press; 2012.

WHO. Travel and Health: Situation as on January 2012 (World Health Organization, 2012).

Yang KD, Wang CL, Shaio MF. Production of cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis* 1995; 172: 6045.

Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev SV, Sedlak D, et al. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 2003; 22: 260413.

Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HA, Chandanayingyong D, et al. T cell responses to an HLA-B*07- restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol* 2002; 168: 595965.