

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de  
2010 a 2011

Adriana Moreira Soares

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de  
2010 a 2011

Dissertação de mestrado apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em Biociências  
Aplicadas à Farmácia para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências  
Aplicadas à Farmácia

**Orientada:** Adriana Moreira Soares

**Orientador:** Prof. Dr. Victor Hugo Aquino  
Quintana

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06/06/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moreira Soares, Adriana

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011. Ribeirão Preto, 2014.

75p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

1. Dengue. 2. Epidemiologia. 3. Filogenia. 4. Evolução.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Moreira Soares

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai Celso José Soares, minha mãe Aparecida Bordim Moreira Soares e ao meu irmão André Fernando Moreira Soares.

## AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais que acreditaram e me permitiram viver esse sonho, sempre me apoiando e não me deixando desanimar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Victor Aquino Quintana que me aceitou, acreditou em mim e me orientou da melhor forma possível.

Ao meu colega de trabalho Alberto Anastacio Amarilla Ortiz pela paciência e dedicação por todos os ensinamentos e conselhos e a sua esposa Helda Liz com a ajuda e orientação.

Aos meus irmãos de coração Aníbal e Raquel que sempre estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis e também, nos momentos mais felizes de descanso e divertimento.

Aos companheiros de laboratório do dia a dia: Aline, Amanda, Lélis, Jaseen, Vanessa, Veridiana, Telma, Nilton, Nicole, Gabriela, Sabrina e Fábio pelo companheirismo.

Ao meu irmão André que mesmo de longe sempre me apoiou.

Aos amigos Camélia, Rafael, Paula e Gustavo que me ajudaram a não desistir dos meus objetivos com sua amizade e companheirismo.

As amigas de Brasília Elisa, Manuela, Ariadne, Flávia e Bárbara que sempre me acompanharam e ajudaram mesmo distantes.

A agência de fomento FAPESP por ter financiado este projeto.

Aos professores, funcionários e alunos do Centro de Pesquisa em Virologia pela amizade e pelo uso da infraestrutura.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por ter fornecido toda a estrutura necessária para a realização deste projeto.

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;  
é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)*

## RESUMO

SOARES, A. M. **Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011.** 2014. 75f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e transmitida principalmente pela picada de mosquitos *Aedes aegypti*. A dengue é a doença viral transmitida por artrópodes de maior importância em saúde pública, afetando principalmente a países tropicais e subtropicais do mundo. As epidemias de dengue têm aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo e as fronteiras de circulação do vírus vem se expandido constantemente. Assim, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre esta ameaça. Neste sentido, é importante que algumas análises, como as filogenéticas e evolutivas dos vírus sejam realizadas para identificação dos genótipos circulantes, a origem dos mesmos, o relacionamento com outros subtipos e a evolução sofrida ao longo do tempo. Este estudo teve por objetivo analisar o relacionamento filogenético e evolutivo dos DENV isolados em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. Amostras de soro (n=79) de pacientes com dengue estocadas a -80°C foram inoculadas em células C6/36 para tentativa de isolamento viral, o qual foi confirmado a partir de 39 amostras por imunofluorescência indireta e/ou RT-PCR em tempo real. Sequenciamento de parte do gene da proteína viral NS5 ou do gene da proteína E mostrou que 25 pertenciam ao DENV-1, seis ao DENV-2 e oito ao DENV-3. Para as análises filogenéticas e evolutivas, o gene da proteína E de 15 DENV-1, quatro DENV-2 e um DENV-3 foi sequenciado. Estas análises foram realizadas também utilizando toda a região codificadora de dois DENV-1, um DENV-2 e um DENV-3. As análises mostraram que todos os vírus introduzidos em Ribeirão Preto foram provenientes de vírus originados no Estado do Rio de Janeiro. Duas linhagens de DENV-1, uma de DENV-2 e uma de DENV-3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. O relacionamento filogenético dos vírus foi similar independentemente do uso da sequência do gene da proteína E ou de toda a região codificadora.

**Palavras chave:** Dengue, epidemiologia, filogenia, evolução, Ribeirão Preto.



## ABSTRACT

SOARES, A. M. **Molecular characterization of dengue virus isolated in Ribeirão Preto in 2010 and 2011.** 2014. 75f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Dengue is an infectious disease caused by dengue virus (DENV) and transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes. Dengue is the viral disease transmitted by arthropods of greater importance in public health, particularly affecting the tropical and subtropical countries of the world. Dengue epidemics have increased considerably in recent years throughout the world and the borders of virus circulation have been expanding constantly. Thus studies of different aspects of the disease and the virus are of great importance to improve knowledge about this threat. In this sense, it is important that some analyzes such as phylogeny and evolution be carried out to identify the circulating genotypes, their origin, their relationship with other subtypes and evolution along the time. This study aimed to analyze the phylogenetic and evolutionary relationships of DENV isolated in Ribeirão Preto between 2010 and 2011. Serum samples (n = 79) of dengue patients stored at -80°C were inoculated into C6/36 cells for virus isolation attempts, which was confirmed from 39 samples by indirect immunofluorescence and/or real-time RT-PCR. Sequencing of part of the viral NS5 gene protein or the E gene protein showed that 25 belonged to DENV-1, six to DENV-2 and eight to DENV-3. For the phylogenetic and evolutionary analyzes, the E gene protein of 15 DENV-1, four DENV-2 and one DENV-3 was sequenced. These analyzes were also carried out with the entire coding region of two DENV-1, one DENV-2 and one DENV-3. The analysis showed that all viruses were introduced in Ribeirão Preto from viruses originated in the state of Rio de Janeiro. Two lineages of DENV-1, one of DENV-2 and one of DENV-3 circulated between 2010 and 2011. The phylogenetic relationship of these viruses was similar regardless of the use of the E gene protein or the entire coding region sequences.

**Keywords:** Dengue, epidemiology, phylogeny, evolution, Ribeirão Preto.

## RESUMEN

SOARES, A. M. **Caracterización molecular de los virus del dengue aislados en Ribeirao Preto entre 2010 y 2011.** 2014. 75f. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto – Universidad de San Pablo, Ribeirão Preto, 2014.

El dengue es una enfermedad infecciosa causada por el virus del dengue (DENV) y transmitida principalmente por la picada de mosquitos *Aedes aegypti*. El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en salud pública, afectando principalmente a países tropicales y subtropicales del mundo. Las epidemias de dengue han aumentado considerablemente en los últimos años en todo el mundo y las fronteras de circulación del virus se encuentran en constante expansión. De esta forma, estudios de diferentes aspectos de la enfermedad y del virus son de gran importancia para perfeccionar los conocimientos sobre esta amenaza. Por lo tanto, es importante que algunos análisis, como las filogenéticas y evolutivas del virus sean realizadas para identificación de los genotipos circulantes, el origen de los mismos, el relacionamiento con otros subtipos y la evolución sufrida a lo largo del tiempo. Este estudio tuvo por objetivo analizar el relacionamiento filogenético y evolutivo de los DENV aislados en Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. Muestras de suero (n=79) de pacientes con dengue almacenados a -80°C fueron inoculadas en células C6/36 para tentativa de aislamiento viral, el cual fue confirmado a partir de 39 muestras por inmunofluorescencia indirecta y/o RT-PCR en tiempo real. Secuenciación de parte del gen de la proteína viral NS5 o del gen de la proteína E mostró que 25 pertenecían al DENV-1, seis al DENV-2 e ocho al DENV-3. Para las análisis filogenéticas y evolutivas, el gen de la proteína E de 15 DENV-1, cuatro DENV-2 e un DENV-3 fue secuenciado. Estas análisis fueron realizadas también utilizando toda la región codificadora de dos DENV-1, un DENV-2 e un DENV-3. Las análisis mostraron que todos los virus introducidos en Ribeirão Preto fueron provenientes de virus originados en el Estado do Río de Janeiro. Dos linajes de DENV-1, un de DENV-2 y un de DENV-3 circularon en Ribeirao Preto entre 2010 e 2011. El relacionamiento filogenético de los virus fue similar independientemente del uso de la secuencia del gen de la proteína E o de toda la región codificadora.

**Palabras clave:** Dengue, epidemiología, filogenia, evolución, Ribeirão Preto.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Aedes aegypti*. Fonte: [http://phil.cdc.gov/PHIL\\_Images/9254/9254\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/9254/9254_lores.jpg)..... 3
- Figura 2. Estrutura esquemática da partícula viral. RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. Fonte: <http://viralzone.expasy.org/>..... 4
- Figura 3. Genoma do vírus da dengue. Fonte: (22)..... 4
- Figura 4. Ciclo de multiplicação viral. O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promove mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no *lumen* do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (27). ..... 6
- Figura 5. Efeito citopático observado em células C6/36. A: monocamada de células C6/36 sem infecção. B: Efeito citopático observado na monocamada de células C6/36 pós-infecção. .... 17
- Figura 6. Confirmação do isolamento em células C6/36 pelo método de imunofluorescência indireta. (A) Células não infectadas e (B) células infectadas com DENV de uma das amostras de soro dos pacientes. .... 18
- Figura 7. Confirmação do isolamento das amostras por RT-PCR em tempo real. (A) Pico de melting da amostra negativa e (B) pico de melting da amostra positiva ( $T_m \sim 80^\circ\text{C}$ ). ..... 20
- Figura 8. Exemplo de análise de identidade de uma das amostras analisadas com o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). ..... 22
- Figura 9. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína NS5. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos de parte do gene da proteína NS5. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 6 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 7 se encontra o controle negativo. .... 31
- Figura 10. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E utilizando os par de primers D1s3 e D1a17 para DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular, nas colunas 2 a 4 os produtos de amplificação dos vírus isolados das amostras 64, 65 e 66 e na coluna 5 o controle negativo. .... 32

- Figura 11. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 10 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 11 se encontra o controle negativo. .... 34
- Figura 12. Alinhamento das sequências de DENV-1 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E. .... 34
- Figura 13. Alinhamento das sequências de DENV-2 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E. .... 35
- Figura 14. Alinhamento da sequências de DENV-3 isolada neste estudo com uma cepa isolada no Brasil de DENV-3 mostrando a posição 1 e 1479 do gene da proteína E. .... 35
- Figura 15. Identidade entre sequências de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto. .... 36
- Figura 16. Identidade entre as sequências de DENV-2 isoladas em Ribeirão Preto. .... 37
- Figura 17. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio. “●” isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto. .... 39
- Figura 18. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-2 em Ribeirão Preto (os quatro isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio. .... 41
- Figura 19. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio. .... 43
- Figura 20. Árvore filogenética dos vírus do genótipo V de DENV-1. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente. .... 45
- Figura 21. Árvore filogenética dos vírus do genótipo IV de DENV-2. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente. .... 47

- Figura 22. Árvore filogenética dos vírus do genótipo III de DENV-3. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente .....49
- Figura 23. Representação das cinco regiões sobrepostas amplificadas para a montagem de todo o genoma viral de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, os primers utilizados para a amplificação e o tamanho dos fragmentos. ....51
- Figura 24. Análise da amplificação por RT-PCR do genoma completo de DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos cinco fragmentos sobrepostos do genoma completo de um dos isolados de DENV-1. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 5 os cinco fragmentos. ....51
- Figura 25. Identidade entre as sequências do genoma completo de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo V. ....52
- Figura 26. Identidade entre a sequência do genoma completo de DENV-2 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo IV. ....53
- Figura 27. Identidade entre a sequência do genoma completo de DENV-3 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo III. ....54
- Figura 28. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto (os dois isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio .....55
- Figura 29. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-2 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio. ....57
- Figura 30. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ( $G=1$ ). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio. ....58

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Amostras de soro dos pacientes com infecção pelo DENV. ....	15
Tabela 2. Primers que foram utilizados para a RT-PCR e sequenciamento do genoma dos vírus. Os primers sense estão indicados com a letra “S” no nome, e os primers antisense com a letra “A” ou com a letra “C” no nome. ....	21
Tabela 3. Quantidade de DNA necessária para sequenciamento de acordo com o tamanho do amplicon. ....	22
Tabela 4. Primers que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-1 e -2. Os primers sense estão indicados com a letra “s” no nome, e os primers antisense com a letra “a” no nome.....	24
Tabela 5. Primers que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-3. Os primers sense estão indicados com a letra “F” no nome, e os primers antisense com a letra “R” no nome (87).....	26
Tabela 6. Resultado da tentativa de isolamento viral das 79 amostras de soro inoculadas em células C6/36. ....	29
Tabela 7. Sorotipo dos 39 vírus isolados neste estudo. ....	33
Tabela 8. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo V de DENV-1.....	46
Tabela 9. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dentro dos cepas do genótipo IV de DENV-2.....	48
Tabela 10. Taxa de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo III de DENV-3.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMR	Ancestral comum mais recente
ADE	do inglês <i>Antibody-dependent enhancement</i>
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
RNA	Ácido Ribonucleico
<i>col.</i>	Colaboradores
DENV	Vírus da dengue
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DC	Células dendríticas
d.C.	Depois de Cristo
EUA	Estados Unidos da América
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FITC	do inglês Fluorescein Isotiocianate
hLRT	do inglês <i>hierarchical likelihood ratio test</i>
IFA	Imunofluorescência indireta
L-15	Meio de cultivo Leibovitz
M	Molar
μL	Microlitros
mM	Milimolar
ND	Não determinado
NJ	Do inglês <i>Neighbor-joining</i>
NS1	Proteína não estrutural 1
NS5	Proteína não estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	do inglês <i>Polimerase chain reaction</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNC	Região não codificadora
RT-PCR	del inglés <i>Reverse transcriptase polimerase chain reaction</i>
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
PFU	Unidades formadoras de placas
UTRs	Do inglês <i>Untranslated regions</i>
WHO	do inglês World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Dengue.....	1
1.2 Breve histórico da doença.....	1
1.3 Vetor e ciclo de transmissão.....	2
1.4 Vírus da dengue – Características da partícula viral .....	4
1.5 Ciclo de replicação viral .....	5
1.6 Vírus da dengue – Sorotipos e Genótipos .....	6
1.7 Manifestações clínicas.....	8
1.8 Diagnóstico laboratorial da dengue .....	9
1.9 Prevenção e controle da doença .....	9
1.10 Epidemiologia da dengue .....	10
1.10.1 Situação da dengue no Brasil.....	10
1.10.2 Situação da dengue em Ribeirão Preto .....	12
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 Objetivo geral .....	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1 Soro de pacientes .....	15
4.2 Isolamento viral .....	17
4.3 Confirmação do isolamento viral .....	18
4.3.1 Imunofluorescência indireta (IFA) .....	18
4.3.2 RT-PCR em Tempo Real.....	18



4.3.2.1 Extração do RNA viral .....	18
4.3.2.2 RT-PCR em Tempo Real.....	19
4.4 Caracterização molecular .....	20
4.4.1 Síntese de cDNA .....	20
4.4.2 Identificação do sorotipo viral.....	20
4.4.3 Sequenciamento do gene da proteína E.....	23
4.4.4 Sequenciamento do genoma completo .....	23
4.5 Análises filogenéticas e evolutivas.....	27
4.5.1 Base de dados de sequências do <i>GenBank</i> .....	27
4.5.2 Análises filogenéticas .....	27
4.5.3 Análise de distância ou divergência evolutiva e de identidade .....	27
4.5.4 Taxa evolutiva e tempo de divergência .....	28
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
5.1 Isolamento viral a partir das amostras de soro .....	29
5.2 Caracterização dos vírus isolados.....	31
5.2.1 Identificação do sorotipo viral.....	31
5.2.2 Sequenciamento do gene da proteína E.....	34
5.2.3 Análise de identidade, filogenia e evolução dos vírus isolados baseados na sequência do gene da proteína E .....	35
5.2.3.1 Análise de identidade entre as sequências.....	35
5.2.3.2 Análises filogenéticas .....	38
5.2.3.3 Taxa evolutiva e tempo de divergência .....	44
5.2.4 Sequenciamento de toda região codificadora do genoma viral .....	50
5.2.5 Análises de identidade e filogenia baseadas na região codificadora do genoma viral ....	52
5.2.5.1 Análise de identidade .....	52
5.2.5.2 Análise filogenética .....	54
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV): DENV-1, -2, -3 e -4. Trata-se de uma entidade nosológica de notificação compulsória caracterizada por epidemias sazonais que em condições ambientais favoráveis pode apresentar comportamento endêmico com aumento sazonal como ocorre atualmente no Brasil. A infecção com o DENV pode ser assintomática ou levar a quadros clínicos que variam desde uma febre indeterminada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves da doença denominados febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). Em 2009, a Organização Mundial da Saúde propôs uma nova classificação dos casos de dengue, a qual agora é dividida em: dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave (1). Cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, sendo que aproximadamente 550.000 casos requerem hospitalização, com cerca de 3,64% de óbitos (1). Nas áreas tropicais das Américas houve uma dramática reemergência de epidemias de dengue, e a partir da década de 80 surgiram relatos das formas mais graves da doença. O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos, principalmente *Aedes aegypti*, porém, outros mosquitos como *A. albopictus* e *A. Africanus* têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente. O número de nações e pessoas afetadas tem aumentado progressivamente e hoje a dengue é considerada a arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo.

## 1.2 Breve histórico da doença

Os relatos mais antigos de uma doença possivelmente causada pelo vírus da dengue encontram-se em enciclopédias chinesas da dinastia Chin (265 a 420 d.C.) onde a doença é descrita como “veneno da água” e associada a insetos voadores, da dinastia Tang (610 d.C) época em que os escritos foram formalmente editados e da dinastia *Northern Sung* no ano 992 d.C (2). O vírus da dengue também pode ter sido o causador de surtos de doença febril aguda que ocorreram no século XVII em ilhas a oeste do oceano Pacífico e no Panamá, bem como das epidemias registradas em Jacarta, Indonésia e Egito no século XVIII, época em que a doença já apresentava uma distribuição global (3).

O DENV foi isolado pela primeira vez em 1943 por Susumo Hotta durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão (4), sendo a doença reconhecida como entidade clínica a partir de 1779 (5). A dengue é conhecida nas Américas desde o século XVIII, sendo que a primeira descrição de epidemia foi feita por BENJAMIM RUSH em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América (EUA). Pouco se sabia sobre a etiologia e transmissão da doença até o século XX. Um dos primeiros estudos realizados neste sentido foi conduzido por ASHBURN & CRAIG, oficiais das forças armadas dos EUA, em 1906 (6). Estes pesquisadores mostraram conclusivamente que a FD era causada por um agente filtrável, mostrando que protozoários e bactérias não estavam envolvidos. Alguns indivíduos imunes não se infectavam e a doença não era contagiosa. O marco da reemergência da dengue nas Américas foi a introdução do DENV-1 em 1977 e, já na década de 1980, países como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru, que não tinham experimentado a dengue ou estavam livres da doença durante várias décadas, foram afetados pela explosão de epidemias causadas pelo DENV-1. Cuba, em 1981, registrou a primeira maior epidemia de FHD nas Américas com um total de 344.203 casos notificados dos quais 10.312 foram classificados como graves. Houve 116.143 hospitalizações, 158 óbitos e custos que excederam a cifra dos US\$ 103 milhões (7). Esta epidemia de FHD cubana foi associada à introdução de um novo genótipo de DENV-2 mais virulento (REFERENCIA). O controle da epidemia foi alcançada pela erradicação do *A. aegypti* da ilha que se tornou livre da dengue até 1997, quando nova epidemia afetou a província de Santiago, onde foram notificados 2.946 casos dos quais 205 eram FHD com 12 mortes. A FHD em Cuba foi o evento histórico mais importante da dengue nas Américas. Entre os fatores que contribuíram para a emergência da FD/FHD, podem ser incluídos o rápido crescimento populacional e urbanização da América Latina e Caribe, o aumento do número de pessoas se deslocando geograficamente, facilitando a disseminação da virose, a circulação dos quatro sorotipos nas Américas, gerando um estado de hiperendemicidade aumentando o risco de FHD e a pouca eficiência dos programas de controle do vetor.

### 1.3 Vetor e ciclo de transmissão

Os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes africanus*) desempenham um papel importante na transmissão do vírus da dengue. Embora o principal vetor seja o *A. aegypti* (Figura 1), o *A. albopictus* e *A. polynesiensis* também podem atuar como vetores, dependendo da localização geográfica (8-10).



Figura 1. *Aedes aegypti*. Fonte: [http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/9254/9254\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/9254/9254_lores.jpg).

Os mosquitos transmissores podem ser encontrados em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. São encontrados no ambiente urbano e, principalmente, dentro das casas. Isso maximiza o contato homem-vetor e minimiza o contato com inseticidas pulverizados fora das casas, o que dificulta o controle deste vetor (11).

O mosquito se reproduz na água parada de pequenos reservatórios como pneus, vasos de plantas ou qualquer local onde acumule água. Os ovos podem sobreviver por longos períodos de tempo, uma vez que são capazes de resistir à dessecação. A disposição inadequada do lixo ou drenagem inadequada das águas residuais, consequências da urbanização não planejada, pode ser responsável por altas densidades do mosquito em áreas endêmicas (9).

Aumentos significativos nas populações de larvas do mosquito são vistos durante a estação chuvosa. Esta pode ser uma razão pela qual as epidemias de dengue tendem a coincidir com a época das chuvas (12).

Durante o repasto sanguíneo em um humano infectado, a fêmea adulta do mosquito ingere o sangue contaminado com vírus da dengue. Primeiro, o vírus replica-se no intestino médio, atinge a hemocele e a hemolinfa, e, em seguida, obtém acesso aos diferentes tecidos do inseto. Após a replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus para outro ser humano.

A transmissão sem envolvimento de vetor foi descrita em indivíduos de equipes de saúde que se acidentaram com materiais perfuro cortantes contaminados com sangue de pacientes doentes e em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (13). Também há relatos de transmissão da dengue em pacientes que receberam transfusão de sangue e hemoderivados contaminados com o vírus (14). A transmissão vertical do DENV em humanos tem sido relatado por vários grupos de estudo, inclusive no Brasil (15);(16);(17);(18).

### 1.4 Vírus da dengue – Características da partícula viral

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. São partículas virais esféricas, de 50 a 60 nm de diâmetro, constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica, no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície viral, E e M (Figura 2) (19).

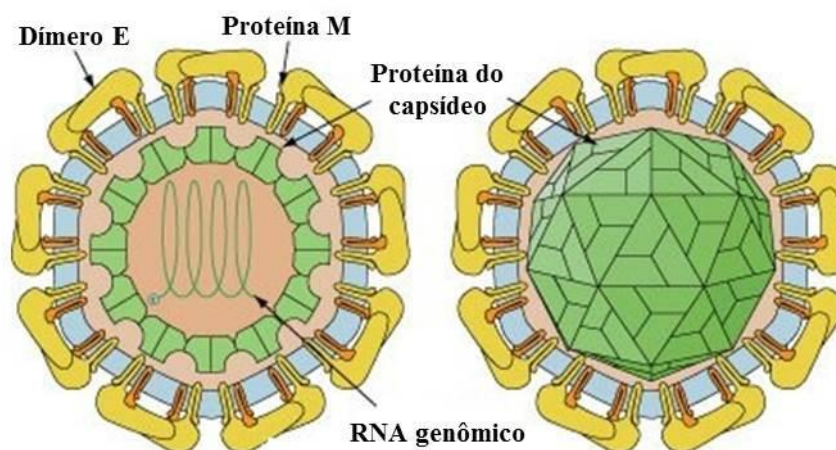


Figura 2. Estrutura esquemática da partícula viral. RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. Fonte: <http://viralzone.expasy.org/>.

O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases (Figura 3). Este RNA possui a estrutura cap ( $m^7G5'ppp5' A$ ) no extremo 5', mas não contém cauda de poli A no extremo 3'. O RNA viral possui uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), flanqueada por regiões não codificadoras 5' e 3' (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (20, 21).

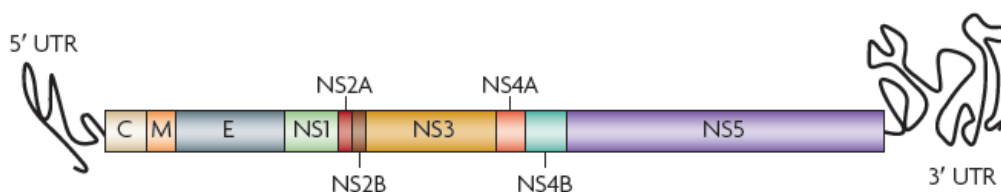


Figura 3. Genoma do vírus da dengue. Fonte: (22)

## 1.5 Ciclo de replicação viral

Devido a diferenças no meio intracelular e pela natureza não-lítica do ciclo dos *Flavivirus*, a entrada, a replicação e o envelopamento desses vírus pode diferir nas células de mosquitos em comparação às células de vertebrados (23-27). Poucos receptores que medeiam a interação dos flavivírus com a célula hospedeira têm sido descritos. Entretanto várias moléculas de superfície já foram propostas para a interação vírus-célula. Recentemente foi mostrado que DC-SIGN (lectina específica de manose), amplamente distribuídas na superfície de células dendríticas (DC), interage com os açúcares da proteína E. Esta interação seria o primeiro contato vírus-célula, a qual facilitaria a ligação da proteína E com o receptor celular ainda desconhecido (25, 26, 28, 29). Sabe-se também que resíduos da proteína E carregados positivamente poderiam interagir com o heparansulfato, que está amplamente distribuído em muitas linhagens celulares e conseqüentemente facilitaria a infecção da célula (30, 31).

O DENV penetra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptores (Figura 4). O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E a receptores específicos presentes na membrana celular. Após a endocitose, os endossomos fundem-se com lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico, o que potencializa mudanças conformacionais na proteína E, aproximando o envelope viral à membrana do endossomo, resultando na fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e conseqüentemente, a dissociação do nucleocapsídeo e liberação do genoma no citoplasma (24, 25, 27). O RNA viral livre no citoplasma é reconhecido pela maquinaria de tradução celular, resultando na síntese de uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esse polipeptídeo sofre processamento co- e pós-transducional através de clivagens realizadas por proteases virais e do hospedeiro originando três proteínas virais estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas prM, E e NS1 são direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER), em cuja membrana permanecem ancoradas, enquanto que a proteína C e as outras proteínas não estruturais incluindo a NS1 são liberadas no citoplasma da célula (25). A replicase viral é montada a partir das proteínas NS3 e NS5, as quais atuam sobre o RNA viral provavelmente auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. O genoma viral é replicado por meio de um intermediário de uma cadeia negativa do RNA (ssRNA<sup>-</sup>), o qual serve como molde para a síntese de várias cópias de RNAs de fitas simples de cadeia positiva (ssRNA<sup>+</sup>). A montagem do *vírião* acontece em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A proteína C junto com o RNA formam o nucleocapsídeo, o

qual se liga à porção citoplasmática dos heterodímeros das glicoproteínas prM e E ancoradas na membrana bilipídica do retículo endoplasmático, resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do *lúmen* do retículo endoplasmático. Nesta fase as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas. Esses vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o Complexo de Golgi; onde, no ambiente de baixo pH da face trans do complexo, ocorre a clivagem por furinas da proteína prM em M (proteína de membrana) levando a maturação da partícula viral. A maturação promove um rearranjo no envelope viral com a liberação do peptídeo “pr” (86 aminoácidos), que é secretado no meio extracelular. Posteriormente, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela via exocítica.

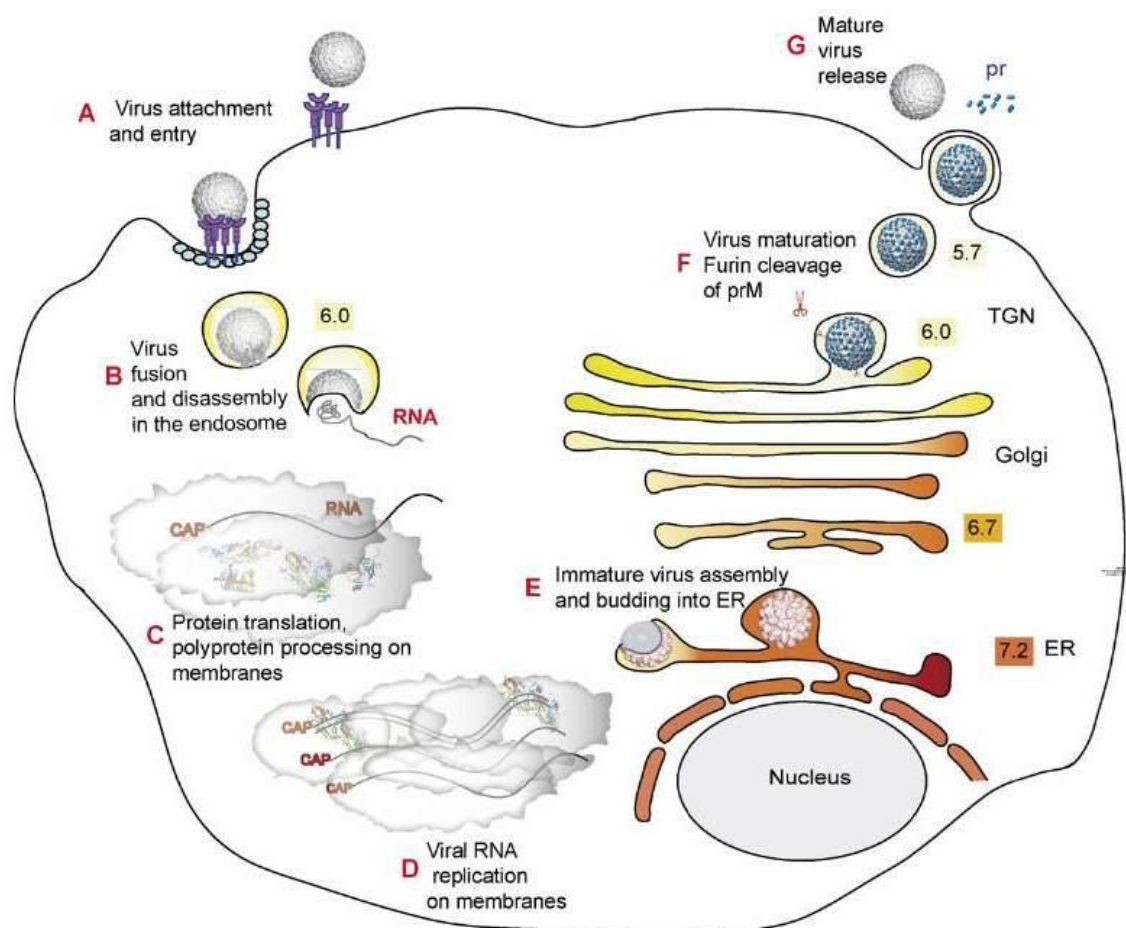


Figura 4. Ciclo de multiplicação viral. O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promovem mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no *lumen* do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (27).

## 1.6 Vírus da dengue – Sorotipos e Genótipos

Com base em testes sorológicos cruzados, os DENV foram classificados em quatro sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (32, 33). Estudos na década de 70 mostraram a existência de variação antigênica dentro dos DENV-3, onde as cepas de Porto Rico se mostraram antígenicamente diferentes às cepas da Ásia (34). Mais tarde, o método de “*RNA fingerprinting*” foi usado para identificação do sorotipo viral e para análises moleculares das variantes genéticas dentro de cada sorotipo (35, 36). Vários trabalhos como análises antigênicas, hibridação de cDNA-RNA e digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR, mostraram a existência de variantes genéticas dentro de cada sorotipo (37-39). Com o desenvolvimento da metodologia de sequenciamento dos ácidos nucleicos e os estudos de diversidade genética foi possível introduzir a classificação em grupos genômicos ou genótipos. Atualmente, são conhecidos diversos genótipos dentro de cada sorotipo viral. DENV-1 está constituído por cinco genótipos; o genótipo I está representado por vírus do Sudeste Asiático, China e Oriente Médio. O genótipo II inclui algumas cepas da Tailândia; o genótipo III está representado por cepas da Malásia; o genótipo IV inclui cepas do sudeste da Ásia, sul do Pacífico, Austrália e México; o genótipo V está representado por vírus das Américas, África e Ásia (40, 41). DENV-2 foi inicialmente classificado em cinco genótipos, mas estudos recentes indicaram a existência de um novo genótipo; assim os seis genótipos são denominados: Genótipo Asiático I (I), que é representado por cepas da Tailândia, Malásia, Camboja, Myanmar, Vietnam e Austrália; genótipo Asiático II (II), que inclui cepas da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México; genótipo Americano (III), representado por cepas da América Central e do Sul, do Caribe e de ilhas do pacífico; o genótipo Americano/Asiático (IV) representado por cepas do sudeste asiático, das Américas do sul e central e do Caribe, e o genótipo Cosmopolita (V) e Selvagens (VI), representado por cepas humanas, de mosquitos e de primatas não humanos do oeste da África e sudeste da Ásia (42) (40, 43, 44). DENV-3 foi classificado por Lanciotti (1994) em 4 subtipos ou genótipos (45). O genótipo I está representado por isolados de Indonésia, Malásia, Filipinas e algumas ilhas do Pacífico Sul; o genótipo II compreende vírus da Tailândia; o genótipo III está representado por isolados da Ásia, África e América; e o genótipo IV inclui vírus de Porto Rico e Tahiti. WITTKÉ et al (2002) sugeriram a existência de um quinto genótipo dentro do DENV-3 que inclui vírus das Filipinas e da China. Entretanto, estudo realizado por nosso grupo analisando o gene da proteína E mostrou que esse grupo de vírus, na realidade, pertence a uma linhagem diferente dentro do genótipo I (46). Um estudo recente realizado por Chen e colaboradores demonstrou que o DENV-4 inclui quatro genótipos (47, 48); o genótipo I está representado por



isolados das Filipinas, Tailândia, Sri Lanka, Vietnã, Myanmar, Malásia, Índia, Japão, China e algumas cepas isoladas no Brasil; o genótipo II inclui vírus da Indonésia, Malásia, Singapura, China, ilhas do oeste do oceano Pacífico, Austrália, as ilhas do Caribe (Porto Rico e República Dominicana), os países da América Central e América do Sul; genótipo III, representado por vírus isolados na Tailândia entre 1997 e 2001 e o genótipo IV que inclui cepas isoladas de macacos na Malásia durante a década de 70, sendo chamado de genótipo selvagem.

No Brasil, estudos filogenéticos de dengue têm demonstrado a presença de novos grupos de cepas (subtipos) dentro dos genótipos específicos de cada sorotipo (49) (50). Nos países endêmicos para a dengue em todo o mundo, tem ocorrido a substituição da prevalência de um sorotipo ou genótipo circulante. Estas substituições podem estar relacionadas ao surgimento de casos mais graves da doença (51-53).

Apesar da patogênese dos casos mais graves ser pouco compreendida, estudos de filogenia, evolução e virulência têm analisado a relação entre alguns genótipos específicos e a gravidade da doença (54). Além disso, também foi descrito que isolados de diferentes epidemias leves ou graves formaram grupos geneticamente distintos, sugerindo que a genética viral tem papel importante no desenvolvimento dos casos graves da dengue (51).

## 1.7 Manifestações clínicas

Na forma clássica da doença, os sintomas se iniciam 2 a 8 dias após a picada, quando surge febre alta que dura de 2 a 7 dias, calafrios, cefaléia intensa, dor retro-orbitária e astenia importante, além de dor musculoesquelética e abdominal intensas, fato que levou a doença a ser inicialmente conhecida como “febre quebra ossos”. Anorexia, náuseas e vômitos também são frequentes. Exantema generalizado, de caráter transitório e exibindo padrão macular ou mosqueado pode aparecer no primeiro ou segundo dia de evolução. Não se tem demonstrado que este exantema seja um fator de melhor ou pior prognóstico (7). A FHD/SCD caracteriza-se por aumento da permeabilidade capilar, alterações no número e função dos leucócitos, aumento do hematócrito, trombocitopenia e classifica-se em quatro graus de gravidade (I-IV). Os fenômenos de extravasamento do plasma, provocados por alterações na permeabilidade vascular, para as cavidades serosas do corpo podem resultar em choque hipovolêmico. Coincidindo com a defervescência entre o terceiro e o quinto dia ou logo após, pode aparecer exantema máculopapular ou morbiliforme difuso que se inicia no tronco. As demais manifestações clínicas são idênticas às da FD até o primeiro momento de defervescência, quando se podem notar sinais clínicos de hipoperfusão tecidual e trombocitopenia importante

acompanhada de petéquias disseminadas, equimoses espontâneas e sangramento das mucosas e dos sítios de punção venosa.

### 1.8 Diagnóstico laboratorial da dengue

O diagnóstico específico de infecções por DENV pode ser feito por isolamento viral a partir do sangue de pacientes até cinco dias após o início da febre. Linhagens celulares contínuas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284), *Aedes albopictus* (C6/36), e *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) são frequentemente utilizadas para isolamento do vírus (55). Após isolamento, os vírus devem ser identificados e sorotipados, comumente por imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos.

Para o diagnóstico rápido de infecções por dengue, tem sido utilizado a RT-PCR convencional ou em tempo real; (56); (57); (58); (59).

Recentemente, durante a fase aguda da doença, tem sido demonstrado que em amostras de soro pode ser detectada a proteína NS1. Esta glicoproteína não estrutural do vírus é altamente conservada e, durante a fase aguda da infecção, passa a ser expressa na superfície das células infectadas e também é secretada para a circulação sanguínea podendo ser detectada no sangue (60, 61). O diagnóstico sorológico é comumente feito por detecção de IgM específico por teste imunoenzimático de captura (Mac-ELISA). A IgM aparece logo depois de terminar a febre e começa a diminuir depois de 1 a 2 meses. Os métodos sorológicos clássicos podem, também, ser utilizados e dependem da demonstração do aumento em quatro ou mais vezes do título de anticorpos detectados por inibição da hemaglutinação (HAI), fixação de complemento (CF), ou neutralização (NT). Geralmente é difícil estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga. Devido à associação entre a infecção seqüencial com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária. HAI é o método mais utilizado para distinguir entre infecção primária e secundária. Na infecção primária, os títulos séricos para DENV não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença. Na infecção secundária, os títulos séricos devem ser maiores ou iguais a 2500 (62).

### 1.9 Prevenção e controle da doença

A prevenção e o controle da dengue dependem de ações de combate do vetor, o *Aedes aegypti*, utilizando inseticidas e estratégias de conscientização comunitária para eliminação de

potenciais criadouros das larvas dos mosquitos. A monitorização do vetor é um papel decisivo no controle de epidemias, em que é possível identificar os aumentos da presença do vetor e os potenciais locais de reprodução, permitindo uma ação rápida para evitar ou reduzir a transmissão da doença. No entanto, até agora, o principal problema é a sustentabilidade, recomenda-se que a aplicação de estratégias integradas de controle, incluindo ferramentas para reduzir os índices larvários e o número de mosquitos adultos é complementado pela participação setorial e pela comunidade (63-66).

Atualmente, não existem medicamentos antivirais disponíveis contra o vírus, tampouco um tratamento específico para a doença. O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o vírus é uma das prioridades de saúde pública de acordo com a Organização Mundial da Saúde. O desenvolvimento de uma vacina contra a dengue tem sido dificultado pela necessidade de desenvolver uma vacina contra os quatro sorotipos, a fim de evitar o fenómeno de ADE, pela falta de compreensão dos mecanismos de imunidade protetora contra o vírus, pela falta de um modelo animal para a avaliação de vacinas, etc. No entanto, um progresso significativo tem sido observado nos últimos anos na procura por uma vacina eficaz (67, 68).

Em 2010, o desenvolvimento da vacina contra a dengue alcançou um grande avanço com o primeiro ensaio clínico da fase III para investigar uma vacina tetravalente contra dengue, a CYD TD (Sanofi Pasteur), que é composta de quatro vacinas recombinantes de vírus vivo atenuado (CYD 1-4) com base na organização genômica da cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela. Por meio de manipulações genéticas, foram substituídos os genes prM e E do genoma do vírus da febre amarela pelos genes prM e E de cada um dos quatro sorotipos do DENV. Em 2011, foi relatado que ela foi administrada a mais de seis mil crianças e adultos de 15 países endêmicos e não endêmicos de dengue e não havia relatado problemas sobre sua segurança (Guy et al., 2011)

## **1.10 Epidemiologia da dengue**

### **1.10.1 Situação da dengue no Brasil**

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4 (69) que ficou restrita a essa região. Em Março de 1986 o DENV-1 foi introduzido numa cidade vizinha ao Rio de Janeiro; no mesmo ano, o vírus chegou ao Rio de Janeiro, e foi o começo de uma epidemia explosiva com 95.000 casos notificados e aproximadamente 3 milhões de infectados (70, 71). Esta

epidemia chegou aos estados do nordeste e do centro-oeste do Brasil entre 1986 e 1987 (72, 73). Entre 1990 e 2002, foram notificados casos de DENV-1, praticamente, em todas as regiões do Brasil (73).

Em Abril de 1990, foi dado início à primeira epidemia de DENV-2 na cidade do Rio de Janeiro (74). Nesta epidemia foram notificados 17.000 casos com 2% destes apresentando DHF/SCD. Epidemias de DENV-2 têm sido notificadas em praticamente todas as regiões do Brasil (72).

A primeira epidemia de DENV-3 em Janeiro de 2001 ocorreu no Rio de Janeiro (75, 76). Este primeiro surto foi seguido de uma grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro, com 81327 casos de FD e 958 casos de DHF/SCD e 54 óbitos entre 1 de janeiro de 2001 a 22 de junho de 2002 (77). PASSOS et al (2004) analisando 362 casos de dengue no Rio de Janeiro durante a epidemia de 2001/2002, com isolamento viral confirmado laboratorialmente, observaram que a maioria (238 casos) pertencia ao sorotipo 3, sendo que os sorotipos 1 e 2 foram observados em 62 casos de cada. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que indivíduos infectados com o DENV-3 apresentaram sintomatologia mais grave, sugerindo maior virulência deste sorotipo. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade (78). Após a epidemia de 2001/2002 o DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (72). No período entre 2007 e 2009, ocorreu uma alteração no sorotipo predominante, com a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Essa alteração levou a ocorrência de epidemias em diversas unidades federadas do país, com um deslocamento de casos graves para menores de 15 anos. Em 2008 foi novamente re-introduzido o sorotipo DENV-1, passando a ser o sorotipo predominante nos estados de Roraima, Mato Grosso do Sul e Piauí (79). Já em 2010 foi possível observar uma co-circulação dos três sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (80). Em 2008, o DENV-4 foi isolado de três pacientes na cidade de Manaus, Amazonas, sugerindo que este vírus estaria circulando no país (81). A confirmação da circulação deste sorotipo ocorreu no mês de agosto de 2010, quando o Ministério da Saúde detectou este vírus em Roraima; nove casos em Boa Vista e um no Município de Cantá (80).

Na epidemia de 2013, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação dos quatro sorotipos sendo que o DENV-4 foi o de maior prevalência correspondendo a 52,6% das amostras analisadas até fevereiro de 2013. O boletim do governo apontou 204.650 casos, contra 70.489 do mesmo período do ano passado sendo que oito estados - Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Espírito Santo - concentram

173.072 notificações, que equivalem a 84,6% do total. Mesmo com expansão da notificação total da doença há tendência de queda no número de casos graves. Este menor número de casos graves e óbitos é resultado das medidas adotadas pelo Ministério da Saúde em conjunto com estados e municípios, como a organização da rede pública de atendimento, a melhoria da atenção básica, a capacitação dos profissionais e o reforço à vigilância em saúde.

### **1.10.2 Situação da dengue em Ribeirão Preto**

Ribeirão Preto, localizada na região Nordeste do Estado de São Paulo sofreu, de novembro de 1990 a março de 1991, uma epidemia de DENV-1 com aproximadamente 2.305 casos confirmados, o que representou uma incidência de 546,9 casos por 100.000 habitantes (82). Desde então, a incidência continuou se mantendo em índices baixos. Em 2001, o município viveu uma nova epidemia com 3190 notificações de casos com prevalência dos sorotipos 1 e 2. Após introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro, este vírus se espalhou por diversas cidades do Brasil chegando inclusive em Ribeirão Preto e sendo o sorotipo que prevaleceu na epidemia de 2006, quando 5997 casos foram notificados sendo 15 com dengue hemorrágica e um óbito. Entre 2007 e 2009 observou-se uma diminuição no número de casos, porém uma nova epidemia ocorreu na cidade em 2010, com 29.949 casos notificados e 9 mortes, sendo assim considerada a maior epidemia observada na cidade. Nesta última epidemia foi detectado com maior prevalência o DENV-1, mas os DENV-2 e -3 também foram detectados (80, 83). Em 2011, foram notificados 23.384 casos, com circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (83).

Em 2012, o número de casos diminuiu consideravelmente, com notificação de 310 e circulação predominante de DENV-1 (84). Já em 2013, como era esperado, ocorreu a introdução do DENV-4. De Janeiro de 2013 até Novembro de 2013 foram notificados 13.390 casos, sendo o DENV-4 o sorotipo circulante predominante em Ribeirão Preto (84).

## 7 CONCLUSÕES

- 1- DENV-1, DENV-2 e DENV-3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011.
- 2- Todos os vírus introduzidos em Ribeirão Preto foram provenientes de vírus originados no Estado do Rio de Janeiro.
- 3- Duas linhagens do genótipo V de DENV-1, uma do genótipo Americano/Asiático de DENV-2 e uma do genótipo III de DENV-3 circularam em Ribeirão preto entre 2010 e 2011.
- 4- O relacionamento filogenético dos vírus foi similar independentemente do uso da sequência do gene da proteína E ou de toda a região codificadora do genoma viral.

## 8 REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. 2009;Fact Sheet No. 117. Geneva.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
3. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci.* 1971;26(3):243-62.
4. KIMURA R, HOTTA S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku.* 1944;3379:5.
5. Siler JF, Hall MW, AP. H. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philipp J Sci.* 1926;29:1-304.
6. Ashburn P, Craig C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. 1907. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1747-83; discussion 4-6.
7. MARTÍNEZ E. Temas de actualidad. Current topics. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2006;20(1).
8. Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, et al. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerging infectious diseases.* 2005;11(5):742-9.
9. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal.* 2004;80(948):588-601.
10. WHO. World Health Organization 2012 [cited 2012]. Available from: <http://www.who.int/denguecontrol/en/>.
11. Perich MJ, Davila G, Turner A, Garcia A, Nelson M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *Journal of medical entomology.* 2000;37(4):541-6.
12. Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, et al. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology.* 2001;26(2):172-80.

13. Chen LH, Wilson ME. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(5):775.
14. Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK, Group T-TDIS. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2008;359(14):1526-7.
15. Thaithumyanon P, Thisyakorn U, Deerojnawong J, Innis BL. Dengue infection complicated by severe hemorrhage and vertical transmission in a parturient woman. *Clin Infect Dis*. 1994;18(2):248-9.
16. Boussemart T, Babe P, Sibille G, Neyret C, Berchel C. Prenatal transmission of dengue: two new cases. *J Perinatol*. 2001;21(4):255-7.
17. Fatimil LE, Mollah AH, Ahmed S, Rahman M. Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34(4):800-3.
18. Sirinavin S, Nuntnarumit P, Supapannachart S, Boonkasidecha S, Techasaensiri C, Yoksarn S. Vertical dengue infection: case reports and review. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(11):1042-7.
19. Westaway E, Brinton M, Gaidamovich SYa, Horzinek M, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
20. LINDENBACH BD, THIEL HJ, RICE CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE DMaH, P.M., editor. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1102-33.
21. Mukhopadhyay S, Kuhn R, Rossmann M. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
22. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7-16.
23. Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Advances in virus research*. 2004;63:239-85.
24. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):318-28.
25. Lindenbach BD, Thiel HJ, Charles M. Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Wilkins LW, editor. *Fields Virology*. II. 5th ed2007. p. 1102-52.



26. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22.
27. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research*. 2008;80(1):11-22.
28. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(9):1179-84.
29. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(25):23698-708.
30. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*. 1997;3(8):866-71.
31. Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2003;308(1):92-100.
32. Scherer W. The complexity of Arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. *Am J Epidemiol*. 1968;88(2):145-6.
33. SABIN A. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev*. 1950;14(3):225-32.
34. Russell P, McCown J. Comparison of dengue-2 and dengue-3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3. *Am J Trop Med Hyg*. 1972;21(2):97-9.
35. Repik P, Dalrymple J, Brandt W, McCown J, Russell P. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(3):577-89.
36. Trent D, Grant J, Rosen L, Monath T. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*. 1983;128(2):271-84.
37. Kerschner J, Vorndam A, Monath T, Trent D. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J Gen Virol*. 1986;67 ( Pt 12):2645-61.

38. Vorndam V, Nogueira R, Trent D. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol*. 1994;136(1-2):191-6.
39. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methods*. 1994;48(2-3):237-44.
40. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93.
41. Goncalvez A, Escalante A, Pujol F, Ludert J, Tovar D, Salas R, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*. 2002;303(1):110-9.
42. Diallo M, Ba Y, Sall A, Diop O, Ndione J, Mondo M, et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(3):362-7.
43. Lewis J, Chang G, Lanciotti R, Kinney R, Mayer L, Trent D. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993;197(1):216-24.
44. Twiddy S, Farrar J, Vinh Chau N, Wills B, Gould E, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002;298(1):63-72.
45. Lanciotti R, Lewis J, Gubler D, Trent D. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994;75 ( Pt 1):65-75.
46. Amarilla A, de Almeida F, Jorge D, Alfonso H, de Castro-Jorge L, Nogueira N, et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virol J*. 2009;6:113.
47. Lanciotti R, Gubler D, Trent D. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997;78 ( Pt 9):2279-84.
48. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett A, Watowich S, Gubler D, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227-34.
49. dos Santos F, Nogueira F, Castro M, Nunes P, de Filippis A, Faria N, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J*. 2011.
50. Oliveira M, Galvao Araujo J, Ferreira OJ, Ferreira D, Lima D, Santos F, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):576-8.

51. Messer W, Gubler D, Harris E, Sivananthan K, de Silva A. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):800-9.
52. Zhang C, Mammen MJ, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol.* 2005;79(24):15123-30.
53. Rico-Hesse R, Harrison L, Salas R, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
54. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;315-41.
55. Kuno G, Gubler D, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ.* 1985;63(2):279-86.
56. de Moraes Bronzoni R, Baleotti F, Ribeiro Nogueira R, Nunes M, Moraes Figueiredo L. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):696-702.
57. Deubel V, Laille M, Hugnot J, Chungue E, Guesdon J, Drouet M, et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods.* 1990;30(1):41-54.
58. Dos Santos HWG, Poloni T, Souza KP, Muller VDM, Tremeschin F, Nali LC, et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology.* 2008;80(8):1426-33.
59. Poloni T, Oliveira A, Alfonso H, Galvao L, Amarilla A, Poloni D, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010;7(1):22.
60. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):376-81.
61. Libraty D, Young P, Pickering D, Endy T, 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(8):1165-8.

- 
62. Shope R. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. Rio de Janeiro: Anais de Microbiologia; 1963. p. 167-71.
63. Guzman M, Vazquez S, Kouri G. Dengue: where are we today? *Malays J Med Sci.* 2009;4-11.
64. Webster D, Farrar J, Rowland-Jones S. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(11):678-87.
65. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2011;29(42):7229-41.
66. Guzman M. Thirty years after the Cuban hemorrhagic dengue epidemic of 1981. *MEDICC Rev.* 2012:46-51.
67. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines.* 2014;2(1):3-9.
68. McArthur MA, Sztein MB, Edelman R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(8):933-53.
69. Osanai 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;25(1):53-4.
70. Schatzmayr H, Nogueira R, Travassos da Rosa A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.
71. Figueiredo L, Cavalcante S, Simões M. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ.* 1990;24(2):217-25.
72. FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. 2002.
73. Vasconcelos P, de Menezes D, Melo L, Pessoa E, Rodrigues S, da Rosa E, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(3):253-5.

74. Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Schatzmayr H. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
75. Nogueira R, Miagostovich M, de Filippis A, Pereira M, Schatzmayr H. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925-6.
76. Miagostovich M, dos Santos F, de Simone T, Costa E, Filippis A, Schatzmayr H, et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(8):869-72.
77. Casali C, Pereira M, Santos L, Passos M, Fortes BP, Ortiz Valencia L, et al. [The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):296-9.
78. Passos M, Santos L, Pereira M, Casali C, Fortes BP, Ortiz Valencia L, et al. [Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):293-5.
79. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2009. 2009.
80. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Julho de 2010. 2010.
81. Barcelos Figueiredo L, Batista Cecílio A, Portela Ferreira G, Paiva Drumond B, Germano de Oliveira J, Bonjardim C, et al. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):314-6.
82. Rodrigues E, Dal-Fabbro A, Salomão R, Ferreira I, Roccoc M, Da Fonseca BAL. Epidemiologia da infecção pela dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2002.
83. Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto. Técnica de combate à dengue tem reconhecimento do Ministério da Saúde. Ribeirão Preto 2011 [cited 2011 05 de Março].
84. Distribuição dos casos de dengue autóctones segundo o município provável de infecção e casos importados de outros estados segundo o município de residência no Estado de São Paulo – ano 2013. [Internet]. 2013.
85. Aquino VH, Anatriello E, Goncalves PF, da Silva EV, Vasconcelos PFC, Vieira DS, et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;75(4):710-5.

86. Christenbury JG, Aw PP, Ong SH, Schreiber MJ, Chow A, Gubler DJ, et al. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. *J Virol Methods*. 2010;169(1):202-6.
87. Alfonso HL, Amarilla AA, Goncalves PF, Barros MT, de Almeida FT, Silva TR, et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virology Journal*. 2012;9.
88. Posada D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W700-3.
89. Swofford D. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 1998.
90. Nylander, JAA. MrModelTest v2. In: author Pdbt, editor. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Center, University of Uppsala; 2004.
91. Ronquist F, Huelsenbeck J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-4.
92. Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*. 2001;92(4):371-3.
93. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*. 2008;9(4):299-306.
94. Lemey P, Rambaut A, Drummond A, Suchard M. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(9):e1000520.
95. Drummond A, Ho S, Phillips M, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*. 2006;4(5):e88.
96. Rodríguez F, Oliver J, Marín A, Medina J. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol*. 1990;142(4):485-501.
97. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology Journal*. 2010;7.
98. San Martín J, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano J, Bouckenooghe A, Dayan G, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):128-35.

- 
99. Villabona-Arenas C, Zanotto P. Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PLoS One*. May, 2013.
100. Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo DeV, Ramos RT, Medeiros DB, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):805-12.
101. Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol Bull*. 1989;10(1):1-8.
102. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50(3-4):161-9.
103. Osanai 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;25(1):53-4.
104. 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;157(11):2061-73.
105. 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;38(6):843-52.
106. Romano CM, de Matos AM, Araújo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One*. 2010;5(7):e11811.
107. Drumond B, Mondini A, Schmidt D, de Moraes Bronzoni R, Bosch I, Nogueira M. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One* 8(3): e59422 2013.
108. Araújo J, Nogueira R, Schatzmayr H, Zanotto P, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):716-25.
109. Alfonso HL, Amarilla AA, Gonçalves PF, Barros MT, Almeida FT, Silva TR, et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virol J*. 2012;9(1):124.
110. Aquino V, Anatriello E, Gonçalves P, DA Silva E, Vasconcelos P, Vieira D, et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(4):710-5.

- 
111. Vilela A, Figueiredo L, dos Santos J, Eiras A, Bonjardim C, Ferreira P, et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):989-92.
112. Aquino V, Amarilla A, Alfonso H, Batista W, Figueiredo L. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. *PLoS One.* 2009;4(10):e7299.
113. Amarilla AA, de Almeida FT, Jorge DM, Alfonso HL, de Castro-Jorge LA, Nogueira NA, et al. Genetic diversity of the E Protein of Dengue Type 3 Virus. *Virology Journal.* 2009;6.
114. de 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.
115. Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(3):307-13.
116. dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoso SP, Rey F, Deubel V, et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res.* 2002;90(1-2):197-205.
117. dos Santos F, Miagostovich M, Nogueira R, Edgil D, Schatzmayr H, Riley L, et al. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002:991-5.
118. Nunes MR, Palacios G, Faria NR, Sousa EC, Pantoja JA, Rodrigues SG, et al. Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):e2769.