Instituto de Medicina Tropical

Universidade de São Paulo

Antonio Charlys da Costa

Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro.

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo

2017

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da

Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Costa, Antonio Charlys da

Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro / Antonio Charlys da Costa. – São Paulo, 2017.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Ester Cerdeira Sabino

Descritores: 1. DENGUE. 2. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO. 3. DOADORES DE SANGUE. 4. DIVERSIDADE GENÉTICA. 5. EVOLUÇÃO MOLECULAR.

USP/IMTSP/BIB-06/2017.

DEDICATÓRIA

A meus amados pais, Gecina Gomes Pereira e Antonio Gonçalves da Costa e minha família, que agradeço a Deus todos os dias por estarmos sempre juntos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me proporcionado mais esta conquista e por todas as outras, obrigado Senhor por estar sempre comigo.

Aos meus pais, minhas irmãs: Ana Maria, Antonia Vileide, Aparecida Maria, Charlene Gonçalves, Francisca Francileide, meus irmãos Geraldo Gomes, Valdeineide Gonçalves, sobrinhos Jussara Gonçalves, Gabriel Gonçalves, Ruberleide Gonçalves, Matheus Henrique, Weslley Gonçalves, Murilo Cardoso, Rafael Gonçalves, Antonio Neto, Ruan Gonçalves, Larissa Gonçalves, minhas enteadas Carol e Fernanda, os meios irmãos Bruno e Rafael, meus filhos, Nick, Cristal, Luna, Severino, Polly, Bela, Hanna, Julia, Bruna, meus tios e tias, primos e primas por estarem sempre presentes em minha vida, nos bons e maus momentos, AMO VOCÊS;

A minha companheira de todos os momentos Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis, por todas correções em meus trabalhos, projetos e também em minha vida, obrigado por tudo *mozim*, te amo;

Ao minha orientadora Profa. Ester Cerdeira Sabino, pela confiança, incentivo e orientação, compreensão e principalmente por ter me recebido de braços abertos em seus laboratórios e principalmente por me deixar “VOAR” o meu sincero muito obrigado;

Ao grande amigo Luciano Monteiro da Silva pela infindável ajuda, amizade principalmente pelo exemplo de vida e de ser humano, muito obrigado.

A minha querida amiga Lucy Santos Vilas Boas, pela amizade e por todo auxilio neste trabalho.

A Fernanda Komninakis, pela correção do português.

A Camila Malta Romano, por todo auxilio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz, por ter custeado meu curso de graduação, sem isso não estaria aqui agora, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Eric L. Delwart, Tung Phan, Terrey Fei Fan e Beatrix Kapuzinsky do Delwart Lab, por toda paciência e conhecimento transferido durante minha estadia nos EUA. Minha estadia não poderia ter sido melhor.

Ao Nuno Faria, José Lourenço, Moritz Kraemer, Julien Theze e Oliver Pybus da Universidade de Oxford, pelo auxilio nas análises de epidemiologia molecular e no desenvolvimento de modelos para que fosse possível realizar este trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical em especial a Adenilson Ribeiro, Eliane Araujo, Carlos José Quinteiro, Patricia Chefre, Licia Natal Fernandes, Tony Ricardo Martins, Michele Gouvea, Lucia Braz, Júlio Cesar, Paulo Nasser, Cristina Oliveira, Sonia Ferraz, Tatiana Mitiko, Georgina Neta, Igor, Artur, Genivaldo, Eduardo (LIM56), Maria Sato, Adriana Gama, Cecilia Salete, Roberta Carlucci, Braz, Natalia, Armando, Dewton, Edite, Renata e Carlos.

Minha caminhada até aqui nem sempre foi fácil, mais graças as pessoas que me ajudaram a chegar tornaram o caminho agradável e feliz. Se fosse tentar citar todos poderia cometer o pecado de esquecer algum, portanto citarei os lugares e VOCÊS saberão, aos amigos da VIRO, RETRO, IMUNO, LEMC, ALERTA, LEMI, IDIPA, DIPA, DMED da UNIFESP, da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, do Blood Systems Research Institute.

A todas as pessoas, que me ajudaram ou contribuíram de alguma forma, em minha caminhada até aqui, meu muito obrigado a todos.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia (LIM - 52) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, contando com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Bolsa de Doutorado Direto no País, Processo Nº 2012/03417-7 e Bolsas de Estágio de Pesquisa Exterior (BEPE), Processo Nº 2014/05211-2.

EPÍGRAFES

"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família".

Liev Tolstói.

"Quem só tem o espírito da história não compreendeu a lição da vida e tem sempre de retomá-la. É em ti mesmo que se coloca o enigma da existência: ninguém o pode resolver senão tu!"

Friedrich Wilhelm Nietzsche.

"Se você pensa que pode ou sonha que pode, comece. Ousadia tem genialidade, poder e mágica. Ouse fazer e o poder lhe será dado".

Johann Wolfgang von Goethe

“A filosofia de uma pessoa não é melhor expressa em palavras; ela é expressa pelas escolhas que a pessoa faz. A longo prazo, moldamos nossas vidas e moldamos a nós mesmos. O processo nunca termina até que morramos. E, as escolhas que fizemos são, no final das contas, nossa própria responsabilidade”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

da-Costa AC. Caracterização molecular do vírus da dengue pela análise do genoma completo viral em amostras de doadores e receptores de sangue nos estados de Pernambuco e Rio de Janeiro (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: O dengue vírus é o responsável por uma das mais importantes doenças transmitidas por vetores em todo o mundo, causando cerca de 390 milhões de infecções anualmente em mais de 100 países. Estima-se que mais de 3,51 bilhões de pessoas (40% da população mundial) estejam vivendo em regiões de risco. A distribuição geográfica dos tipos de dengue aumentou drasticamente nas últimas décadas, impulsionada pela expansão de sua principal espécie de vetor, o *Aedes aegypti*, o crescimento da população humana, as viagens, o comércio internacional e a crescente urbanização nos trópicos e subtrópicos. **Objetivos**: Realizar a caracterização molecular do genoma completo do vírus da DENGUE; Avaliar tendências evolutivas que possam estar ocorrendo na epidemia brasileira, comparando nossos achados com os pré-existentes na literatura; **Métodos**: Amostras de doadores e receptores de sangue coletadas entre 15 de fevereiro a 15 de junho de 2012 em bancos de sangue e hospitais nas cidades de Recife, PE e Rio de Janeiro, RJ. Foi realizado o genoma viral de 90 amostras e posteriormente foram realizadas analises de filodinâmica viral e modelo matemático para estimar dados epidemiológicos. **Resultados**: As análises filogenéticas indicam que o surto foi causado pelo dengue vírus 4 genótipo II, embora dois isolados do genótipo I também tenham sido detectados pela primeira vez no Rio de Janeiro. A análise evolutiva e as estimativas de modelagem são congruentes, indicando um número reprodutivo acima

de 1 entre janeiro e junho, com pelo menos dois terços das infecções sendo despercebidas. A análise de modelos sugere que a transmissão viral começou no início de janeiro, o que é consistente com múltiplas introduções, muito provavelmente dos estados do norte do Brasil, e com um aumento simultâneo de viagens aéreas dentro do país para o Rio de Janeiro. **Discussão**: O sistema nacional de vigilância notificou 213.000 casos de dengue no RJ e PE em 2012, por outro lado, inferimos pelo menos um número 3,4 vezes maior de infecções de dengue, de acordo com as estimativas anteriores com base em dados sorológicos. Modelos baseados na temperatura e pesquisas entomológicas mostraram que a região amazônica do Brasil é altamente adequada para a transmissão do DENV durante todo o ano. A explicação mais parcimoniosa para a ausência de casos notificados em centros urbanos estudados até 2012. O Rio de Janeiro recebe consistentemente novas linhagens de DENV mostrando ser improvável que as cadeias de transmissão dentro deste estado sejam sustentadas em várias estações do ano e, portanto, necessitarão de reintrodução da origem. **Conclusão**: A combinação de dados genéticos e epidemiológicos de doadores de sangue pode ser útil para antecipar a disseminação epidêmica de arbovírus.

Descritores: Dengue. Sequenciamento genético. Doadores de sangue. Diversidade genética. Evolução molecular.

ABSTRACT

da-Costa AC. Molecular characterization of full-length dengue virus genome in samples from blood donors and recipients in the states of Pernambuco and Rio de Janeiro. (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2015.

Introduction: Dengue virus is responsible for one of the most important vector-borne diseases in the world, causing about 390 million infections annually in more than 100 countries. It is estimated that more than 3.51 billion people (40% of the world's population) are living in regions at risk. The geographic distribution of dengue types has increased dramatically in recent decades, driven by the expansion of its major vector species, *Aedes aegypti*, human population growth, travel, international trade and increasing urbanization in the tropics and subtropics. **Objectives**: To carry out the molecular characterization of the complete genome of the DENGUE virus; Evaluate evolutionary trends that may be occurring in the Brazilian epidemic, comparing our findings with those in the literature; **Methods**: Samples of donors and blood recipients collected between February 15 and June 15, 2012 in blood banks and hospitals in the cities of Recife, PE and Rio de Janeiro, RJ. A viral genome of 90 samples was performed and phylodynamics and mathematical models were analyzed to estimate epidemiological data. **Results**: Phylogenetic analyzes indicated that the outbreak was caused by dengue virus 4 genotype II, although two genotype I isolates were also detected for the first time in Rio de Janeiro. Evolutionary analysis and modeling estimates are congruent, indicating a reproductive number above 1 between January and June, with at least two-thirds of the infections being unnoticed. Model analysis suggests that viral transmission began in early January, consistent with

multiple introductions, most likely from the northern states of Brazil, and with a simultaneous increase in air travel within the country to Rio de Janeiro. **Discussion**: The national surveillance system reported 213,000 dengue cases in RJ and PE in 2012, on the other hand, we inferred at least a 3.4 times higher number of dengue infections, according to previous estimates based on serological data. Temperature-based models and entomological surveys have shown that the Amazon region of Brazil is highly suitable for DENV transmission throughout the year. The most parsimonious explanation for the absence of reported cases in urban centers studied by 2012. Rio de Janeiro consistently receives new DENV lineages showing that it is unlikely that the transmission chains within this state will be sustained at various seasons of the year and therefore will require reintroduction of origin. **Conclusion**: The combination of genetic and epidemiological data from blood donors may be useful in anticipating the epidemic spread of arboviruses

Descriptors: Dengue. Genetic sequencing. Blood donors. Genetic diversity. Molecular Evolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mapa com as regiões de risco para transmissão do DENV..... 20

Figura 2 Classificação taxonômica dos DENV's.....21

Figura 3 Montagem esquemática dos DENV's.....23

Figura 4 Montagem esquemática com as funções das proteínas virais.....26

Figura 5 Diagrama ilustrativo do ciclo replicativo dos DENV's..... 28

Figura 6 Ilustração da possível origem da diversidade genética viral dos DENV's..... 29

Figura 7 Distribuição dos genótipos do sorotipo 1 no mundo.....31

Figura 8 Distribuição dos genótipos do sorotipo 2 no mundo. 32

Figura 9 Distribuição dos genótipos do sorotipo 3 no mundo. 34

Figura 10 Distribuição dos genótipos do sorotipo 4 no mundo. 35

Figura 11 Diagrama com os possíveis desfechos na infecção viral..... 36

Figura 12 Diagrama com os testes sorológicos e moleculares utilizados..... 38

Figura 13 Casos de dengue notificados nos últimos 16 anos no Brasil..... 39

Figura 14 Distribuição dos sorotipos de DENV no Brasil entre 2001-2012.... 40

Figura 15 Distribuição dos sorotipos de DENV em 2012.....41

Figura 16 Diagrama com a casuística do projeto..... 47

Figura 17 Diagrama ilustrativo detalhando os fragmentos amplificados..... 52

Figura 18 Relação entre temperatura e o sucesso na incubação dos ovos.. 72

Figura 19 Mapa cartográfico do Brasil..... 79

Figura 20 Árvore filogenética de máxima verossimilhança.....87

Figura 21A Árvore filogenética Bayesiana..... 88

Figura 21B Árvore Bayesiana calibrada no tempo com sequencias do surto...88

Figura 22 Flutuação temporal do número reprodutivo efetivo..... 90

Figura 23A Incidência de DENV por notificação nos locais do estudo..... 91

Figura 23B Número de casos notificados de DENV no Rio de Janeiro de 2002 - 2013..... 91

Figura 24 Número agregado de voos nacionais..... 93

Figura 25 Dinâmica epidemiológica e entomológica do surto de dengue..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de *cDNA*, amplificação e sequenciamento do genoma viral.....53

Tabela 2 Relação de reagentes e concentrações utilizados nas duas etapas para amplificação do RNA viral..... 55

Tabela 3 Relação de reagentes utilizados para ligação dos adaptadores e identificadores (*barcoding*) das amostras.....60

Tabela 4 Relação de reagentes utilizados para preparo da PCR em emulsão das amostras..... 62

Tabela 5 Parâmetros dependentes da temperatura.....71

Tabela 6 Parâmetros constantes.....74

Tabela 7 Parâmetros estimados.....76

Tabela 8 Posição no genoma do DENV, estatísticas do sequenciamento, carga viral e localização geográfica das amostras. 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Barcoding	Sequencia nucleotídicas utilizadas para identificar as amostras
C	graus celsius
DENV	Vírus da Dengue;
DENV's	Os quatro sorotipos do Vírus da Dengue;
DENV1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV4	Dengue vírus sorotipo 4
DNA	Ácido Desoxirribonucleico;
dNTP	Desoxirribonucleotideo trifosfatado
FcyR	Receptores para imunoglobulina G
G	Gravidade terrestre
GTR	Modelo de substituição geral reversível no tempo
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ion PGM	Sequenciamento por semicondutor de íons de baixa escala
ISPs	Partícula magnética envolvida por uma bola de gordura contendo reagentes necessário para realização da PCR em emulsão.
LoBind	Tubo composto de um material que o ácido nucleico não adere.
MCMC	Método de Monte Carlo baseado em cadeias de markov
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MRCA	Ancestral comum mais recente;
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma

nt	Nucleotideo
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomol
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
q.s.p	Quantidade suficiente para
RNA	Acido Ribonucleico;
RT-PCR	Transcrição Reversa seguido de PCR
s/s/a	Substituição por sitio por ano
TDF	Templete Dilution Factor (Fator de diluição usado para diluição de biblioteca de sequenciamento)
TMRCA`	Tempo do mais Recente Ancestral Comum;
ul	Microlitro
uM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....20

1.1 Vírus Dengue....21

1.1.1 Gênero Flavivírus....22

1.1.2 Partícula viral....23

1.1.3 Genoma viral....23

1.1.4 Proteínas estruturais....25

1.1.5 Proteínas não-estruturais....25

1.1.6 Replicação viral....26

1.1.7 Diversidade genética....29

1.1.8 Sorotipo 1 e genótipos....30

1.1.9 Sorotipo 2 e genótipos....31

1.1.10 Sorotipo 3 e genótipos....33

1.1.11 Sorotipo 4 e genótipos....34

1.1.12 Aspectos clínicos e patogênese....36

1.1.13 Transmissão e diagnóstico....37

1.1.14 Infecções secundárias....38

1.2 Epidemiologia do DENV no Brasil....39

2 JUSTIFICATIVA....43

3 OBJETIVOS....45

4 CASUÍSTICA....47

5 METODOLOGIA....49

5.1 Processamento das amostras....49

5.1.1 Coleta, preparação e triagem das amostras....49

5.1.2 Extração do RNA viral....50

5.1.3 Quantificação do RNA pelo método fluorimétrico..... 50
5.1.4 Síntese do DNA complementar..... 50
5.1.5 Amplificação do ácido nucléico viral.....51
5.1.6 Detecção por gel de agarose dos fragmentos amplificados.... 55
5.1.7 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados..... 56
5.1.8 Quantificação do DNA pelo Método Fluorimétrico..... 57
5.2 Sequenciamento de próxima geração "*Ion Torrrent*" 58
5.2.1 Fragmentação mecânica.....58
5.2.2 Reparo das extremidades do DNA..... 58
5.2.3 Purificação do DNA.....59
5.2.4 Ligação dos adaptadores.....59
5.2.5 Escolha do tamanho da biblioteca (E-Gel) 60
5.2.6 Quantificação da biblioteca..... 61
5.2.7 Preparo da PCR em emulsão..... 62
5.2.8 Enriquecimento..... 63
5.2.9 Reação de sequenciamento.....63
5.3 Processamento e filtragem das sequencias obtidas..... 63
5.4 Compilação e controle de qualidade das sequências e alinhamento.. 64
5.5 Relógio molecular global e filogenia do DENV4..... 65
5.6 Estimativa de propagação da epidemia usando o modelo de skyline de nascimento-morte..... 66
5.7 Modelo de dinâmica ento-epidemiológica.....66
5.7.1 Modelo de Equações Diferenciais Comuns..... 68
5.7.2 Transmissão viral..... 70
5.7.3 Parâmetros dependentes da temperatura..... 71
5.7.4 Parâmetros constantes..... 73
5.7.5 Ajustes nos parâmetros.....75

6 RESULTADOS.....78
7 DISCUSSÃO.....97
8 CONCLUSÕES.....103
REFERÊNCIAS..... 106

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O vírus Dengue (DENV) é o responsável por uma das mais importantes doenças transmitidas por vetores em todo o mundo, causando cerca de 390 milhões de infecções anualmente em mais de 100 países. As principais regiões endêmicas são África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental, levando a mais de 500.000 hospitalizações e causando mais de 25.000 mortes ao ano. Estima-se que mais de 3,51 bilhões de pessoas (40% da população mundial) estejam vivendo em regiões de risco (Figura 1)[1-3]. A distribuição geográfica dos tipos de DENV aumentou drasticamente nas últimas décadas[4], impulsionada pela expansão de sua principal espécie de vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, o crescimento da população humana, as viagens, o comércio internacional e a crescente urbanização nos trópicos e subtrópicos[5, 6].

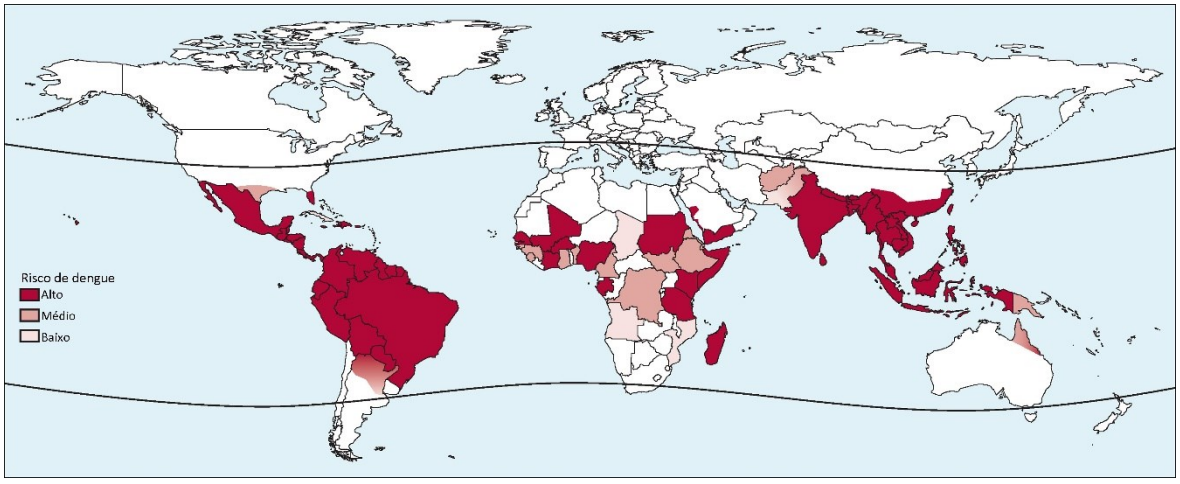


Figura 1 - Mapa com as regiões de risco para transmissão do DENV.
Fonte: adaptado[7].

1.1 Vírus Dengue

O agente etiológico da dengue é o DENV, um grupo de quatro sorotipos dentro do gênero *Flavivírius* que são intimamente relacionados, porém geneticamente e antigenicamente distintos[8, 9]. A hipótese mais aceita é de que eles possam ter evoluído independentemente de um ancestral silvestre entre 100-1500 anos atrás[3]. Os quatro sorotipos são conhecidos como tipos 1, 2, 3 e 4; os sorotipos são compostos de 20 genótipos (Figura 2).

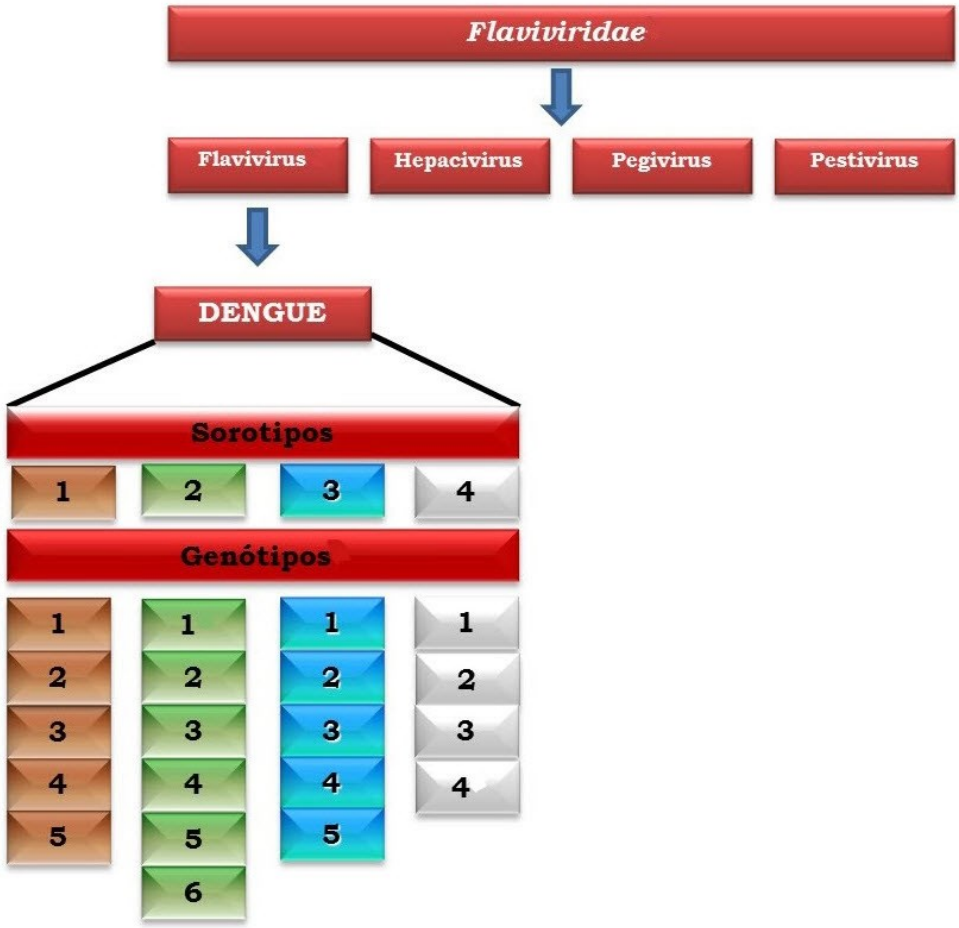


Figura 2 - Classificação taxonômica dos DENV's.
Fonte: Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus: classificação dos genótipos do sorotipo 1[10-12], sorotipo 2[13-17], sorotipo 3[18, 19] e sorotipo 4[11, 16].

1.1.1 Gênero Flavivírus

A família *Flaviviridae* é composta de quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. O DENV pertence ao gênero *Flavivirus*, que é composto por 53 espécies de vírus identificados[20]. O prefixo "*flavi*" é uma derivação do latim *flavus*, que significa "amarelo" denominado desta forma devido à icterícia observada em indivíduos com febre amarela[21]. Além do DENV existem inúmeros *Flavivírus* que também causam doenças no homem, destacando-se os vírus da febre amarela, encefalite japonesa (JEV), Nilo Ocidental (WNV), Rocio, encefalite de Saint-Louis, Zika, dentre outros[21]. Os flavivírus são predominantemente transmitidos por mosquitos e carrapatos, porém existem alguns sem vetores conhecidos[22]. O vírus da dengue foi um dos primeiros grupos classificados, quando então se dividiu os *Flavivírus* sorologicamente em oito complexos antigênicos, utilizando testes de neutralização cruzada[23]. Por outro lado, alguns vírus não se agruparam em nenhum complexo como, por exemplo, o da febre amarela[24].

Após serem sequenciadas, as reconstruções filogenéticas montadas a partir destes dados demonstraram concordância com a classificação dos complexos antigênicos. Revelou-se também um agrupamento claro do gênero *Flavivirus* em grupos transmitidos por vetores, sem vetores e diferenças claras entre os transmitidos por carrapatos e mosquitos[25]. Outro aspecto interessante foi que três vírus transmitidos por mosquitos se agruparam fortemente afastando-se dos demais: o dengue, o da febre amarela e o da encefalite japonesa[26].

A classificação da espécie dengue em quatro grupos denominados sorotipos com base em propriedades antigénicas, confirmou-se posteriormente através de dados moleculares, dados estes que também proporcionaram uma melhor

compreensão da herança filogenética dos quatro sorotipos: o 4 diverge a partir do primeiro ancestral comum, seguido pelo 3 e depois o 1 e 2[26].

1.1.2 Partícula viral

O DENV, como outros *flavivírus*, possui a forma esférica, medindo entre 40-60nm de diâmetro[27] e é composto por um nucleocápsideo com cerca de 30nm de diâmetro que contém o RNA viral[27, 28]. O nucleocápsideo é envolto pelo envelope, sendo este constituído por uma bicamada lipídica. A proteína do envelope que varia de 51.000 a 59.000 *daltons*, é utilizada na mediação da ligação, fusão, penetração na célula hospedeira. A proteína do envelope é glicosilada na maioria dos *flavivírus*, sendo exposta na superfície viral[28]. Imagens de microscopia eletrônica demonstraram que os DENV maduros são caracterizados por uma superfície relativamente lisa (Figura 3) e possuem 180 cópias da proteína do envelope formando uma espécie de andaime icosaédrico[27].

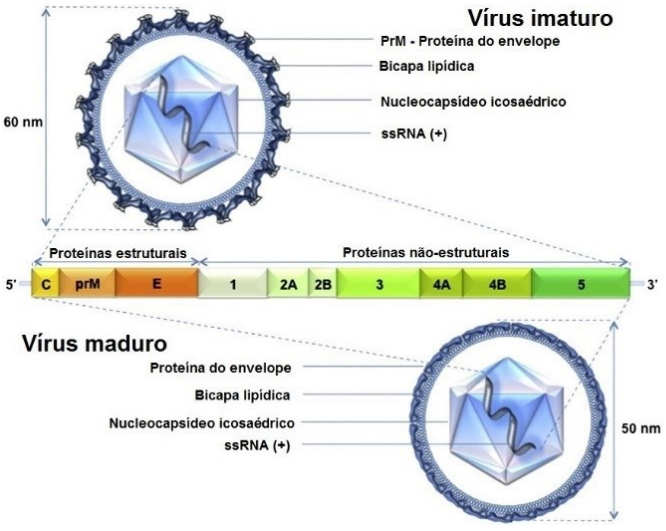


Figura 3 - Montagem esquemática dos DENV's[29].

1.1.3 Genoma viral

A organização genômica do DENV, e também de outros flavivírus, é relativamente simples em comparação com outros gêneros. O seu genoma consiste de uma molécula de RNA de fita simples, com polaridade positiva (*sense*) com cerca de 10.700 nucleotídeos de tamanho. O genoma conta apenas com uma única fase de leitura aberta (*ORF*), que codifica um precursor polipeptídico com cerca de 3.390 aminoácidos, que é processado cataliticamente em dez proteínas virais (Figura 03)[27, 28]. Não há nenhuma evidência de alternativas ou quadros de leitura sobrepostos traduzidos e ainda não há relatos da existência de região hipervariável como as relatadas no genoma de HCV[30]. O *ORF* é flanqueado por duas regiões terminais não codificantes porém bem conservadas em sequência e estrutura, contendo no *5'* cerca de 100 nucleotídeos e na *3'* cerca de 500 nucleotídeos. Estas regiões formam estruturas secundárias, possuindo importantes funções na circularização do genoma e em sua replicação[31]. A região *5'* possui um grupamento *cap tipo I* (*m7GpppAm*) e estruturas secundárias em formato de *loops,* na qual são abrigadas as regiões de sequências mais conservadas. Estes *loops* são separados por regiões com sequências *poli U*, do menor *loop* até o códon de iniciação *AUG*. A região *3'* se inicia após o códon de parada do gene *NS5* e possui entre 380-470 nucleotídeos de comprimento, sendo composta por três domínios. Ao contrário dos *mRNAs* celulares, os *Flavivírus* não possuem cauda *poli A* na extremidade 3'[31]. A circularização do genoma ocorre através de interações das regiões 5' e 3' que também são necessárias para a replicação envolvendo diversos elementos do RNA viral[32]. A poliproteína traduzida é clivada durante e após a tradução por proteases virais e do hospedeiro, em dez proteínas virais: três estruturais (*C*, capsídeo; *prM/M*, membrana e precursor da membrana; *E* do envelope) codificadas na extremidade 5' da *ORF* e sete não

estruturais (*NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B* e *NS5*) codificadas na extremidade 3' (Figura 4)[31].

1.1.4 Proteínas estruturais

Na extremidade *5'* são codificadas as proteínas estruturais do capsídeo que circundam o genoma viral, responsáveis pela formação do nucleocápsideo; as proteínas *prM* e *E* são incorporadas na bicamada lipídica e compõem o envelope viral. A clivagem da *prM* em *M* (membrana) é realizada por uma *furina* durante a liberação viral e tem sido demonstrada como um pré-requisito para a produção de partículas virais infecciosas[33]. Destas três proteínas estruturais a *E* vem sendo a mais estudada, uma vez que esta é a principal constituinte do envelope do vírus[33]. A proteína *E* é glicosilada em dois sítios (*Asn-67* e *Asn-153*), com funções de ligação do vírus a receptores e à membranas celulares. A glicoproteína *E* possui os principais epítopos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes[32]. Tais epítopos são encontrados também em menor grau na glicoproteína *M*[34].

1.1.5 Proteínas não-estruturais

Na extremidade *3'* do genoma viral são codificadas sete proteínas não-estruturais (NS), com vários tamanhos, sendo obedecida a seguinte ordem: *NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B* e *NS5*[27, 28, 34]. Algumas proteínas não-estruturais são conhecidas por serem multifuncionais, enquanto pouco se sabe sobre *NS1* e

NS*4B*. Um breve resumo das funções destas proteínas estão demonstrados na Figura 4[27, 28, 34].

Figura 4 - Montagem esquemática com as funções das proteínas virais[29].

1.1.6 Replicação viral

A exemplo de outros vírus de RNA de polaridade positiva, as regiões terminais não codificantes desempenham um papel fundamental na regulação, tradução e síntese de RNA viral[35]. Como nos poliovírus, a tradução ocorre simultaneamente à replicação do RNA[36, 37]. A replicação se inicia durante a tradução, através de ligação da *NS3* e *NS2A* em regiões conservadas da *NS5*[37]. Após a conclusão da tradução, o complexo de replicação parcialmente montado liga-se ao *3' UTR* do genoma através da *NS2A*, *NS3* e *NS5*[38] e é transportado para os locais de replicação membranosas (retículo endoplasmático)[39]. A replicação possui grande influência na patogênese e os níveis de viremia têm sido demonstrado como um grande cofator para a gravidade da doença[40, 41]. Mutações nas regiões *5'* e *3' UTRs* demonstraram uma redução na replicação viral *in vitro* em mosquitos e macacos e diminuição da

neurovirulência em ratos[42]. Apesar de ser composto por um RNA de cadeia positiva, a replicação ocorre através de um intermediário de cadeia negativa. O final *3'* da fita de polaridade negativa é fundamental para a síntese de RNA iniciador[43].

A infecção da célula alvo é mediada pela proteína *E* que irá realizar a ligação do vírus a receptores específicos presentes na superfície celular permissiva (células dendríticas, B, T, monócitos, hepatócitos e neuronais)[44]. Existem vários receptores utilizados pelo vírus da dengue identificados até o momento: sulfato de heparan, *CD14*, receptores *lamininas* de alta afinidade *37/67-kDa*, *GRP78/BiP* e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas *ICAM-3-grabbing*[45]. Após a ligação o vírus é internalizado por endocitose mediada pelo receptor, o baixo *pH* da via endossomal induz uma trimerização irreversível da proteína *E*, em consequência, passa então a mediar a fusão do envelope do viral com as membranas celulares. Após o desencapsulamento do nucleocapsídeo o genoma do vírus é liberado no citoplasma da célula infectada, onde é traduzido no retículo endoplasmático rugoso (RE), dando origem a uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada por uma combinação de proteases celulares e virais[45]. Após a tradução e processamento, um complexo de proteínas é montado a *NS5*, as proteínas NS acessórias, o RNA viral (+) e fatores celulares (complexo de replicação). A replicação se inicia com a síntese total do genoma *ssRNA* (-), que será então utilizado como molde para produção do *ssRNA* (+). Durante a transcrição, o recentemente sintetizado *ssRNA* (-) sofre emparelhamento de bases com a fita molde de RNA (+) que conduz a formação de um duplex de RNA chamado de forma replicativa. Ele funciona como um modelo para a geração de novos RNA(+), através de um intermediário de RNA replicativo sob a forma assimétrica e semiconservativa[45]. O recém produzido RNA (+) é liberado do RNA replicativo e dará início a um novo ciclo de tradução ou montagem de novos vírus que irão se formar no reticulo

endoplasmático. Para a maturação viral, é necessário a passagem através do Complexo de Golgi, onde ocorre a glicosilação das proteínas da membrana viral, bem como a clivagem proteolítica do precursor da proteína madura *M* (*prM*) nos componentes de *pr* e *M* pela *furina protease* residente no *Golgi*. A *prM* não clivada impede a ocorrência de uma transição ácida catalisada por *fusogênico* durante o trânsito através da via secretora, forma-se então um complexo heterodimérico *prM-E*. Depois da clivagem, a porção *pr* é liberada formando complexos homodiméricos e os vírus maduros saem da célula infectada (Figura 5)[45].

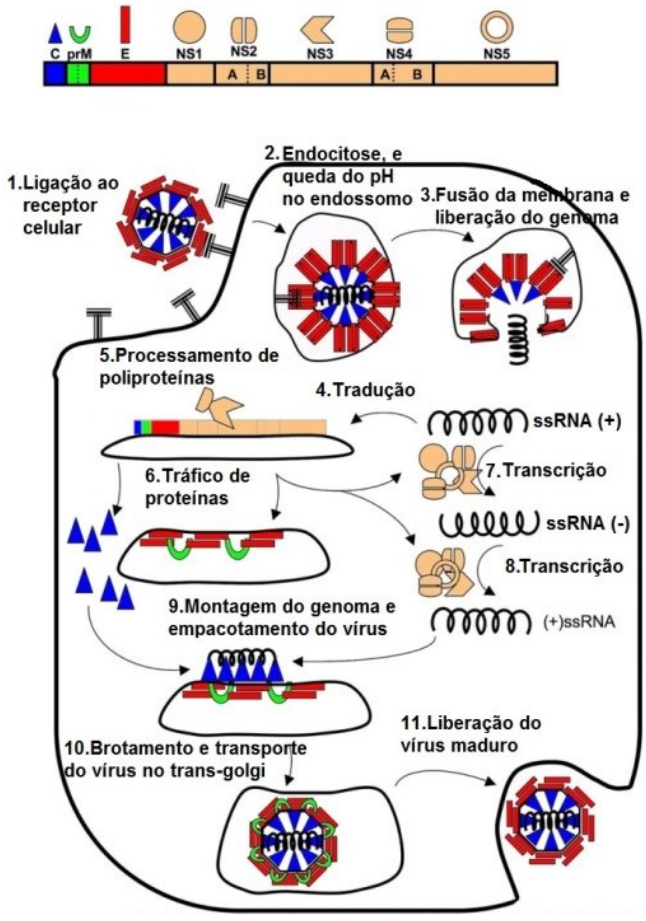


Figura 5 - Diagrama ilustrativo do ciclo replicativo dos DENV's[46].

1.1.7 Diversidade genética

Com base nas sequências disponíveis, atualmente é conhecido a existência de uma grande diversidade genética entre os DENV's[47]. Os fatores que contribuíram para esta diversidade são as implicações epidemiológicas, genéticas e susceptibilidade do hospedeiro (Figura 6)[47].

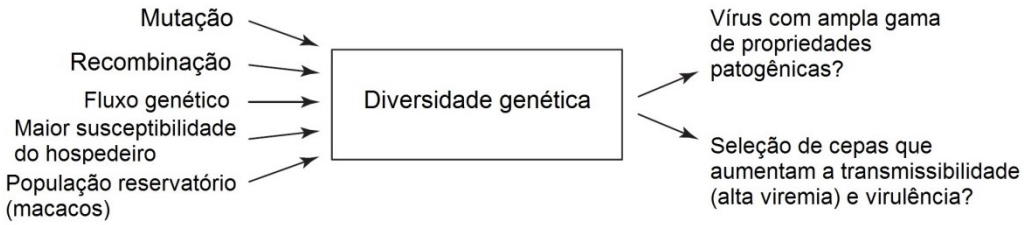


Figura 6 - Ilustração da possível origem da diversidade genética viral dos DENV's[47]

Para a maioria dos fins, os quatro sorotipos são geralmente tratados como o mesmo vírus, bem como sua patogênese. No entanto, as distâncias genéticas entre os quatro sorotipos são maiores do que as distâncias entre outras espécies de flavivírus como, por exemplo, o da encefalite japonesa (*JEV*), Nilo Ocidental (*WNV*), Usutu vírus (*USUV*) e da Encefalite de Saint Louis (*SLEV*). Com base nesta observação, foi proposto que os quatro sorotipos do DENV justificam a sua classificação em uma espécie[25, 47]. Os sorotipos da dengue podem ser classificados em vários grupos genéticos chamados de genótipos, com base na diversidade das sequências. Inicialmente os genótipos do dengue foram definidos como um grupo de vírus que não tinham mais de 6% de divergência de sequências dentro de uma

mesma região com 240 nucleotídeos (*E/NS1*) dos sorotipos 1 e 2[48]. Atualmente a atribuição de genótipos depende de análises filogenéticas definidas e não em tamanhos arbitrários, uma vez que os genótipos estão bem caraterizados e com diversas sequências de referência[16, 49, 50].

1.1.8 Sorotipo 1 e genótipos

O sorotipo 1 (DENV1) pode ser dividido em cinco genótipos com base nas sequências completas do gene *E*[48, 49, 51]. Os genótipos do DENV1 possuem uma grande área de distribuição: o I representa linhagens do Sudeste Asiático, China e Oriente Médio (Arábia Saudita); O II possui duas linhagens isoladas na Tailândia, nas décadas de 50 e 60, desde então não foram mais identificados, sugerindo sua extinção ou circulação com baixa frequência em nichos ambientais, levando a não detecção pelos sistemas de vigilância. O III foi identificado em linhagens isoladas na Malásia em 1972 e 2005; O IV representa as linhagens do Japão, Coréia, China, Mianmar, Malásia, Indonésia, ilhas do oeste do Pacífico (Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí) e Austrália. As linhagens oriundas do Caribe (1975 a 1985) também são incluídas neste genótipo que foi o principal responsável por epidemias no Pacífico entre os anos 2000 e 2004[49, 52]. O V é frequentemente isolado em epidemias nas Américas, oeste da África e Ásia e ainda em isolados das Ilhas dos arquipélagos do oceano Índico (Comorros, La Reunion e Seicheles)[53-55].

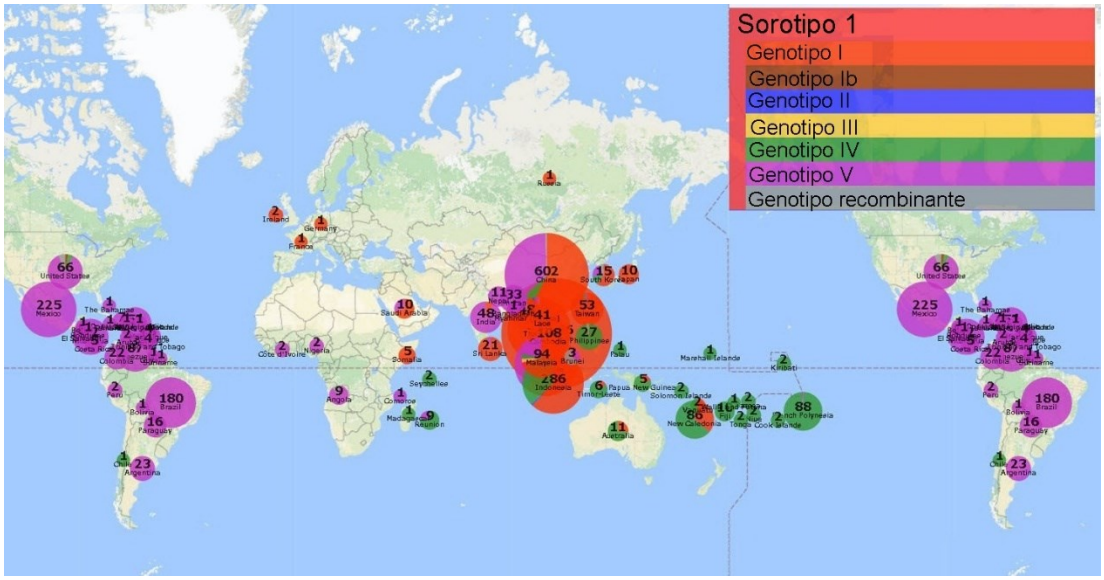


Figura 7 - Distribuição dos genótipos do sorotipo 1 no mundo, baseado nas sequencias disponíveis no Genbank[11].

1.1.9 Sorotipo 2 e genótipos

O sorotipo 2 (DENV2) é o mais estudado entre os DENV's, a caracterização dos seis genótipos foi baseada nas sequências completas do gene *E*[15]. O I (asiático I), identificado em cepas da Tailândia em 1964 (uma das cepas de referência foi isolada de um paciente com dengue grave), também é responsável por epidemias na Malásia, Camboja, Mianmar, Vietnã e Austrália. O II (asiático II) é o responsável por epidemias na China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México. Incluído neste genótipo está a cepa protótipo de Nova Guiné, isolada em 1944. O III (sudeste asiático/americano) é divido em dois grupos ou subgenótipos: um em que todas as cepas foram coletadas no Sudeste da Ásia e o outro em amostras coletadas na América Central, América do Sul e Caribe durante os últimos trinta anos. A primeira epidemia dengue hemorrágica nas Américas ocorreu em 1981, após uma introdução deste genótipo em Cuba[56]. O genótipo III tem sido relatado

como substituto do genótipo V (nas américas)[14], sendo considerado o de maior impacto epidemiológico[49]. O IV (cosmopolita) é distribuído em uma larga área geográfica, incluindo leste e oeste da África, Oriente Médio, subcontinente indiano, Ilhas do Pacífico e Austrália. O V (americano) são cepas oriundas das Américas Central e do Sul, Caribe e linhagens mais antigas coletadas no subcontinente indiano e ilhas do Pacífico. Por fim, o genótipo VI (silvestre) são linhagens isoladas de humanos, mosquitos arbóreos e primatas não-humanos, coletadas no Oeste da África e Sudeste Asiático. É considerado o mais geneticamente distinto, existindo como uma linha basal para todas as outras linhagens de DENV-2, o que reforça a hipótese de que ele representa o genótipo ancestral[11].

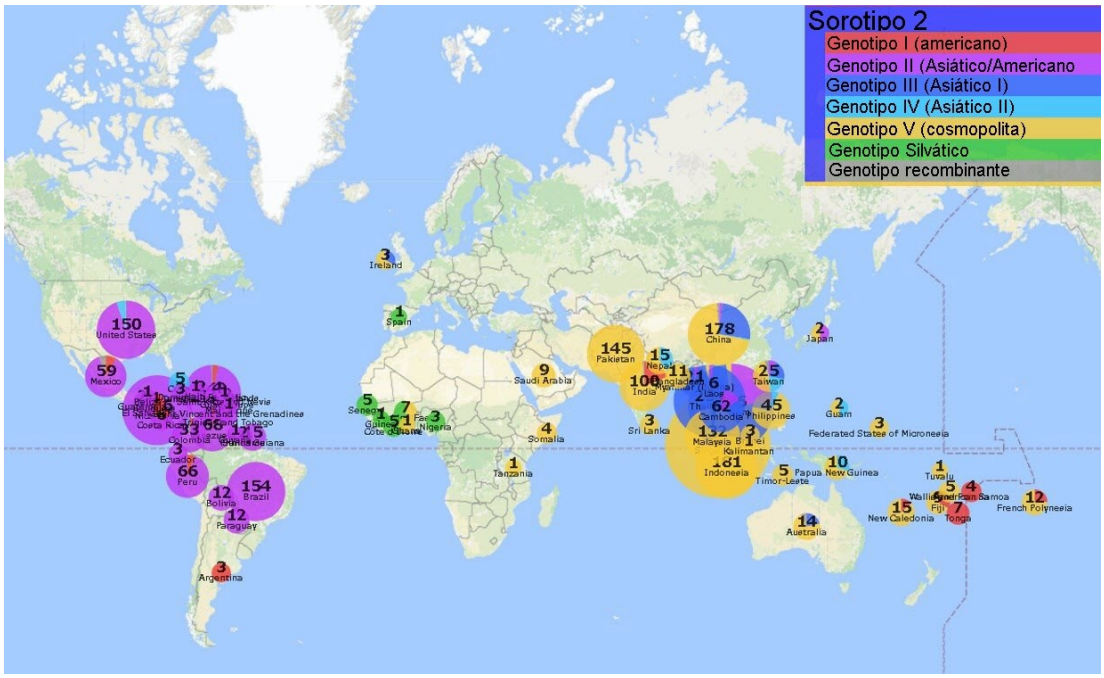


Figura 8 - Distribuição dos genótipos do sorotipo 2 no mundo, baseado nas sequencias disponíveis no Genbank[11]

1.1.10 Sorotipo 3 e genótipos

O sorotipo 3 (DENV3) segue a classificação baseada em sequências da *prM* e *E*[18, 19, 57]. O I foi identificado em áreas marítimas do Sudeste da Ásia como Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas, Taiwan e Ilhas do Pacífico Sul. O II é responsável por quase todas as cepas isoladas na Tailândia, de 1962 até as recentes epidemias. Foi a única linhagem detectada em Cingapura na epidemia de 1995 e na Indonésia em 1998; é o principal responsável por casos em Taiwan, Vietnã, Bangladesh, Camboja, China, Japão e Mianmar. O III é responsável por epidemias no Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Cingapura, Samoa, leste da África, América Central, América do Sul e Caribe. Foi introduzido nas Américas através da Nicarágua (1994) e é amplamente encontrado na América Central e do Sul[58-60], sendo considerado o mais virulento entre os genótipos do DENV3. O IV foi identificado em amostras em Porto Rico entre as décadas de 60 e 70, no Taiti, nos dias atuais, porém nunca foi associado com quaisquer epidemias de dengue hemorrágica[18]. O V é o responsável por epidemias nas Filipinas; também detectado em um isolado do Japão (1973), em linhagens da China (1987 e 2009) e do Brasil (2002 a 2004)[11].

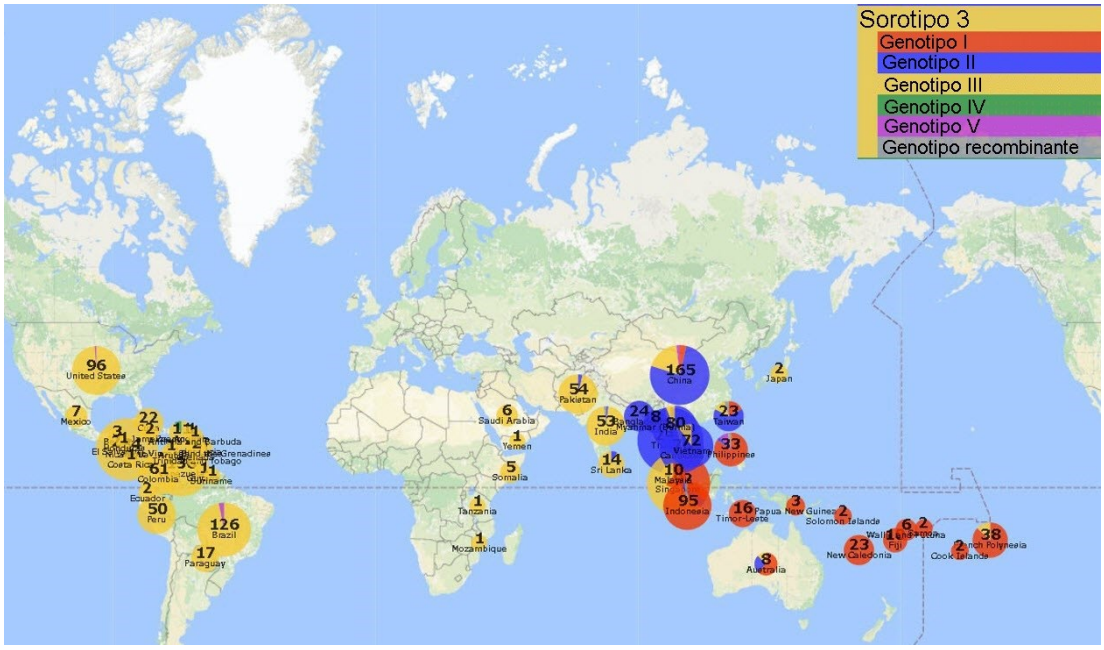


Figura 9 - Distribuição dos genótipos do sorotipo 3 no mundo, baseado nas sequencias disponíveis no Genbank[11]

1.1.11 Sorotipo 4 e genótipos

O sorotipo 4 (DENV4) foi, inicialmente, classificado em dois genótipos I e II a partir da sequência completa do gene *E*. O I representa isolados das Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia e várias amostras de casos importados do Japão, China e Brasil. O II possui dois grandes grupos com cepas de algumas regiões do Sudeste Asiático (Indonésia, Malásia e Cingapura), China, Ilhas do oeste do Oceano Pacífico, Austrália e um outro grupo com cepas do Caribe e Américas. Porém outros dois genótipos foram subsequentemente descritos, sendo IV encontrado apenas em primatas da Malásia na década de 70 e o III, encontrado apenas na Tailândia[61-63]. O II é o mais difundido dos quatro, após uma introdução no hemisfério ocidental em 1981, possivelmente através das ilhas do pacífico[61, 63]. Apesar do sorotipo 4 ser o menos frequente é, muitas vezes, associado às febres

hemorrágicas durante a infecções secundárias[40, 41]. Com exceção dos genótipos silvestres, a classificação genotípica pode revelar a origem geográfica da cepa viral, o que permitiu rastrear a rota de transmissão do vírus no espaço e tempo. Embasado nisso, estudos de epidemiologia molecular podem determinar se as epidemias de DENV são causadas pela introdução de novos vírus ou o resultado de cepas reemergentes[40, 41].

Figura 10 - Distribuição dos genótipos do sorotipo 4 no mundo, baseado nas sequencias disponíveis no Genbank[11]

As cepas silvestres dos quatro sorotipos são intimamente relacionadas e têm sido isoladas em vários países da África ocidental e na Malásia, dois locais distantes, sendo então levantada a hipótese de que a cepa ancestral haveria surgido na região da Ásia-Oceania antes de divergirem em quatro sorotipos conhecidos atualmente[17].

1.1.12 Aspectos clínicos e patogênese

Devido aos sintomas clínicos, a dengue tem se mostrado uma doença descrita como a ponta do *iceberg*, isto é, acredita-se que a maioria dos casos não são notificados[64]. Estudos relatam que menos de 10% dos casos de dengue seriam relatados, devido ao alto índice de infecções assintomáticas (50% a 90%)[65-69] (Figura 11).

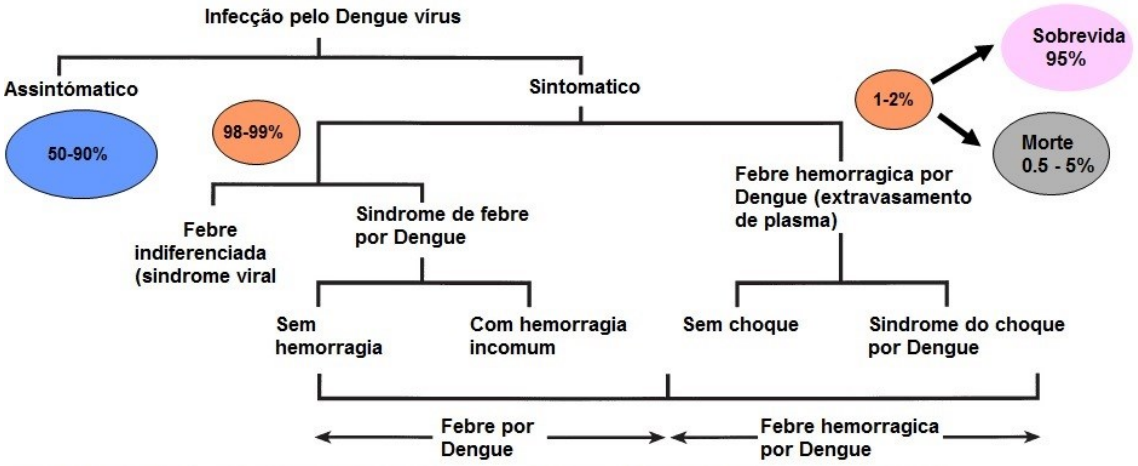


Figura 11 - Diagrama com os possíveis desfechos na infecção viral por DENV[65-69].

Os piores prognósticos da doença são a febre hemorrágica e a síndrome de choque por dengue. Estas duas complicações possuem pouca representatividade nos casos, tendo sua incidência variando significativamente nas infecções primárias e secundárias. A infecção secundária resulta quando, um indivíduo já infectado previamente por um sorotipo é exposto a um sorotipo diferente, este é o fator de risco mais importante para dengue grave segundo relatos da literatura[67-72]. Dados da Tailândia, com crianças menores de 15 anos de idade, demonstraram que 0,18% das infecções primárias e 2% de infecções secundárias apresentaram manifestações de

dengue hemorrágica ou síndrome de choque por dengue[64]. As infecções sintomáticas têm como sinais mais comuns: febre, fadiga, erupção cutânea, dor de cabeça, dor retro orbital, artralgia e mialgia, náuseas, vômitos e leucopenia. Casos mais extremos podem incluir hemorragias graves, perda de consciência e perda das funções hepáticas e cerebral[73]. A dengue hemorrágica é caracterizada pelo extravasamento de plasma, trombocitopenia e manifestações hemorrágicas, isso ocorre em decorrência do aumento da permeabilidade vascular. Acredita-se que sua causa se dá pela liberação de citocinas, devido à resposta imune (células T) das células infectadas[74]. A forma mais grave é a síndrome do choque por dengue, que inclui todos os sintomas da dengue clássica mais a hemorragia, somados a dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, agitação ou letargia e uma mudança súbita de febre para hipotermia com sudorese e prostração. O choque é causado pela pressão arterial extremamente baixa, podendo ocorrer o óbito de 24 a 48 horas[73].

1.1.13 Transmissão e diagnóstico

O período de incubação após a picada do mosquito pode variar de 3 a 14 dias. O indivíduo, posteriormente, entra no período febril, neste momento a viremia está em seu pico máximo. A viremia cessa de cinco a sete dias após o início da febre, coincidentemente com a defervescência. O choque e a dengue hemorrágica geralmente se desenvolvem neste período. A detecção do ácido nucleico viral, antígeno (NS1) e isolamento viral são recomendados em até cinco dias após início

da febre (viremia). Após a defervescência, o diagnóstico laboratorial é baseado em detecção de anticorpos *IgG* e *IgM* (Figura 12)[75].

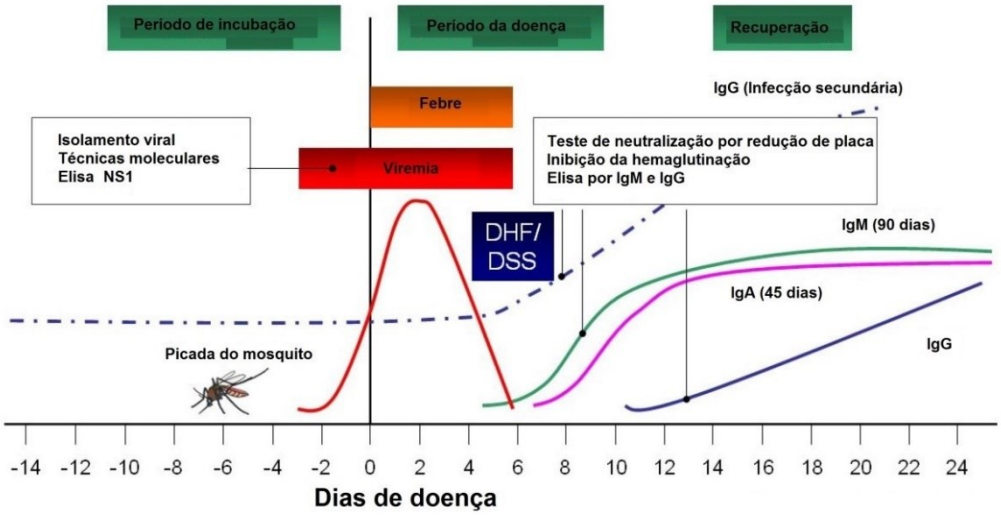


Figura 12 - Diagrama com os testes sorológicos e moleculares utilizados[7, 76].

1.1.14 Infecções secundárias

A infecção por um sorotipo confere resistência ao longo da vida e uma breve proteção contra os demais[77]. Porém, dados epidemiológicos de alguns estudos sugerem que a imunidade adquirida, após o contato com o vírus (conferindo assim proteção cruzada contra os demais), aumenta a probabilidade de um indivíduo desenvolver dengue hemorrágica quando infectado por um segundo sorotipo[78, 79]. A hipótese para explicar esse fenômeno, chamado de intensificação dependente de anticorpos (*ADE*), propõe que os anticorpos neutralizantes pré-existentes da infecção primária e o segundo sorotipo de dengue, formam complexos que se ligam a células que possuem o receptor (*FcyR*) presente em *monócitos* e *células B*, levando a uma maior absorção de vírus por estas células[80].

1.2 Epidemiologia do DENV no Brasil

O Brasil, um país com dimensões continentais e clima propício a propagação do *Aedes aegypti*, tem na dengue um grave problema de saúde pública. Nos últimos anos, apesar dos grandes esforços do governo brasileiro, as epidemias têm ocorrido de norte a sul do país (Figura 13).

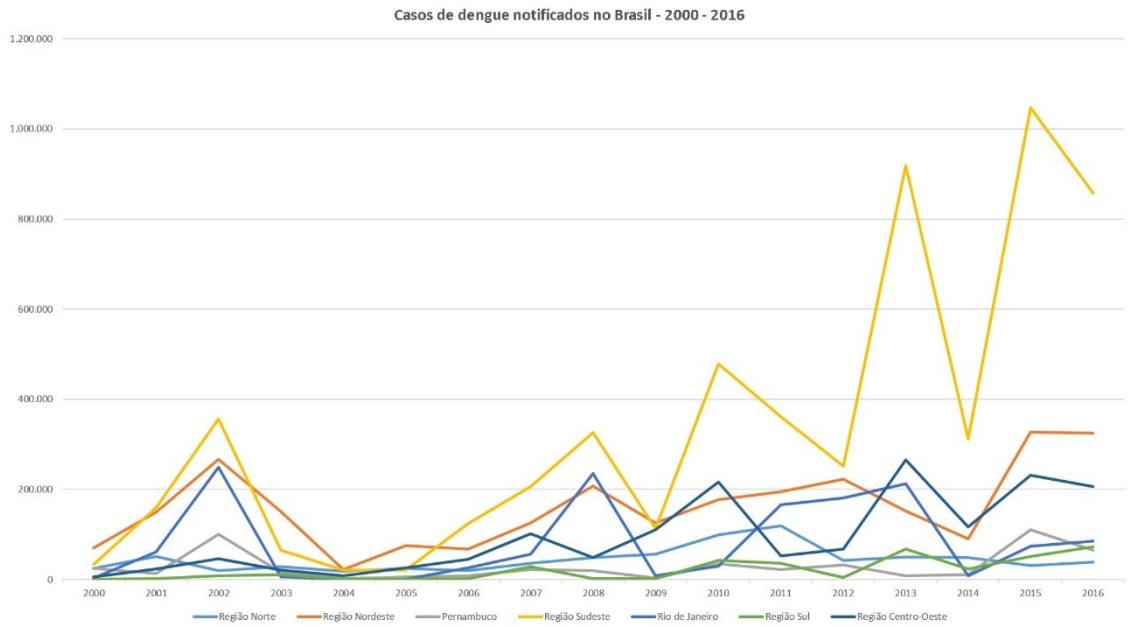


Figura 13 - Casos de dengue notificados nos últimos 16 anos no Brasil[81].

Outro aspecto que torna importante pesquisas sobre a epidemia de dengue em nosso país é a circulação simultânea dos quatro sorotipos. Sendo que a partir de 2012, houve um crescimento significativo do DENV4 e uma redução do DENV3 (Figura 14 e 15).

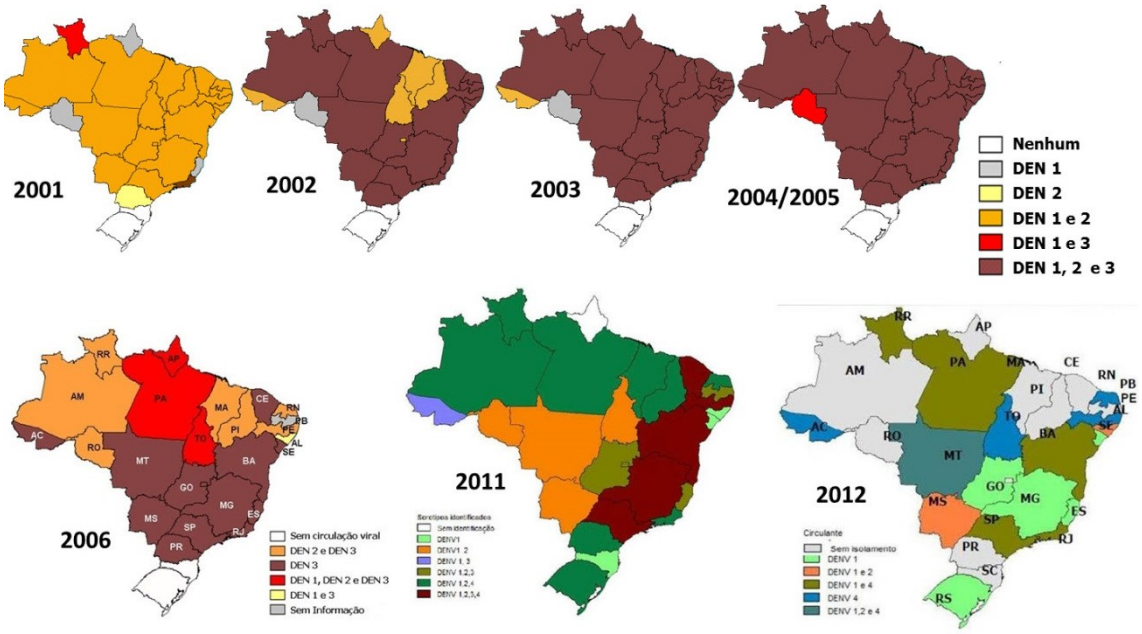


Figura 14 - Distribuição dos sorotipos do DENV caracterizados no Brasil entre 2001 e 2012[81].

O primeiro relato do DENV4 genótipo II (DENV4-II) no Brasil ocorreu em 1981-1982 em Boa Vista, capital de Roraima[82]. Após um surto limitado, o DENV4 esteve ausente do país até 2005-2007, quando foi detectado no estado do Amazonas[82]. Em 2010, o DENV4 foi encontrado novamente em outros estados do norte e nordeste brasileiro[83]. No entanto, foi apenas em 2012 que o DENV4-II causou grandes surtos em estados mais densamente povoados do Brasil como Rio de Janeiro (RJ) e Pernambuco (PE).

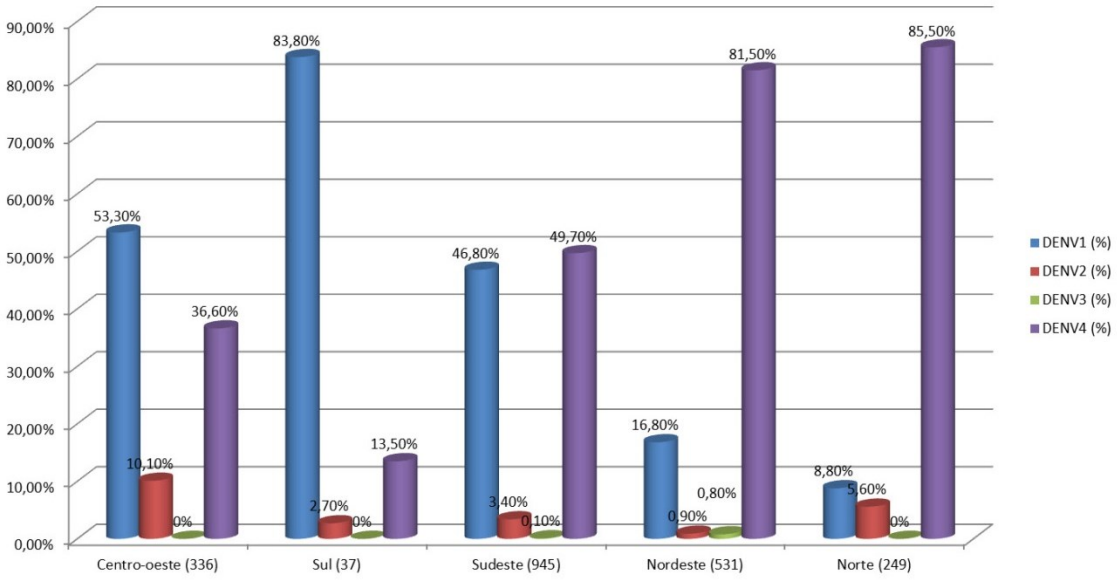


Figura 15 - Distribuição dos sorotipos de DENV em 2012, em parênteses o número de amostras testadas[81].

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da alta incidência de infecção pelo DENV, há informações limitadas sobre o que impulsiona o potencial de sua transmissão e a disseminação espacial de novas linhagens, uma vez que a maioria dos estudos epidemiológicos depende de relatos de casos clínicos que raramente discriminam a infecção pelo sorotipo e, às vezes, são confundidos por infecções causadas por outros arbovírus como por exemplo Chikungunya[84], Zika[85] e Mayaro[86]. Muitas investigações atuais da dinâmica do DENV que não exploram completamente as informações contidas nas sequências do genoma sobre a introdução, invasão e persistência do vírus e relatam apenas dados de casos transversais, enquanto dados longitudinais são necessários para uma investigação detalhada da dinâmica populacional viral. O rastreamento de doadores de sangue, combinado com a análise retrospectiva de cepas de vírus circulantes, representa uma abordagem alternativa valiosa para a caracterização epidêmica e a detecção precoce de flavivírus recém-emergentes[87-90]. Para entender a ecologia e a epidemiologia evolutiva dos surtos explosivos de DENV4 no Brasil, foram selecionados doadores e receptores de sangue em duas grandes cidades brasileiras, Rio de Janeiro e Recife, que sofreram surtos significativos de dengue em 2012. O município do Rio de Janeiro é um importante destino turístico, com um dos maiores portos das Américas. Possui redes aéreas, rodoviárias e ferroviárias bem conectadas, onde as populações de *Aedes spp*. são altamente susceptíveis ao DENV[91]; o Rio de Janeiro tem desempenhado um papel fundamental na disseminação nacional de vários sorotipos de dengue, incluindo DENV1 em 1986[92], DENV2 em 1990[93] e DENV3 em 2000[94].

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Realizar a caracterização molecular do genoma completo do vírus da DENGUE;

Avaliar tendências evolutivas que possam estar ocorrendo na epidemia brasileira, comparando nossos achados com os pré-existentes na literatura;

CASUÍSTICA

4 CASUÍSTICA

A casuística utilizada foi proveniente do estudo, intitulado "*Prevalência de dengue em doadores e receptores de sangue brasileiros: índice de transmissão por transfusão e resultados clínicos de infecção por dengue em receptores*" (*Dengue virus incidence and prevalence in brazilian donors and recipients, rates and correlates of transfusion-transmission, and clinical outcomes of infection in recipients - REDS-III, Brazil*). Trata-se de um estudo multicêntrico coordenado pela Dra. Ester Cerdeira Sabino (Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil).

Este projeto utilizou amostras coletadas no momento da doação de sangue em doadores provenientes do HEMORIO (Estado do Rio de Janeiro) e HEMOPE (Estado de Pernambuco). Para recrutamento dos receptores foram incluídos no estudo um hospital no Rio de Janeiro e dois em Pernambuco. As amostras dos doadores foram coletadas no período de 15 de fevereiro a 14 de junho de 2012 e os receptores no período de 01 de março de 2012 a 15 de junho de 2012, sendo distribuídos conforme a Figura 16.

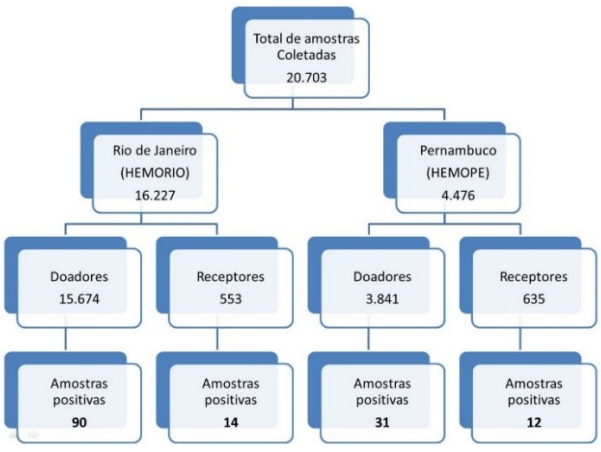


Figura 16 - Diagrama com a casuística do projeto

METODOLOGIA

5 METODOLOGIA

5.1 Processamento das amostras

5.1.1 Coleta, preparação e triagem das amostras

Todas as amostras foram coletas no *PPT™ Tubo de preparação de Plasma* (*BD Vacutainer®*), armazenadas em freezer -20° C e posteriormente enviadas em gelo seco para o *Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo*.

As amostras foram aliquotadas de forma automatizada no *Microlab® Star Liquid Handling Workstation* (*Hamilton Robotics, Inc.*), este aparelho realiza a distribuição do conteúdo do tubo de coleta em alíquotas menores de forma automatizada, uma vez que contenham código de barras.

` Após a aliquotagem, as amostras foram enviadas para o Blood Systems Research Institute, San Francisco, CA, EUA, para realização do teste de detecção do RNA viral. A detecção foi realizada com a técnica de amplificação mediada por transcrição *Dengue TMA assay, NAT blood screen* (*Procleix Tigris system, Chiron Corp*). Esta metodologia é extremamente sensível para todos os sorotipos do DENV, detectando 14.9 (1), 18.3 (2), 13.0 (3) e 16.4 (4) cópias por mL com uma sensibilidade de 95%[95].

5.1.2 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada com o *QIAamp UltraSens Virus Kit, Handbook* (QIAGEN, Lake Constance GmbH, Stockach, Germany).

Em todos os procedimentos foi utilizado controle negativo (amostra clínica) e positivo (vírus isolado por cultura) e todas as instruções do fabricante foram rigorosamente seguidas.

5.1.3 Quantificação do RNA pelo método fluorimétrico

Para avaliar a extração e estimar a concentração de RNA (ng/µL) utilizou-se o fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com o kit "Qubit® RNA HS Assay Kit" (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Este equipamento permite a quantificação de DNA, RNA e proteínas, utilizando corantes fluorescentes. Estes corantes são específicos para cada tipo de biomolécula, mesmo em baixas concentrações, conferindo a esta metodologia uma alta especificidade e sensibilidade.

5.1.4 Síntese do DNA complementar

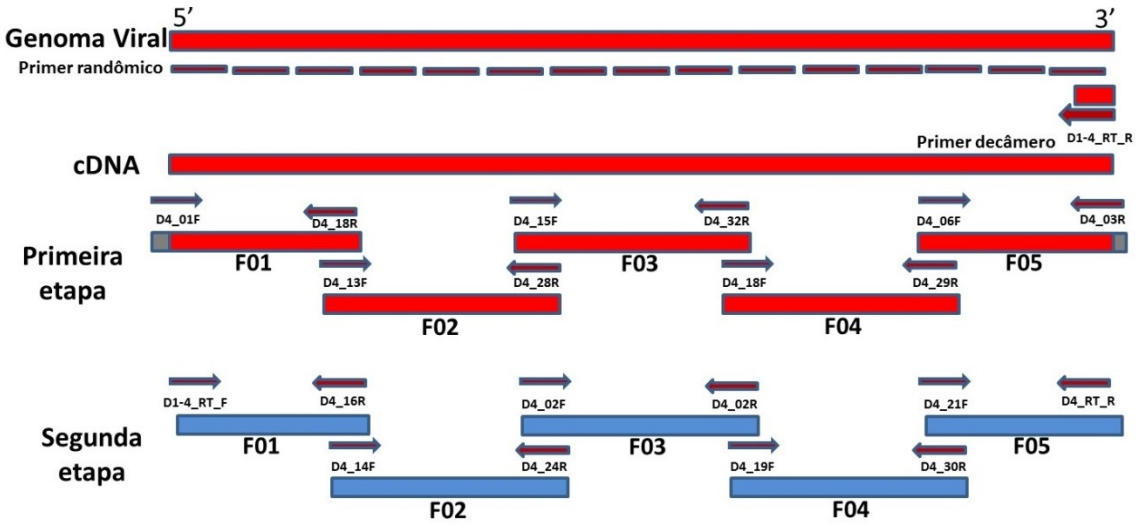
Para síntese do cDNA, foi utilizado um iniciador com 10 nucleotídeos (decâmero) com bases degeneradas, capazes de se ligar a região 3' de todos os

DENV's. Para a síntese de cDNA, foi adicionado em um tubo vazio 8μl de 5X RT Buffer (20mM tris HCl, 50mM KCl, 5mM $MgCl^2$, pH:8,3) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 3μl de DTT (dithiothreitol) a 0,1M (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 1μl de primer decamero 100nmol/μl (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 1μl de primer randômico hexamero 100nmol/μl (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 1μl de dNTP's (desoxirribonucleotídeos fosfatados) a 10mM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 1μl de SuperScript® III (enzima que realiza a transcrição reversa) 200U/μl (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); 1μl de RNaseOUT® (inibidor de ribonucleases) 40U/μl (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), perfazendo um volume total de 16μl. Após a solução preparada, foi então transferida para tubos individuais e adicionado 16μl do RNA total extraído das amostras. Então, foi feita uma leve agitação nos tubos para homogeneizar a solução final e, depois, uma breve centrifugação. Este procedimento foi realizado em uma estante gelada com o intuito de não haver degradação do RNA e dos reagentes. Os tubos foram então incubados a 65°C por 1 minuto, 30°C por 15 minutos, 50°C por 270 minutos e 70°C por 15 minutos; foi adicionado 1µL de *RNase H* e incubou-se a 37°C por 20 minutos. Os tubos foram armazenados em freezer -80°C.

5.1.5 Amplificação do ácido nucléico viral

A amplificação do genoma completo viral foi realizada em cinco fragmentos e em duas etapas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados estão descritos na Figura 17 e na Tabela 1. Para as extremidades do genoma viral, foram utilizados iniciadores com extremidades maiores na primeira

etapa, sendo possível utilizar na segunda etapa os mesmos iniciadores sem extremidades.



Tamanho e posição dos fragmentos da primeira etapa

Fragmento 01	Fragmento 02	Fragmento 03	Fragmento 04	Fragmento 05
-17 - 3484	2446 - 5142	3439 - 7723	5454 - 9251	7242 - 10670
3501bp	**2696bp**	**4287bp**	**3797bp**	**3428bp**

Tamanho e posição dos fragmentos da segunda etapa

Fragmento 01	Fragmento 02	Fragmento 03	Fragmento 04	Fragmento 05
1 - 3345	2884 - 4994	4830 - 7331	5982 - 8704	7800 - 10649
3345bp	**2110bp**	**2501bp**	**2722bp**	**2849bp**

Figura 17 - Diagrama ilustrativo com os iniciadores, posição e tamanho dos fragmentos amplificados

Tabela 1 - Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de cDNA, amplificação e sequenciamento do genoma viral.

Nome	Sequência 5' - 3'*	Posição
D1-4_RT	GRWTCAACRC	10640 – 10649
D1-4_RT	AGTTGTTAGKCTACGTGGAC	1 – 20
D4_RT	AGAACCTGTTGGATCAACAAC	10629 – 10649
D4_01F	GATGAGGGAAGATGGGGAGTTGTTAGTCTGTGTGGACCGAC	-17 – 24
D4_01R	TGGTTGATCTRAYTCCACAGAC	2583 – 2604
D4_02F	GGRAAAAATCCYAAACATGTCC	4830 – 4851
D4_02R	ACYTGCCCTAATTGYTTTTCAAA	7309 – 7331
D4_03F	AAAGAYATYCCGCAGTGGGAACC	9630 – 9652
D4_03R	TTTGTCGGTCTGGGGGGGTATAGAACCTGTTGGATCAACAAC	10629 – 10670
D4_04F	CTCCRTGYAAAGTCCCCATAGAGA	1930 – 1953
D4_05F	CYCACTGGACAGAAGCAAAGATG	5981 – 6003
D4_06F	AGRACAGCTGCTGGGATCATGA	7225 – 7246
D4_04R	TGTGRAARTGGTGGGAGCAAAA	9687 – 9708
D4_05R	TTCCTTGAGTTCGTRCCRATCC	2332 – 2353
D4_06R	CATTATGCCCTCGTTRAGRGGCC	4138 – 4160
D4_07R	TCTTTGCTTCTGTCCAGTGRGC	5980 – 6001
D4_07F	TCGGAAGCTTGCTTAACACA	40 – 59
D4_08F	CTCCGTGTAAAGTCCCCATAGAGA	1930 – 1953
D4_09F	AGRACAGCTGCTGGGATCATGA	7225 – 7246
D4_10F	AACAAATGCACYCTYATTGCCA	534 – 555
D4_11F	TTTGAACTGACYAAGACAACAGC	1065 – 1087
D4_12F	GYTCCATTGGCAAGATGTTTGAG	2125 – 2147
D4_13F	GGGTTGTGTGGTGTCATGGA	2429 – 2448
D4_14F	AGGTGGAAGACTATGGATTTGG	2884 – 2905
D4_15F	GGAGATTAGGCCCTTGAGTGAAAA	3422 – 3445
D4_16F	TGGCTTGGAGGACCATTATGG	3964 – 3984
D4_17F	TCAGGTCTCTACCCCTTGGC	4452 – 4471
D4_18F	GAAATGGGAGAGGCAGCAGC	5437 – 5456
D4_19F	CACTGGACAGAAGCAAARATG	5983 – 6003
D4_20F	TGGCTAGTGGCTTRCTYTGG	6647 – 6666
D4_21F	CTTGGYTGYGGGAGAGGAGG	7800 – 7819
D4_22F	GCACAAAGAAACCTGGCAYTATGA	8423 – 8446
D4_23F	CCGAGCAATCTGGTAYATGTGG	8975 – 8996
D4_24F	AAAGACATYCCGCAGTGGGA	9630 – 9649
D4_25F	GACAAGACTCCAGTCCATTCGTG	10041 – 10063
D4_26F	GCCATGCGCCACGGAAGCTGT	10381 – 10401
D4_08R	TCATRAGGGGTTCRCCRTCTCT	456 – 477
D4_09R	GTYTCCARTCCCATTCCTGA	735 – 754
D4_10R	TGTGRAARTGGTGGGAGCAAAA	9687 – 9708
D4_11R	ACYTGCCCTAATTGCTTTTCAAA	7309 – 7331
D4_12R	CCATYCTCTCTTTRTRATTC	1631 – 1650
D4_13R	AAYTTTCCYGARCACATCGT	1836 – 1855
D4_14R	CAYGAGACYCCYCCAAACAT	2277 – 2296

Continua...

...Continuação

D4_15R	TTTCCAGYCTNGTGGTTGATC	2596 – 2616
D4_16R	GTRGTGGTYCTCAAAGATGG	3309 – 3328
D4_17R	TGAYTTRACCATGTTCTCTTC	3447 – 3467
D4_18R	ACCATTAGYGCTGTCTCTCT	3771 – 3790
D4_19R	GAGTGCTGTTATTTCTACCCA	4050 – 4070
D4_20R	CAAACCCACAGCCATTATGCC	4152 – 4172
D4_21R	GTTATGTCTGCCATTTCATCCC	4315 – 4336
D4_22R	CCAGTGAAGCACCATTCCCG	6202 – 6221
D4_23R	ATTGATTGTCTTGTGGGGTCC	6758 – 6778
D4_24R	TTGGTRAACYACTCCATTTCC	4974 – 4994
D4_25R	TGGGTGTCTCCATTGTGGACTG	1363 – 1384
D4_26R	TTTCCCRAAYAACCCTCTTTGC	4601 – 4622
D4_27R	TCAACTGGATHACTYTCTTTCCCG	5667 – 5680
D4_28R	TTGTCTTTCCRGCTCCGGGGT	5105 – 5125
D4_29R	CATCTGTTCYGTGATCAGTTCYTCA	9209 – 9233
D4_30R	ARCCAATTGGCTGTCGTGGT	8685 – 8704
D4_31R	GARTTCCTGGAYARCGGGCA	8184 – 8203
D4_32R	CCATCTYTYAGGGCAGACTTGG	7685 – 7706
D4_33R	TTCCGATCAGRTTCCTGACCTG	10170 – 10191

∗ As posições são baseadas na sequência de referência do Dengue vírus 4 (Genbank nº NC_002640). As sequências foram modificadas para abranger todos os genótipos conhecidos.

As reações de primeira e segunda etapa da PCR foram realizadas com um volume final de 25μl e 50μl respectivamente. As quantidades e concentrações dos reagentes encontram-se na Tabela 2.

Na segunda etapa foi utilizado 5µl da primeira etapa. Esta transferência foi realizada em aparelho de fluxo laminar e os tubos foram abertos com papel para evitar o risco de contaminação.

Tabela 2 - Relação de reagentes e concentrações utilizados nas duas etapas para amplificação do RNA viral.

Reagentes (concentrações)	Quantidade por reação	
	Primeira	**Segunda****
Água ultrapura*	14,3µl	33,6µl
Tampão Tris (10x)*	2,5µl	5µl
$MgCl^2$ (50mM)*	1µl	2µl
dNTP's (10mM)*	0,5µl	1µl
Primer sense (10 pmol/µl)	0,75µl	1,5µl
Primer antisense (10 pmol/µl)	0,75µl	1,5µl
Taq DNA Polimerase (5U/µl)*	0,2µl	0,4µl
Cdna	5µl	5µl
Volume final	25µl	50µl

Legenda: *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; **Na segunda etapa foram utilizados os amplicons gerados na primeira.

As amplificações das duas etapas ocorreram no aparelho GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), nas seguintes condições: denaturação inicial a 95º C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95º C por 45 segundos, 58º C por 60 segundos, 72º C por 4 minutos e extensão final de 72º C por 15 minutos. Estas condições de ciclagem foram aplicadas nas duas etapas para todos os fragmentos. Utilizamos controles positivos e negativos para avaliar a presença de contaminação e qualidade da reação. Os produtos amplificados foram armazenados em freezer -20º C até o momento de detecção por *gel de agarose*.

5.1.6 Detecção por gel de agarose dos fragmentos amplificados

Para preparação do gel de *agarose* a 1% (peso/volume), foram adicionados em um frasco erlenmeyer de 200ml de tampão TBE 1X composto de Tris 0,090M (Nice-Synth Chem, Ningbo, China), Ácido Bórico 0,090M (Nice-Synth Chem, Ningbo, China) e EDTA 0,002mM (Nice-Synth Chem, Ningbo, China) com pH 8,0 e 2 gramas

de *agarose* ultrapura (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os reagentes foram levemente homogeneizados, submetidos a aquecimento no forno micro-ondas por aproximadamente quatro minutos (tempo necessário para a fusão da *agarose*), formando-se então uma solução transparente e homogênea. Após breve resfriamento, foi adicionado 3µl de brometo de etídio (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), obedecendo todos os critérios de biossegurança devido à toxicidade do reagente. Após polimerização da *agarose*, o gel foi adicionado na cuba de eletroforese. Então, aplicado 2µl da amostra e 1µl de corante BlueJuice® Gel Loading Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a fonte foi ajustada para 120 volts por 50 minutos. Utilizamos como marcadores o controle positivo e o marcador de peso molecular High Mass Ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após a finalização da corrida, foi retirado o gel e visualizado em fonte de luz ultravioleta de 320nm em transluminador e fotodocumentador.

5.1.7 Purificação dos fragmentos de DNA amplificados

Na purificação foi utilizado o *QIAquick® PCR Purification Kit* (QIAGEN, Lake Constance GmbH, Stockach, Germany); aos 45µl do produto foi adicionado 250µl do buffer PB (tampão de ligação). Foi homogeneizado em agitador de tubos por 15 segundos e, em seguida, foi realizada uma breve centrifugação. Depois, o conteúdo do tubo foi transferido para coluna de sílica e, então, centrifugado durante 60 segundos a 8000rpm. O tubo coletor foi descartado; a coluna foi inserida novamente em outro tubo, adicionando-se 750µl do *buffer PE* (tampão concentrado de lavagem com etanol) e centrifugada novamente por dois minutos a 12000rpm. A seguir, o tubo

coletor foi descartado e a coluna foi inserida em um novo tubo e centrifugada novamente a 12000rpm por dois minutos (este procedimento foi realizado para eliminar o excesso de etanol). O tubo coletor foi descartado e a coluna inserida em um tubo de 1.5ml para eluição do produto, para isso foi adicionado 40µl do tampão de eluição (10mM Tris Cl; 0.5mM EDTA; pH 9.0) no centro da coluna e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Por fim, foi centrifugado a 14000rpm por cinco minutos.

5.1.8 Quantificação do DNA pelo Método Fluorimétrico

Para se estimar a concentração (ng/µL) dos fragmentos amplificados utilizou-se o fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com o kit "Qubit® dsDNA HS Assay Kit" (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foi necessário calcular a concentração dos fragmentos, uma vez que os mesmos foram misturados em um único tubo para iniciar o preparo das bibliotecas. A concentração total dos cinco fragmentos em um único tubo foi de 90ng a 100ng. A diluição das amostras em quantidades equimolares permitiu uma total cobertura das regiões-alvo.

5.2 Sequenciamento de próxima geração "*Ion Torrrent*"

5.2.1 Fragmentação mecânica

Esta metodologia permite a quebra das moléculas em diversos tamanhos através de sonicação. O tubo contendo o produto amplificado e purificado a uma concentração de 100ng, foi colocado no Bioruptor® UCD-200 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e mantido no gelo durante a fragmentação. Os parâmetros do aparelho foram ajustados para fragmentação de bibliotecas entre 400 e 500pb, permanecendo por 15 minutos. Ao final, os tubos foram retirados do rotor e mantidos em gelo.

5.2.2 Reparo das extremidades do DNA

Após a fragmentação é necessário a realização de uma purificação. O volume foi ajustado com água livre de nucleases em q.s.p. 79µl e transferido para um tubo especial LoBind® (não permite interação entre as moléculas de DNA e o plástico). Neste tubo foi adicionado ainda 20µl de 5X End Repair Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 1µl de "End Repair Enzyme" (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), estes reagentes são utilizados para reparar as pontas do DNA. A reação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente.

5.2.3 Purificação do DNA

Foi adicionado 180µl do reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, EUA) - esferas magnéticas - à amostra e misturado vigorosamente com a pipeta por cinco vezes. Depois, procedeu-se com uma breve centrifugação e incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Incubou-se o tubo com amostra na MagnaRack™ Magnetic Separation Rack (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) - estante magnética - durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e desprezado cuidadosamente sem desprender o precipitado. Sem remover o tubo, foi adicionado 500µl de álcool 70% recém-preparado à amostra. Incubou-se durante 60 segundos, girando o tubo por 3 vezes na estante magnética (objetivando a limpeza do DNA). Após a solução apresentar-se límpida, foi removido e desprezado o sobrenadante sem desprender o precipitado, este procedimento foi repetido por duas vezes. O tubo foi brevemente centrifugado; depois foi colocado na estante magnética e cuidadosamente, com o auxílio de uma micropipeta de 20µl, removeu-se qualquer volume de sobrenadante remanescente. Manteve-se o tubo na estante magnética para a secagem do precipitado. Retirou-se o tubo da estante magnética e adicionou-se 25µl de Low TE (tampão de eluição) à amostra. A mistura foi homogeneizada e em seguida procedeu-se com uma breve centrifugação e o tubo foi novamente recolocado na estante magnética por dois minutos. Retirou-se o sobrenadante e, finalmente, foi transferido para um novo tubo LoBind de 1.5ml.

5.2.4 Ligação dos adaptadores

Nesta etapa foi realizada a ligação dos adaptadores (nucleotídeos que serão ligados à "*bead"* magnética da "micela" para realização da PCR em emulsão) e, por

tratar-se do sequenciamento de várias amostras simultâneas, foi necessário a adição de um *barcoding* (sequência de 10 nucleotídeos que identifica a amostra). Em um tubo de PCR de 0.2ml, combinou-se os seguintes reagentes por amostra e homogeneizou-se bem com o auxílio da pipeta.

Tabela 3 - Relação de reagentes utilizados para ligação dos adaptadores e identificadores (*barcoding*) das amostras.

Componentes	Volume
DNA	25 µL
10X Ligase Buffer	10 µL
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress™ *Barcoding* *	2 µL
dNTP Mix	2 µL
Água Livre de Nucleases	49 µL
DNA Ligase	2 µL
Nick Repair Polymerase	8 µL
TOTAL	100

*Foram utilizados 64 *barcodings por corrida;*

A reação foi colocada no aparelho termociclador a 25ºC por 15 minutos, 72ºC por 5 minutos e 4ºC por tempo indeterminado. A reação foi retirada do aparelho e transferida para um tubo LoBind® e novamente foi realizada outra purificação conforme descrito anteriormente.

5.2.5 Escolha do tamanho da biblioteca (E-Gel)

Nesta etapa selecionou-se o tamanho dos fragmentos a serem sequenciados, para isso foi adicionado 20µl da amostra em um dos poços na parte superior do gel. Para se definir o tamanho utilizou-se o 50bp DNA Ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Nos poços inferiores do gel foi adicionado 25µl de água livre de nuclease. No aparelho E-Gel, selecionou-se o programa *run sizeSelect 2%* e programou-se o

tempo em 20 minutos. Monitorou-se apropriadamente a banda de interesse, visualizando a corrida periodicamente. Ao final, foram adicionados mais 10µl de água livre de nuclease nos poços e recolhidos 30µl.

5.2.6 Quantificação da biblioteca

As bibliotecas foram diluídas em 1:20, 1:2000 e 1:20.000. Foram preparados os reagentes Ion Library TaqMan® qPCR Mix**.** Para a reação da qPCR foram utilizados 15µl e 5µl de cada diluição da biblioteca, do padrão e do controle negativo. A placa foi selada, centrifugada e levada ao aparelho de PCR em Tempo Real 7500 Fast System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Utilizou-se o seguinte programa: 50°C por 2 minutos, 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos.

Ao final da reação, foi necessário calcular o fator de diluição da amostra (escolhe-se o "*Cycle Threshold*" apropriado conforme curva padrão). O cálculo realizado foi baseado na seguinte fórmula:

TDF=[(quantificação relativa qPCR) × (diluição da biblioteca da amostra)]/0.32

Exemplo:

A quantificação relativa da diluição 1:20,000 de uma biblioteca foi de 0.014, logo: TDF = [(0.014) × 20,000]/0.32 = 875. Portanto, para um valor TDF de 875, a biblioteca da amostra foi diluída em 1:875 em Low TE.

5.2.7 Preparo da PCR em emulsão

Nesta etapa os fragmentos da biblioteca são adicionados às micelas com "*beads*" e reagentes, para que ocorra a amplificação clonal. Em um tubo LoBind® 1.5ml foram adicionados os seguintes componentes, na ordem em que aparecem na tabela a seguir:

Tabela 4 - Relação de reagentes utilizados para preparo da PCR em emulsão das amostras.

Componentes	Volume
Água Nuclease-Free	25 µL
Ion PGM™ Template OT2 200 Reagent Mix	500 µL
Ion PGM™ Template OT2 200 PCR Reagent B	300 µL
Ion PGM™ Template OT2 200 Enzyme Mix	50 µL
Biblioteca diluída	25 µL
Total	900 µL

A solução descrita acima foi adicionado o Ion PGM™ Template OT2 200 Ion Sphere™ Particles (ISPs), homogeneizando-a completamente, sendo posteriormente submetida a uma filtragem no filtro de reação "Ion PGM™ OneTouch Plus Reaction Filter Assembly", que foi propriamente instalado no Ion OneTouch™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após 16 horas, a corrida foi finalizada e o filtrado foi retirado.

5.2.8 Enriquecimento

Esta etapa consiste em selecionar apenas as "*beads*" com DNA ligado. Para este procedimento utilizou-se uma tira com 8 tubos, nos quais o aparelho lava a "*bead*" com DNA (adaptador) e ao final do processo restarão somente as mesmas.

5.2.9 Reação de sequenciamento

Foi planejada a corrida no *torrent browser*, depois realizada a limpeza, inicialização do aparelho e checagem do chip. Foi necessário preparar a amostra adicionando 5µl do "*Control Ion Sphere™ Particles*" diretamente à amostra recém-enriquecida. Adicionou-se 12µl de "*Sequencing Primer*", assim a solução ficou com volume final de 27µl. Levou-se ao aparelho termociclador por 95ºC durante 2 minutos e 37ºC durante 2 minutos com a opção "aquecer a tampa". O tubo foi removido do termociclador e adicionou-se 3µl de "*Ion PGM™ Sequencing 400 v2 Polymerase*", obtendo um volume total de 30µl e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Este volume foi inserido no chip e em seguida se iniciou o sequenciamento.

5.3 Processamento e filtragem das sequencias obtidas

Os dados foram então descartados de acordo com a qualidade (99% de cobertura) e o comprimento (sequências <30pb foram removidas) de cada leitura

utilizando o *software Geneious* R7 (Biomatters)[96]. As sequências de iniciadores utilizados para PCR foram também removidas. O tamanho médio dos fragmentos lidos foi de 303bp e somente foram aceitas bases com qualidade superior ao valor phred 20 (≥Q20). Foram descartados aproximadamente 5.5MB de dados em cada chip devido a não detecção do *barcoding*. As sequências remanescentes foram então utilizadas no mapeamento das leituras em uma sequência de referência do DENV4 do *GenBank* utilizando o *Geneious*. Foi gerada a sequência de acordo com um consenso de maioria (seleciona-se cada base que aparece na maioria das vezes naquela posição)[96]. As sequências foram então examinadas para assegurar que o mapeamento não tenha gerado uma sequência consenso tendenciosa.

5.4 Compilação de dados, controle de qualidade das sequências e alinhamento

Cento e cinquenta e três genomas completos de DENV4, disponíveis publicamente no *Genbank* com sequências >8000bp, foram adquiridos em fevereiro de 2015. As sequências geradas neste estudo foram adicionadas a este conjunto de dados global de DENV4. O alinhamento das sequências foi realizado com MAFFTv.7[97]. Após a edição manual do alinhamento[98], foi estimado uma árvore de máxima verossimilhança (ML) (n = 244) usando o software RAxML e o modelo reversível de tempo geral com taxas de distribuição gama (GTR+Γ)[99].

O *software* TempEst foi utilizado para inspecionar o sinal do relógio molecular na filogenia e para identificar potenciais contaminantes[100]. Os sorotipos e genótipos de DENV foram classificados utilizando o software *Dengue, Zika e Chikungunya*

Viruses Typing Tool v.0.9. (http://bioafrica2.mrc.ac.za/rega-genotype-alpha/aedesviruses/typingtool/)

5.5 Relógio molecular global e filogenia do DENV4

As filogenias calibradas no tempo foram geradas usando a estrutura Bayesiana do método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC), implementadas no pacote BEAST v.1.8.2[101]. A biblioteca BEAGLEv.2[102] foi usada para aumentar a velocidade computacional e uma árvore ML foi usada como árvore inicial. Para buscar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos, foi usado o "path-sampling" e "stepping stone" (com comprimento de cadeia de 10 milhões e 100 etapas) usando um subgrupo de 40 isolados escolhidos aleatoriamente do grupo de dados global[103]. O GTR+Γ mostrou-se mais adequado que os modelos HKY e o TN93. Para modelar as mudanças no tamanho efetivo da população ao longo do tempo, foram utilizados dois modelos coalescentes não-paramétricos, um modelo Bayesian Skygrid[104] com 50 pontos de grade e um modelo bayesiano de skyline com 10 grupos[105]. A amostragem de MCMC foi realizada em duplicata em 250 milhões de passos e a convergência das cadeias foi inspecionada usando *Tracer v.1.6*[105]. Depois de remover 10% dos passos, log e arquivos de árvore foram combinados a um clado de máxima credibilidade (MCC). A árvore foi então gerada usando o TreeAnnotator[106].

5.6 Estimativa de propagação da epidemia usando o modelo de *skyline* de nascimento-morte

Para estimar as mudanças na propagação da epidemia através do tempo, usamos o modelo bayesiano skyline de nascimento-morte (BDSKY)[107] implementado no BEAST2[108]. Neste modelo, cada infecção pode ser transmitida a uma taxa λ e torna-se não infecciosa a uma taxa δ. Ao se infectar, cada indivíduo é amostrado com uma probabilidade *s* e incluído no conjunto de dados. O modelo permite estimativas por partes de Re (o número efetivo reprodutivo do surto), δ e *s* através do tempo. Assumimos que a proporção de amostragem *s* é constante ao longo do tempo. Utilizando esta suposição, para permitir que o parâmetro *s* seja zero em períodos em que nenhum dado de sequência estava disponível, resultou em tendências semelhantes para Re com intervalos de confiança Bayesianos maiores. A taxa δ foi modelada utilizando um *lognormal* a "*priori*", com uma média de 14 dias e um desvio padrão de 0,5, o que corresponde aproximadamente à soma do período de incubação intrínseco e extrínseco do DENV. A análise BDSKY foi realizada para 3 cadeias MCMC independentes, de 20 x 106 passos, com parâmetros e árvores sendo amostradas uma vez a cada 20000 passos. Após a remoção de 10% das estimativas, os parâmetros amostrados foram combinados usando LogCombiner[106].

5.7 Modelo de dinâmica ento-epidemiológica

Para modelar a dinâmica diária das infecções pelo DENV4-II na cidade do Rio de Janeiro, utilizou-se a modelagem Bayesiana MCMC previamente utilizada no

primeiro surto DENV1 na Ilha da Madeira[109]. Para DENV4-II, utilizamos os números de casos positivos de fevereiro a julho de 2012 da coorte REDS-III no Rio de Janeiro. Os dados de temperatura semanal foram obtidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia/RJ. Esta abordagem usa equações diferenciais ordinárias (ODE) para descrever a dinâmica da infecção dentro das populações humanas e de mosquitos. Supõe-se que a população humana seja totalmente susceptível antes da introdução de DENV4 e de tamanho constante ao longo do período de observação. Após a picada infecciosa do mosquito, os indivíduos entram na fase de incubação, tornando-se mais tarde infecciosos e, finalmente, recuperando-se e obtendo imunidade ao longo da vida. Para realizarmos a dinâmica das populações de mosquitos, estes foram divididos em dois estágios de vida: fêmeas aquáticas e adultas. Sendo que, os mosquitos adultos são ainda divididos em estágios epidemiologicamente relevantes para a transmissão de DENV: suscetíveis, incubáveis e infecciosos. Seguindo a abordagem utilizada por[109], o modelo ODE tem oito parâmetros entomológicos que são dependentes da temperatura: taxa de transição aquático para adulto, taxa de mortalidade aquática, taxa de mortalidade de adultos, taxa de oviposição, período de incubação, probabilidades de transmissão por mordida infecciosa e taxa de sucesso de incubação. Este modelo estima quatro parâmetros desconhecidos: o tempo do primeiro caso humano, a capacidade de suporte aquático e dois fatores lineares utilizados para escalonar os efeitos da temperatura na mortalidade e no período de incubação dos mosquitos. Outros cinco parâmetros não são estimados pelo modelo, porém são considerados como dependentes da temperatura, para os quais foram utilizadas estimativas baseadas na literatura (taxa de picadas do mosquito, período de incubação humana, período infeccioso humano, razão de sexo do mosquito e taxa de observação do doador)[110, 111].

5.7.1 Modelo de Equações Diferenciais Comuns

O modelo de Equações Diferenciais Comuns (ODE) é a abordagem de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foram adaptados do estudo proposto anteriormente para o estudo do surto de dengue em 2012 na ilha da Madeira[109]. Modificamos a estrutura para flexibilizar os principais pressupostos de modelagem sobre a razão de sexo do mosquito e o sucesso na incubação dos ovos e também transformamos os quadrados mínimos originais baseados em MCMC em MCMC Bayesiano. A dinâmica da infecção dentro da população humana é definida nas equações 1-5. Em resumo, pressupõe-se que a população humana tenha tamanho constante (N) e seja totalmente suscetível antes da introdução de uma linhagem do vírus da dengue. Após a ocorrência de picadas de mosquito infeccioso, $\lambda^{v \to h}$, os indivíduos entram na fase de incubação (E^h)com duração média de $1/\gamma^h$ dias, tornando-se posteriormente infecciosos (I^h) durante $1/\sigma^h$ finalmente recuperando (R^h) com imunidade ao longo da vida.

$$\frac{dS^h}{dt} = -\lambda^{v \to h} \quad (1)$$

$$\frac{dE^h}{dt} = \lambda^{v \to h} - \gamma^h E^h \quad (2)$$

$$\frac{dI^h}{dt} = \gamma^h E^h - \sigma^h I^h \quad (3)$$

$$\frac{dR^h}{dt} = \sigma^h I^h \quad (4)$$

$$N = S^h + E^h + I^h + R^h \quad (5)$$

Para a dinâmica da população de mosquitos (equações 6-10), os indivíduos são divididos em dois estágios de vida pertinentes: aquáticos (ovos, larvas e pupas, *A*) e fêmeas adultas V como em[112]. Os adultos são ainda divididos em estágios epidemiologicamente relevantes para a transmissão do vírus da dengue: S^v susceptível, E^v incubado, $1/\dot{\gamma}^v$, por dia e infeccioso I^v. O ponto é usado para

distinguir fatores entomológicos dependentes da temperatura (mais detalhes a seguir).

$$\frac{dA}{dt} = \dot{c} f \dot{\theta}_A^v \left(1 - \frac{A}{K}\right) V - (\dot{\epsilon}_A^v + \dot{\mu}_A^v) A \quad (6)$$

$$\frac{dS^v}{dt} = \dot{c} f \dot{\theta}_A^v \left(1 - \frac{A}{K}\right) V - (\dot{\epsilon}_A^v + \dot{\mu}_A^v) A \quad (7)$$

$$\frac{dE^v}{dt} = \lambda^{h \to v} - \dot{\gamma}^v E^v - \dot{\mu}_V^v E^v \quad (8)$$

$$\frac{dI^v}{dt} = \dot{\gamma}^v E^v - \dot{\mu}_V^v E^v \quad (9)$$

$$V = S^v + E^v + I^v \quad (10)$$

Aqui, o coeficiente $\dot{c}$ é a fração de ovos que transformam-se em larvas e f a proporção feminina resultante. Por simplicidade e falta de quantificações para as populações de mosquitos locais, pressupõe-se que a razão de sexo permanece de 1:1 (i.e. f = 0,5). Além disso, $\dot{\epsilon}_A^v$ é a taxa de transição de estágios aquáticos para adultos, $\dot{\mu}_A^v$ a mortalidade aquática, $\dot{\mu}_V^v$ a mortalidade adulta, e $\dot{\theta}_A^v$ é a taxa intrínseca de oviposição. O termo logístico $1 - \frac{A}{K}$ pode ser entendido como a capacidade ecológica de receber ovos, escalados por um termo de capacidade de suporte K. Das equações 6-10, definimos o número médio de descendentes viáveis produzidos por uma fêmea durante o seu tempo de vida, ou seja, o número de descendentes básico Q, foi derivado da equação 11. A maioria dos parâmetros que definem Q são dependentes da temperatura, e para uma temperatura fixa foram derivadas expressões T_0 para os tamanhos de população esperados de cada estágio de vida de mosquito modelado, que são usados para inicializar a população de vetores (equações 12-13).

5.7.2 Transmissão viral

Em relação ao tipo de hospedeiro infectado considerado, as taxas de incidência de vetor para humano ($\lambda^{v\to h}$) e de humano para vetor ($\lambda^{h\to v}$) são, respectivamente, dependentes da densidade e da frequência (equações 14-15). E, *a* é a taxa de picada e $\dot{\theta}^{v\to h}$ e $\dot{\phi}^{h\to v}$ são as probabilidades de transmissão de vetor para humano e de humano para vetor por picada. Conceitualmente, isto implica que (i) o aumento na densidade de vetores infecciosos deve aumentar diretamente o risco de infecção para um único ser humano, enquanto (ii) o aumento na frequência de seres humanos infectados aumenta o risco de infecção de um mosquito picando a uma taxa fixa. O número reprodutivo básico (R_0) é definido de forma semelhante às abordagens de modelagem anteriores (equação 16)[110, 111], e o número de reprodução efetiva (R_e) é derivado de novo (equação 17). Para (R_e), a relevância da imunidade de rebanho é clara a partir do fator $\left(\frac{S^h}{N^h}\right)\left(\frac{S^v}{N^h}\right)$, que modula a diferença para (R_0). Quando a população é totalmente suscetível, $\frac{S^h}{N^h} = 1$ e $\left(\frac{S^v}{N^h}\right)$=$\left(\frac{V}{N^h}\right) = M$ e, portanto, (R_0) = (R_e), caso contrário (R_0) ≠ (R_e).

$$\lambda^{v\to h} = \left(\frac{a\dot{\phi}^{v\to h} I^v S^h}{N^h}\right) \propto I^v \qquad (14)$$

$$\lambda^{h\to v} = \left(\frac{a\dot{\phi}^{h\to v} I^h S^v}{N^h}\right) \propto \frac{I^h}{N^h} \qquad (15)$$

$$\dot{R}_0 = \frac{(V/N^h)(S^v/N^h)a^2\dot{\phi}^{h\to v}\dot{\gamma}^v}{\dot{\mu}_V^v \sigma^h(\dot{\gamma}^v+\dot{\mu}_V^v)} \qquad (16)$$

$$\dot{R}_e = \frac{(S/N^h)(S^v/N^h)a^2\dot{\phi}^{v\to h}\dot{\phi}^{h\to v}\dot{\gamma}^v}{\dot{\mu}_V^v \sigma^h(\dot{\gamma}^v+\dot{\mu}_V^v)} \qquad (17)$$

5.7.3 Parâmetros dependentes da temperatura

Para cada um dos parâmetros entomológicos dependentes da temperatura (Tabela 5), as expressões polinomiais dependentes da temperatura são encontradas de novo ou retiradas de estudos anteriores, nas quais a temperatura é considerada tanto em Celsius (T) quanto em Kelvin T_k e a constante universal de gás R é obtida com $cal\ deg^{-1}mol^{-1}$. As expressões para as taxas de mortalidade ($\dot{\mu}_A^v, \dot{\mu}_V^v$), de aquático para adulto ($\dot{\epsilon}_A^v$) e oviposição ($\dot{\theta}^v$) foram obtidas do estudo de Yang e colaboradores em experimentos com temperatura controlada em populações de Aedes aegypti (Equações 17-20)[112]. A relação entre o período de incubação extrínseca ($1/\gamma_V^v$) e a temperatura foram retiradas da formulação utilizada por Focks e colaboradores[113], o que pressupõe que a replicação é determinada por uma única enzima controla a taxa (equação 21)[113-115]. As probabilidades de transmissão por mordida de mosquito ($\dot{\phi}^{h\to v}$, $\dot{\phi}^{v\to h}$) são modeladas na equações 22-23 como em Lambrechts e colaboradores[116]. E por fim, estima-se a relação entre temperatura e fração de ovos com sucesso ($\dot{c}$) de novo (equação 24), ajustando um polinômio de terceiro grau aos dados empíricos de Aedes aegypti e Aedes albopictus Figura 18.

Tabela 5 - Parâmetros dependentes da temperatura. Todas as expressões, exceto o sucesso de eclosão de ovos (ver Figura 18) foram obtidas de trabalhos publicados.

Anotação	Descrição
$\dot{\epsilon}_A^v = \dot{\epsilon}_A^v\ (T)$	Taxa de transição de vida aquática para mosquito adulto[112, 117]
$\dot{\mu}_A^v = \dot{\mu}_A^v(T)$	Taxa de mortalidade no estágio de vida dos mosquitos aquáticos[112, 117]
$\dot{\mu}_V^v = \dot{\mu}_V^v(T)$	Taxa de mortalidade do estágio de vida do mosquito adulto[112, 117]
$\dot{\theta}_V^v = \theta_V^v(T)$	Taxa de oviposição intrínseca do estágio de vida do mosquito adulto[112, 117]
$\dot{\gamma}_V^v = \gamma_V^v(T)$	Período de incubação extrínseca da fase de vida do mosquito adulto[113]
$\dot{\phi}^{h\to v} = \phi^{h\to v}(T)$	Probabilidade de transmissão por picada infecciosa do humano para o vetor[112, 113, 117]
$\dot{\phi}^{v\to h} = \phi^{v\to h}(T)$	Probabilidade de transmissão por picada infecciosa do vetor para o humano[116]
$\dot{c} = c(T)$	Eclosão de ovos com sucesso, descrito na Figura 18

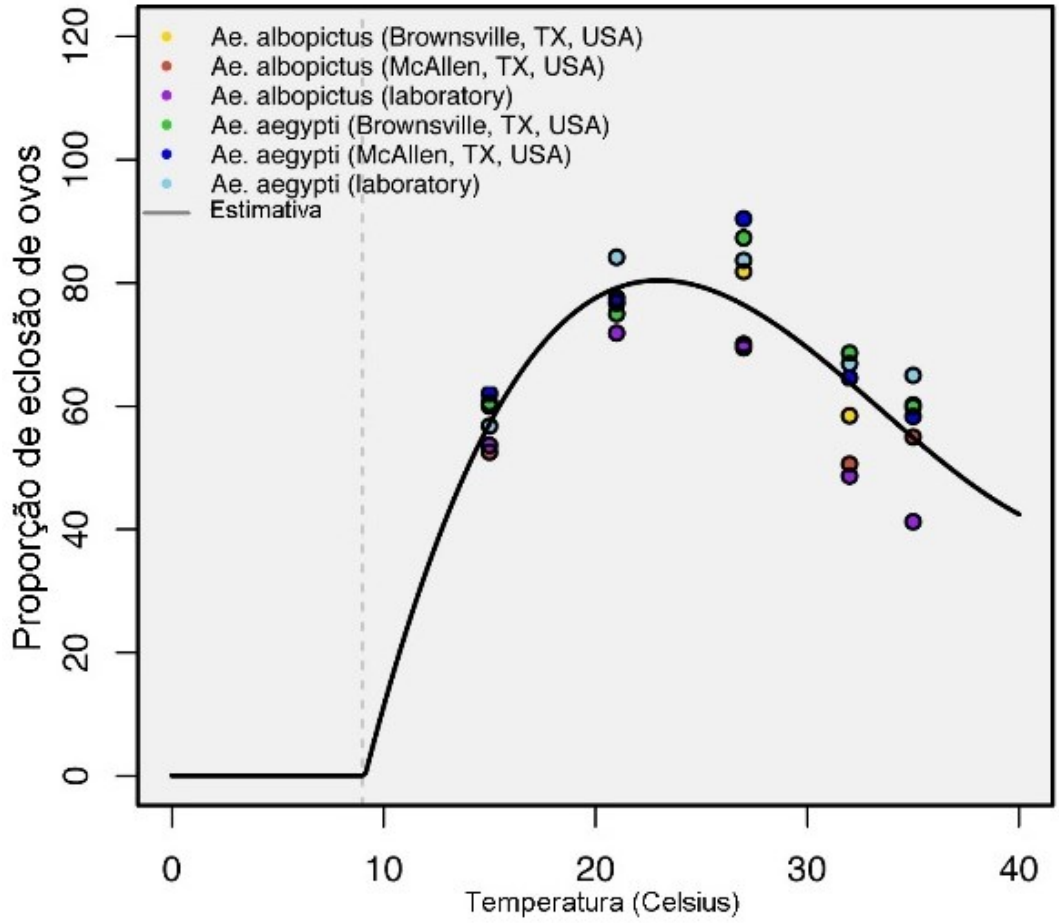


Figura 18 - Relação entre temperatura e o sucesso na incubação dos ovos. Dados empíricos sobre o sucesso de incubação de ovos de Aedes aegypti e Aedes Albopictus ($\dot{c}$) foram extraídos de[116]. Os dados incluem medições de eclosão para 5 temperaturas diferentes acima de 15 Celsius, incluindo 2 populações selvagens e 1 de laboratório para cada uma das espécies-vetor. Adaptação implementada com um polinómio de terceiro grau em R (encontrado nos resultados). Ao modelar, as proporções negativas abaixo de 10 Celsius são corrigidas manualmente para zero (à esquerda da linha cinza sombreada)

$$\dot{\epsilon}_A^v = \dot{\epsilon}_A^v\,(T) = 0.131 - 0.05723T + 0.01164T^2 - \ 0.001341T^3 + 0.00008723T^4 - 0.000003017T^5 + 5.153\times 10^{-8}T^6 - 3.42 \times 10^{-10}T^7 \quad (18)$$

$$\dot{\mu}_A^v = \ \dot{\mu}_A^v(T) = 2.13 - 0.3797\mathrm{T} + \ 0.02457T^2 - 0.0006778T^3 + 0.000006794T^4 \quad (19)$$

$$\dot{\mu}_V^v = \dot{\mu}_V^v(T) = 0.8692 - 0.1599\mathrm{T} + 0.01116T^2 - 0.0003408T^3 + 0.000003809T^4 \quad (20)$$

$$\dot{\theta}_V^v = \theta_V^v(T) = -5.4 + 1.8T - 0.2124T^2 + 0.01015T^3 - 0.00001515T^4 \quad (21)$$

$$\dot{\gamma}_V^v = \gamma_V^v(T) = \frac{0.003359\frac{T_k}{298}\times exp\left(\frac{15000}{R}\left(\frac{1}{298}-\frac{1}{T_k}\right)\right)}{1+exp\left(\frac{6.203\times 10^{21}}{R}\left(\frac{1}{-2.176\times 10^{30}}-\frac{1}{T_k}\right)\right)} \quad (22)$$

$$\dot{\phi}^{h\to v} = \phi^{h\to v}(T) = 0.001044T \ \times \ (T - 12.286) \times \ (32.3461 - T)^{1/2} \quad (23)$$

$$\dot{\phi}^{v\to h} = \phi^{v\to h}(T) = 0.0729T - 0.97 \quad (24)$$

$$\dot{c} = c(T) = (-184.8 \ + 27.94T - \ 0.9254T^2 + 0.009226T^3)/100 \quad (25)$$

5.7.4 Parâmetros constantes

A estrutura descrita acima tem apenas 5 parâmetros fixos que não são dependentes da temperatura nem estimados na abordagem MCMC (Tabela 6). Dentre estes, a taxa de observação de doadores de sangue (ς) representa a proporção de doadores de sangue e casos observados no Rio de Janeiro para o período da modelagem. Por simplicidade, assumimos que a taxa confirmada

virologicamente nos doadores é ≈1, de modo que (ς) pode ser interpretada como a proporção de indivíduos no Rio de Janeiro que são doadores de sangue.

Tabela 6 - Parâmetros constantes. Parâmetros que são fixos no sistema ODE.

Anotação	Valor	Descrição
a	0.33 por dia	Taxa de picada do mosquito[118]
$1/\gamma^h$	2 dias	Período de latência humana[74, 119]
$1/\sigma^h$	4 dias	Período infeccioso humano[41, 120]
f	0.5	Proporção de mulheres (razão de sexo)[121, 122]
ς	0.05	Taxa observada em dadores de sangue

Adaptação da Abordagem de Monte Carlo via Cadeias de Markov

Para o processo de adaptação, o algoritmo MCMC de Lourenco e colaboradores. É alterado para uma abordagem bayesiana, formalizando uma probabilidade e parâmetros *priores*[109]. Para isso, as dispersões em salto de cada parâmetro foram mantidas como Gaussianas (simétricas), para desta forma mantermos uma distribuição aleatória (Metrópolis-Hastings kernel). Definimos a probabilidade de aceitação α de um conjunto de parâmetros Θ, dado o modelo ODE de saída *y* como:

$$\alpha = min\left\{1, \frac{\pi(y|\Theta^*)\pi(\Theta^*)}{\pi(y|\Theta^0)\pi(\Theta^0)}\right\} \qquad (26)$$

Onde Θ^* e Θ^0 são os conjuntos de parâmetros propostos e aceitos (respectivamente), e $\pi(y|\Theta^*)$ e $\pi(y|\Theta^0)$ são as probabilidades da saída ODE representando os dados epidemiológicos, dado um conjunto de parâmetros. Assumimos *priores* uniformes para todos os parâmetros estimados e as probabilidades de serem o produto das probabilidades condicionais de *Poisson* de cada dado epidêmico e das ODE usadas:

$$\pi(y|\Theta) = \prod_{i=1}^{N}[Pr\{y_i = d_i\}] \qquad (27)$$

Para abordar a convergência de MCMC, quantificamos $\sqrt{\hat{R}}$, a estatística de Gelman-Rubin (que compara a variância entre e dentro de *M* cadeias MCMC

independentes)[123]. Espera-se que esta estatística se aproxime de 1 quando M cadeias independentes convergiram para as mesmas distribuições estacionárias. Valores significativamente maiores do que 1, por exemplo, indicam que a variância entre cadeias é maior que a variação dentro da cadeia, destacando-se que o MCMC pode necessitar de mais tempo para convergir ou ajuste nos parâmetros de salto[123]. Para maiores detalhes deste cálculo, consulte[109, 110, 123].

5.7.5 Ajustes nos parâmetros

Com a abordagem MCMC descrita acima, todas as combinações dos parâmetros abertos no sistema ODE que mais provavelmente representam o surto são exploradas (Tabela 7). Em resumo, o MCMC estima distribuições para: (1) a capacidade de transmissão K, usada para estimar indiretamente o número de mosquitos adultos por humano; (2) ponto temporal do primeiro caso t_0, assumido ser um caso humano; (3) um coeficiente linear η que escalona o efeito da temperatura nas taxas de mortalidade aquática e adulta; e (4) um coeficiente linear α que escala o efeito da temperatura no período extrínseco de incubação. Ao introduzir os coeficientes lineares η e α, o efeito relativo da variação da temperatura na mortalidade e na incubação não é alterado por si só, mas as linhas de base podem ser diferentes das condições ideais de laboratório utilizadas por Yang e colaboradores, em experimentos laboratoriais[112, 117]. Para uma discussão sobre possíveis fatores biológicos que podem justificar η e α, pode ser consultado na descrição original do método[112, 117, 124, 125].

Tabela 7 - Parâmetros estimados. Parâmetros livres usados pela abordagem MCMC Bayesiana para ajustar os dados.

Anotação	Descrição	Variação
t_0	Ponto no tempo do primeiro caso (em humanos)	(∞, ∞)
K	Capacidade aquática	$(0, \infty)$
η	Fator multiplicativo (linear) para a mortalidade de mosquitos	$(0, \infty)$
α	Fator multiplicativo (linear) para o período extrínseco de incubação	$(0, \infty)$

RESULTADOS

6 RESULTADOS

De um total de 141 amostras RNA positivas para o DENV4 foram obtidos 42 genomas completos, 48 genomas parciais e em 51 todas as estratégias de amplificação falharam (Tabela 8).

Analisando as sequências consensos geradas observamos que os fragmentos variaram entre 1.215 e 10.066nt de comprimento, com mediana de 8.752nt. Os dados de carga viral foram obtidos para 42 amostras e apenas duas tinham valor de log10 >103 cópias/ml (1.116 e 3.100 cópias/ml), (Tabela 8). As cargas virais apresentaram correlação com o comprimento da sequência consenso obtida (correlação de Pearson, ajustado r2 = 0,62, p-valor <0,0001).

Houve uma forte correlação entre o número total de amostras de DENV+ nos doadores e receptores de sangue em cada mês, e o número de infecções de dengue notificadas nos municípios do RJ (correlação de Pearson para a cidade do RJ: r2 ajustado = 0,97; valor p = 0,0002) e em municípios do RJ (correlação de Pearson, r2 ajustado = 0,86; valor p = 0,011). Além disso, encontramos uma correlação espacial moderada, mas significativa, entre o número de casos em cada município em PE e a densidade da população humana estimada nesses municípios (correlação de Spearman, ρ = 0,72, p < 0,001; densidades humanas foram obtidas a partir de conjuntos de dados de *Gridsed* de alta resolução para o Brasil[126]; Figura 19), indicando que a população estudada representa a população como um todo.

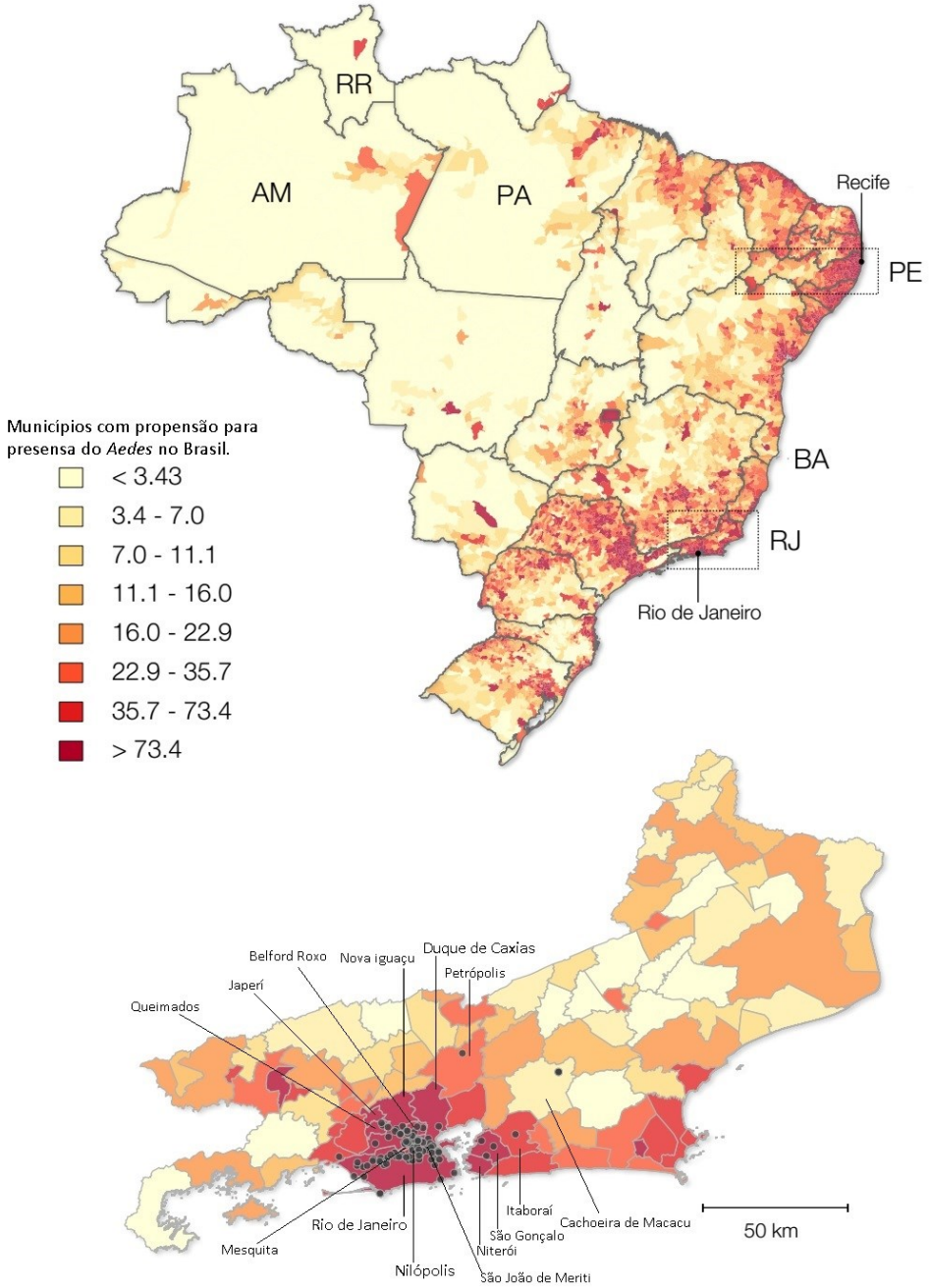


Figura 19 - Mapa cartográfico do Brasil demostrando uma maior propensão para presença do Aedes aegypti metodologia descrita em[127], ponderada pela densidade populacional (agregada por município) em cada um dos 5.596 municípios brasileiros no mesmo ano[126]. As áreas mais adequadas estão localizadas nas regiões nordeste e sudeste do país. Mapa ampliado do estado RJ onde os círculos negros indicam o local mais provável de infecção dos indivíduos.

Tabela 8 - Posição no genoma do DENV, estatísticas do sequenciamento, carga viral e localização geográfica das amostras.

ID	Posição do fragmento em relação ao genoma completo viral*					Tamanho da sequência consenso	Número de leituras	Cobertura (vezes cada base lida)	Carga viral estimada por qPCR	Cidade	Estado
	F01 1-3790	F02 2884-4993	F03 4830-7330	F04 5982-8704	F05 7800-10649						
DEN007761	+	+	+	+	+	10602	17701275	1670	1244000	Rio de Janeiro	RJ
N05871	+	+	+	+	Falha	7728	16744636	2167	127100	Nilópolis	RJ
N09074	+	+	+	+	+	10617	18225813	1717	197400	Duque de Caxias	RJ
N09318	+	+	+	+	+	10621	19868891	1871	513000	Rio de Janeiro	RJ
N10769	+	+	+	+	+	10149	23026731	2269	161800	São Joao de Meriti	RJ
N11331	+	+	+	+	+	10196	21898535	2148	347000	Rio de Janeiro	RJ
N12151	+	+	+	+	+	10173	21560038	2119	32000	Rio de Janeiro	RJ
N14314	+	+	+	+	+	10400	24044682	2312	10560000	Rio de Janeiro	RJ
N15161	+	+	+	+	+	10165	32297884	3177	595000	Rio de Janeiro	RJ
N15512	+	+	+	+	+	10616	33694398	3174	759000	Belford Roxo	RJ
N15997	+	+	+	+	+	10600	28561888	2695	406000	Rio de Janeiro	RJ
N18032	+	+	+	+	+	10600	36009922	3397	25300000	Duque de Caxias	RJ
N18479	+	+	+	+	+	10173	25839532	2540	212000	São Joao de Meriti	RJ
N18614	+	+	+	+	Falha	8800	55980944	6361	107200	Rio de Janeiro	RJ
N18881	+	+	+	+	+	10600	26798856	2528	165500	Rio de Janeiro	RJ
N19169	+	+	+	+	+	10013	37079159	3703	19150	Rio de Janeiro	RJ
N19365	+	+	+	+	+	10500	38006533	3620	15210000	Rio de Janeiro	RJ
N19661	+	+	+	+	+	10558	39666938	3757	113400	Nova Iguaçu	RJ
N20174	+	+	+	+	+	10141	17864024	1762	131300	Belford Roxo	RJ
N21431	+	+	+	+	+	10602	35818508	3378	49300	Recife	PE
N23249	+	+	+	+	+	10600	32765414	3091	126300	Recife	PE
N24110	+	+	+	+	+	10120	30887951	3052	1061000	Rio de Janeiro	RJ
N28266	+	+	+	+	+	10503	26065920	2482	49500	Recife	PE
N08425	Falha	+	+	+	Falha	5405	38083532	7046	Não realizada	Duque de Caxias	RJ
N08744	+	+	+	+	Falha	7010	17865236	2549	1227	Queimados	RJ

Continua...

...Continuação

N08643	+	+	+	+	+	10100	21857285	2164	25200	Rio de Janeiro	RJ
N08650	+	+	+	+	+	10100	12684914	1256	7910	Rio de Janeiro	RJ
N10341	+	+	+	+	Falha	7291	73710209	10110	3660	Mesquita	RJ
N04005	+	+	+	Falha	Falha	6722	22712293	3379	1987	São Joao de Meriti	RJ
N09639	+	+	+	+	Falha	7670	28078280	3661	3410	Rio de Janeiro	RJ
N11023	+	+	+	+	+	10660	16744636	1571	2500	Rio de Janeiro	RJ
N14586	+	+		Falha	Falha	4200	25736669	6128	822	Rio de Janeiro	RJ
N14620	Falha	+	+	Falha	Falha	4635	14329751	3092	11350	Rio de Janeiro	RJ
N10452	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2883	9831331	3410	4510	São Gonçalo	RJ
N19738	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2285	15417715	6747	9000	Rio de Janeiro	RJ
N20356	Falha	+	+	Falha	Falha	4142	18178554	4389	5750	Rio de Janeiro	RJ
N21696	+	+	+	+	+	10053	13603379	1353	48	Olinda	PE
N23249	+	+	+	+	+	10451	24500166	2344	Não realizada	Recife	PE
N10064	+	+	+	+	+	10572	16765871	1586	833	Rio de Janeiro	RJ
N18396	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2248	25033980	11136	590	Queimados	RJ
N20024	+	+	+	+	+	10550	27951145	2649	863	Paulista	PE
N23946	+	+	+	+	+	10509	32273318	3071	40700	Nova Iguaçu	RJ
N25009	+	+	+	+	+	10470	12460586	1190	1200	Olinda	PE
N28351	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2105	36432296	17308	200	Olinda	PE
N26666_DR3	+	+	+	+	+	10450	12651318	1211	1542	Recife	PE
N27372R_DR3§	Falha								100	Recife	PE
N06242_DR5	Falha								36	Rio de Janeiro	RJ
N20511R_B_DR5§	+	+	+	+	Falha	9185	29287022	3189	64700	Cachoeiras de Macacu	RJ
N22221R_B_DR5§	Falha								24	Cachoeiras de Macacu	RJ
N22234R_B_DR5§	Falha								Não realizada	Cachoeiras de Macacu	RJ
N26479_DR4	+	+	+	+	+	10400	28510152	2741	84400	Rio de Janeiro	RJ
N20463R_DR4§	Falha								100	Belford Roxo	RJ
N27959_DR2	+	+	+	+	Falha	8704	21211153	2437	2720	Recife	PE
N27345R_C_DR2§	Falha								200	Jaboatão dos Guararapes	PE

Continua...

...Continuação

N27350R_C_DR2§	Falha								200	Jaboatão dos Guararapes	PE
N20458R_DR6§	Falha								12	Petrópolis	RJ
N15979_DR6	+	+	+	+	Falha	7509	12441076	1657	336	Rio de Janeiro	RJ
N21495R_DR1§	Falha								48	Jaboatão dos Guararapes	PE
N23385_DR1	+	+	Falha	Falha	Falha	4953	24266541	4899	200	Recife	PE
N20459R_A§	+	+	+	+	+	10610	52153491	4916	241000	Rio de Janeiro	RJ
N20478R_A§	+	+	Falha	Falha	Falha	5818	68018491	11691	11300	Rio de Janeiro	RJ
N20473R§	+	+	+	+	+	10500	14286937	1361	60900	Rio de Janeiro	RJ
N22380R§	Falha	Falha	Falha	+	Falha	2795	17959071	6425	1597	São João de Meriti	RJ
N22390R§	+	+	+	+	Falha	8504	51076136	6006	490	São João de Meriti	RJ
N20834R§	+	+	Falha	Falha	Falha	5340	48164549	9020	200	Rio de Janeiro	RJ
N26723R§	+	+	+	Falha	Falha	7040	42620119	6054	396	Pedra	PE
N21472R§	+	+	+	+	+	10560	23342368	2210	25400	Paulista	PE
N28501R§	+	+	+	+	+	10400	15464682	1487	353	Caruaru	PE
N28486R§	+	+	Falha	Falha	Falha	5083	46682005	9184	203	Abreu e Lima	PE
N28520R§	+	+	+	+	Falha	7685	27408884	3567	214	São Bento do Uma	PE
N23571R§	Falha								Não realizada	Belo Jardim	PE
N28132R§	Falha								200	Brejão	PE
N22222R§	Falha								12	Rio de Janeiro	RJ
N20841R§	Falha								100	Rio de Janeiro	RJ
N23513R§	Falha								24	Recife	PE
N22356R§	Falha								48	Nova Iguaçu	RJ
N22250R§	Falha								36	Rio de Janeiro	RJ
N25929	+	+	+	+	Falha	8392	39166310	4667	78600	Mesquita	RJ
N27870	+	+	+	+	Falha	8677	35624996	4106	4010	Recife	RJ
N08693	+	+	+	Falha	Falha	7618	53945772	7081	69000	Rio de Janeiro	RJ
N05831	+	+	+	+	Falha	8836	51039102	5776	83000	Itaboraí	RJ
N26684	+	Falha	Falha	Falha	Falha	4775	48010747	10055	12	Recife	RJ

Continua...

...Continuação

N15067	+	+	+	+	+	10500	18976839	1807	794000	Rio de Janeiro	RJ
N13441	+	+	+	+	Falha	8811	42661026	4842	48800	Rio de Janeiro	RJ
N15140	+	+	+	+	Falha	8385	36771884	4385	7390	Rio de Janeiro	RJ
N14503	+	+	+	+	+	10480	41264904	3937	6120000	Rio de Janeiro	RJ
N05883	+	+	+	+	Falha	8005	25484912	3184	33100	Rio de Janeiro	RJ
N16881	+	+	Falha	Falha	Falha	4990	40667219	8150	12260	Belford Roxo	RJ
N19779	+	+	+	+	+	10607	20995408	1979	49000	Rio de Janeiro	RJ
N19469	Falha	+	+	Falha	Falha	4445	26151599	5883	48200	Rio de Janeiro	RJ
N21700	+	+	Falha	Falha	Falha	4995	20048411	4014	339	Olinda	PE
N27700	+	+	+	Falha	Falha	6522	31624778	4849	5050	Paulista	PE
N10501	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2144	29912290	13952	893	São Gonçalo	RJ
N12349	+	Falha	Falha	Falha	Falha	1215	25790573	21227	200	Belford Roxo	RJ
N15054	+	Falha	Falha	Falha	Falha	1218	21170704	17382	12	Mesquita	RJ
N11317	+	Falha	Falha	Falha	Falha	1802	27307768	15154	215	Rio de Janeiro	RJ
N26494	Falha	Falha	Falha	Falha	+	2799	31792918	11359	200	Nova Iguaçu	RJ
N25711	+	Falha	Falha	Falha	Falha	1675	13496804	8058	356	Belford Roxo	RJ
N10538	Falha	+	+	+	Falha	6378	17335596	2718	392	Rio de Janeiro	RJ
N16439	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2229	18857541	8460	200	Rio de Janeiro	RJ
N24910	+	+	Falha	Falha	Falha	5443	16070048	2952	16340	Nova Iguaçu	RJ
N25844	+	+	+	Falha	Falha	6364	32103759	5045	57800	Rio de Janeiro	RJ
N26701	Falha	+	Falha	Falha	Falha	1385	22903689	16537	200	Paulista	PE
N23196	+	Falha	Falha	Falha	Falha	Fail	32397868		200	Igarassu	PE
N28273	+	+	Falha	Falha	Falha	4717	21661814	4592	200	Paulista	PE
N23214	+	+	+	+	+	10397	27474973	2643	852	Jaboatão dos Guararapes	PE
N21770	+	+	+	+	+	10179	21439718	2106	200	Recife	PE
N17560	+	+	+	+	+	10154	44970348	4429	225000	Rio de Janeiro	RJ
N22009	Falha	+	Falha	Falha	Falha	2385	23075034	9675	200	Paulista	PE
N21979	Falha								200	Pesqueira	PE
N20875	Falha								3100	Rio de Janeiro	RJ

Continua...

...Continuação

N06359	Falha				Não realizada	Rio de Janeiro	RJ
N14886	Falha				Não realizada	Rio de Janeiro	RJ
N14629	Falha				685	Rio de Janeiro	RJ
N15110	Falha				1116	Belford Roxo	RJ
N26330	Falha				Não realizada	Nova Iguaçu	RJ
N25987	Falha				24	Recife	PE
N20612	Falha				Não realizada	Recife	PE
N25759	Falha				12	Rio de Janeiro	RJ
N24195	Falha				100	Mesquita	RJ
N06081	Falha				200	Rio de Janeiro	RJ
N11138	Falha				Não realizada	Rio de Janeiro	RJ
N08874	Falha				100	Rio de Janeiro	RJ
N06513	Falha				100	Rio de Janeiro	RJ
N15472	Falha				200	Rio de Janeiro	RJ
N17254	Falha				48	São João de Meriti	RJ
N11462	Falha				200	Rio de Janeiro	RJ
N19423	Falha				300	Nova Iguaçu	RJ
N17954	Falha				24	Rio de Janeiro	RJ
N22458	Falha				48	Paulista	PE
N27440	Falha				Não realizada	Abreu e Lima	PE
N27964	Falha				200	Jaboatão dos Guararapes	PE
N28249	Falha				200	Recife	PE
N27535	Falha				100	Recife	PE
N25336	Falha				12	Nilópolis	RJ
N26890	Falha				36	Goiana	PE
N21116	Falha				48	Recife	PE
N12090	Falha				Não realizada	Nova Iguaçu	RJ
N12707	Falha				Não realizada	Rio de Janeiro	RJ
N13343	Falha				Não realizada	São João de Meriti	RJ
N18730	Falha				Não realizada	Nova Iguaçu	RJ
N12333	Falha				36	Rio de Janeiro	RJ
N13148	Falha				Não realizada	Nova Iguaçu	RJ
N16526	Falha				244	Mesquita	RJ

Continua...

N10770	Falha				12	São João de Meriti	RJ
N14169	Falha				36	São Gonçalo	RJ
N25596	Falha				100	Rio de Janeiro	RJ
N25078	Falha				200	Rio de Janeiro	RJ
N17018	Amostra sem volume				Não realizada	Nova Iguaçu	RJ

Legenda:
* Posição genômica dos fragmentos em relação a cepa de referência do DENV4 (número de acesso do Genbank: NC_002640
§ As amostras com IDs seguidos pela letra “R” indica que o indivíduo é receptor ligado a um doador conhecido. Amostras com IDs seguidos das letras A, B ou C no final representa sequencias do mesmo indivíduo, com diferentes datas de coleta. Amostras com IDs seguidos das letras DR mais número entre 1 e 6, representam doador e receptor pareados. Seis indivíduos foram confirmados por testes sorológicos que receberam derivados de sangue com DENV.

Para colocar nossas sequências em um contexto evolutivo global, estimamos uma probabilidade máxima enraizada no ponto médio (ML) e uma filogenia de relógio molecular a partir de um alinhamento que compreende todos os genomas DENV4, publicamente disponíveis amostrados em todo o mundo (n = 154), mais as sequências brasileiras completas e parciais relatados neste estudo (n = 90) (Figura 20). Os genomas DENV previamente publicados foram amostrados entre 1972 e 2012; a filogenia Bayesiana anotada está demonstrada na Figura 21. Ambas as filogenias ML e Bayesiana mostram que 97% (87/90) dos novos isolados DENV brasileiros se agrupam em um único clado monofilético bem suportado (*bootstrap* de máxima verossimilhança, BS = 87, probabilidade posterior bayesiana, PP = 0,99). Este clado está intimamente relacionado com os vírus da Venezuela e da região Norte brasileira, encontrado nas capitais de Roraima (RR) e Amazonas (AM), que possuem uma alta adequação para *Aedes aegypti* e uma alta densidade populacional (Figura 19). A taxa evolutiva genômica estimada para o conjunto de dados global DENV4 foi de 1,36 x 10-3 substituições por sítio por ano (s/s/a) (95% intervalo de confiança Bayesiano = 1,17-1,53 x 10-3 s/s/y). Houve uma forte correlação entre a distância genética de cada sequência global e a data da amostragem (correlação de Pearson, r2 = 0,76). Apesar disso, o modelo de relógio molecular relaxado exibiu um elevado coeficiente de variação entre linhagens (1,74; intervalo de confiança Bayesiano de 95% = 1,38-2,14), indicando uma heterogeneidade significativa entre os ramos. Essa alta variabilidade entre linhagens não é inesperada para filogenias de *flavivírus*, que compreendem genomas que foram longitudinalmente amostrados ao longo de 40 anos[128-130].

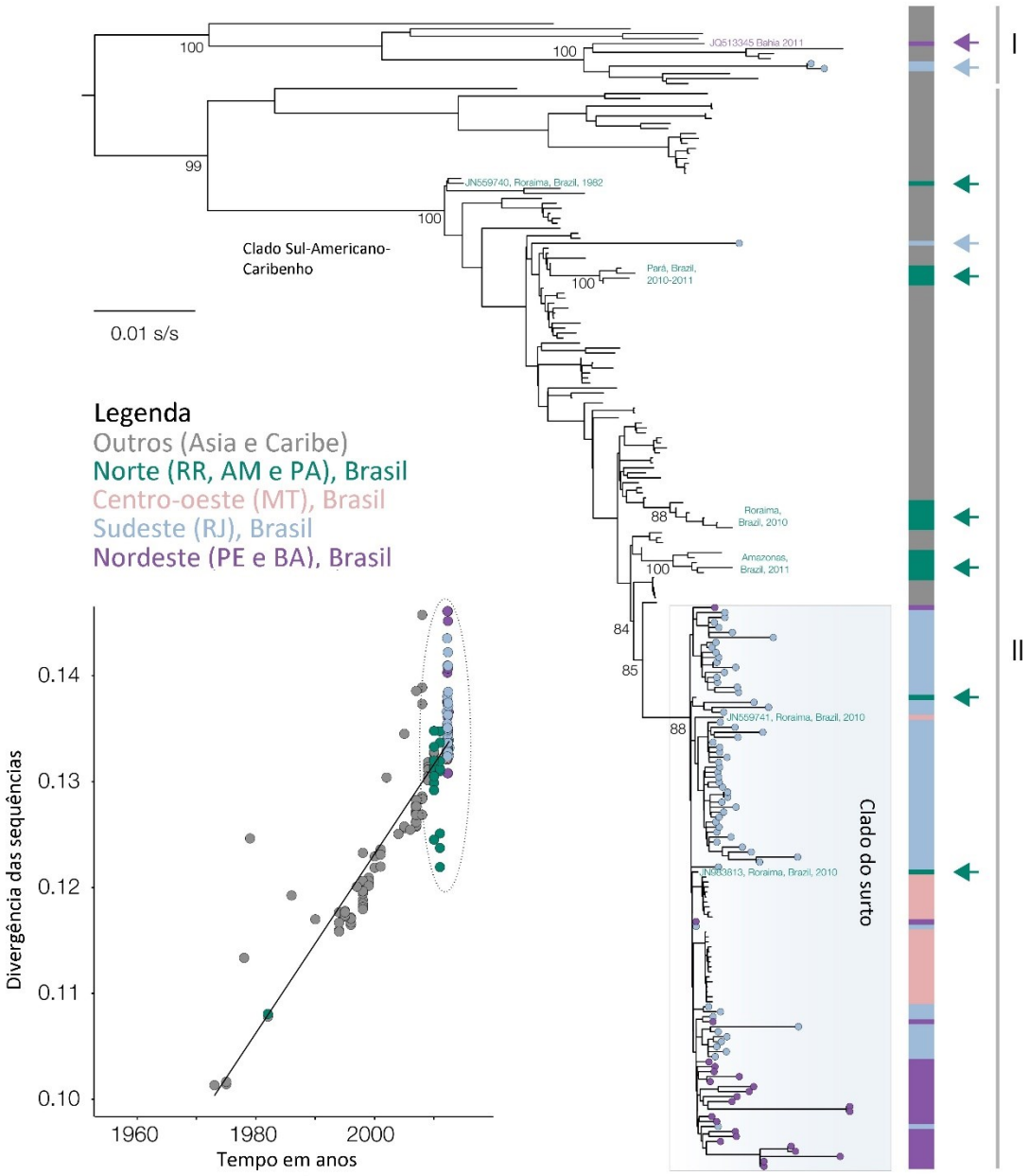


Figura 20 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança (enraizada do ponto médio) usando 244 sequências de genomas de DENV4 provenientes do mundo inteiro. Os círculos coloridos nas pontas dos ramos representam as sequências relatadas neste estudo, sendo coloridas de acordo com a localização da amostragem (conforme mostrado na legenda à esquerda da arvore). A caixa em azul destaca o ancestral do surto DENV4-II no Brasil estudado aqui. As setas verdes à direita demonstram as introduções secundárias da DENV4 na região Norte do Brasil (Roraima, Pará e Amazonas) que resultaram em pouca ou nenhuma transmissão no país. As setas azuis e roxas indicam, respectivamente, introduções secundárias de cepas que não se propagaram nos surtos do RJ e PE. Os números abaixo dos "*nós*" indicam o suporte de *bootstrap*. À esquerda da árvore, é mostrada uma análise de regressão linear entre a divergência e o tempo de amostragem para a árvore global.

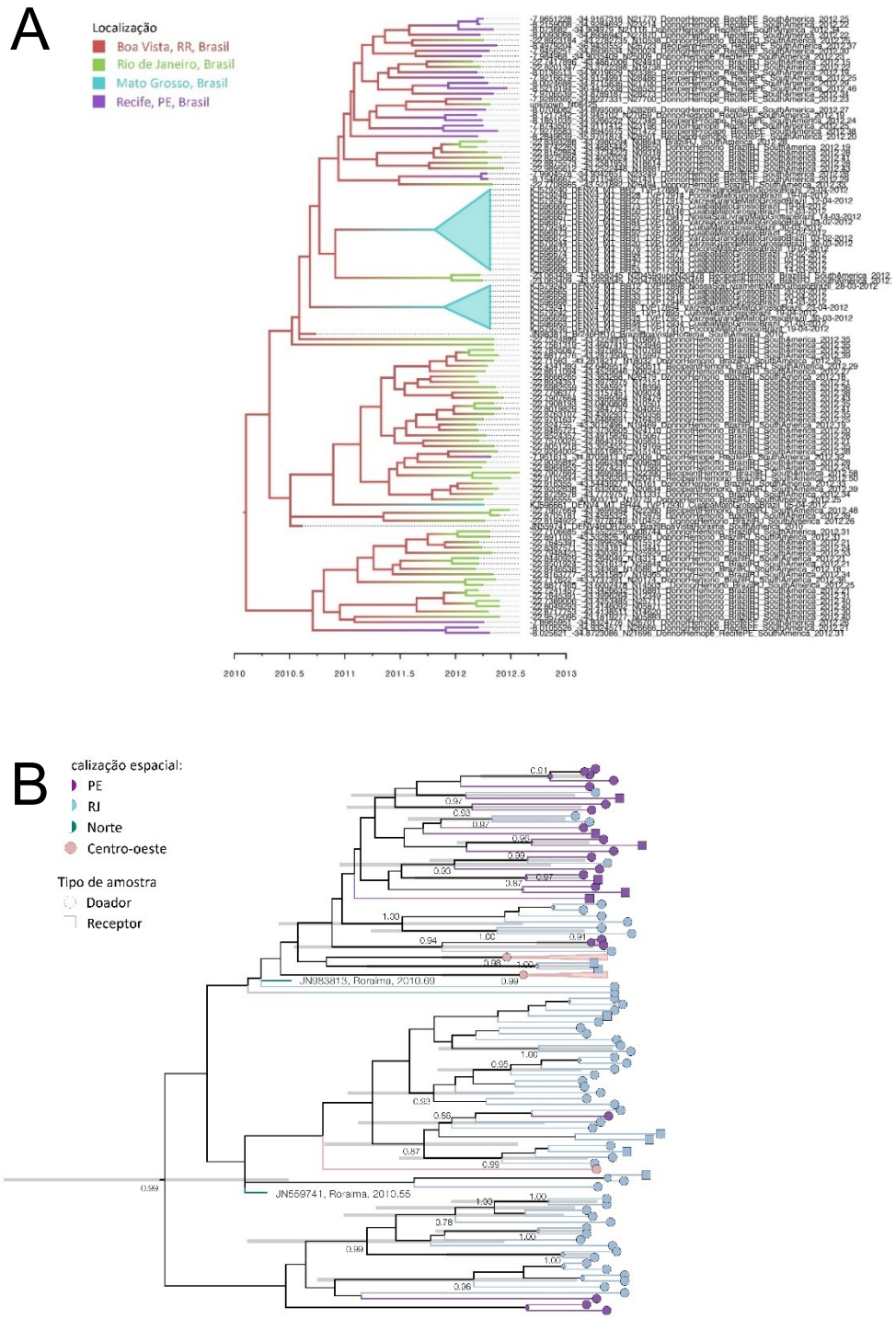


Figura 21 - **(A)** Árvore filogeográfica (árvore de relógio molecular) do DENV4-II. As cores indicam as localizações mais prováveis de entrada das cepas responsáveis pelo surto. **(B)** Árvore filogenética calibrada no tempo do grupo de sequencias do surto. Representação do subconjunto da árvore filogenética global mostrada na figura 15. Círculos e quadrados nos ramos representam isolados de doadores e receptores, as cores representam a origem das amostras. As barras horizontais representam os intervalos de confiança de 95% para todas as divergências que são suportadas por probabilidades posteriores acima de 0,9.

Nossos dados também contêm a primeira detecção do genótipo I do DENV4 (DENV4-I) no Rio de Janeiro. Os dois isolados DENV4-I do RJ agruparam-se com o suporte estatístico máximo (BS = 100, PP = 1,00) e estão relacionados aos isolados amostrados no Sudeste Asiático em 2002-2011 (Figura 15). Além disso, esses dois isolados são polifiléticos em relação a um único isolado DENV4-I, previamente detectado no estado da Bahia em 2011[83]. Assim, o DENV4-I parece ter sido introduzido no Brasil a partir do Sudeste Asiático em pelo menos duas ocasiões distintas.

O tempo do antepassado mais comum do surto (TMRCA) foi estimado para fevereiro de 2010 (intervalo de confiança Bayesiano de 95%, BCI: abril de 2009 a setembro de 2010, Figura 21A). Em fevereiro de 2011, o DENV4 foi confirmado pela primeira vez no Nordeste do Brasil (estados da Bahia, Pernambuco e Piauí) e em maio o vírus foi confirmado no Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro)[131, 132]. Nesses locais menos de 100 casos foram detectados no total em 2011.

O DENV4 nunca havia sido confirmado no município do Rio de Janeiro antes de meados de maio de 2011, o que levanta a seguinte questão: onde residia a linhagem do surto antes de sua descoberta na cidade? Uma hipótese é de que o antepassado comum mais recente das cepas do surto no Rio, descende de uma única linhagem que circulou sem ser detectada na cidade antes do início do surto (cenário A). Alternativamente, é possível que o surto no Rio de Janeiro tenha múltiplos antepassados, cada um deles proveniente de um conjunto de diversidade não amostradas fora do Rio. As localizações prováveis desta população fonte são as áreas urbanas da Amazônia brasileira ou venezuelana com alta adequação para transmissão DENV (cenário B). De acordo com o cenário B, observa-se que (i) as análises filogenéticas indicam que os ancestrais dos surtos brasileiros de DENV4-II são provenientes da Venezuela (Figura 20 e 21), que é ligada a Boa Vista (RR) e

Manaus (AM) pelos rios Branco e Amazonas e (ii) dois isolados amostrados em meados de 2010 na cidade em Roraima são encontrados entre as primeiras linhagens do surto brasileiro (Figura 20 e 21).

Em seguida, buscamos investigar por que e como o surto no Rio de Janeiro só teve início em janeiro de 2012 e não antes. Devido à amostragem genética extensa do surto, foi possível estimar as flutuações temporais no seu número reprodutivo efetivo (Re), utilizando o modelo skiline de nascimento-morte (BDSKY), baseado em um processo filogenético de nascimento e morte[107, 133]. Em teoria, Re é o número esperado de casos secundários gerados por um caso primário, numa população não inteiramente suscetível em cada ponto no tempo durante o surto. Re > 1 indica uma epidemia crescente. Re é igual ao número de reprodução básica, R0, no início de uma epidemia quando a população hospedeira é completamente suscetível.

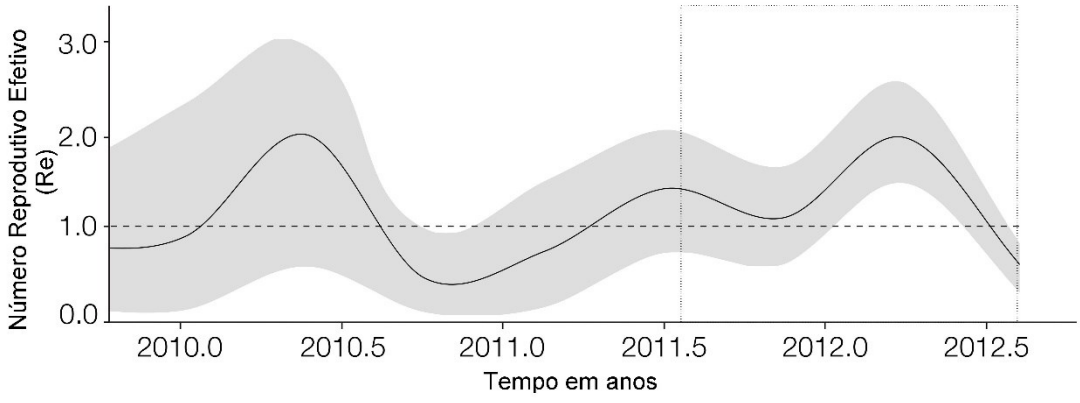


Figura 22 - Flutuação temporal do número reprodutivo efetivo (Re) do surto. O Re foi estimado usando a abordagem bayesiana de nascimento-morte (BDSKY).

Os resultados de BDSKY são mostrados na Figura 22. Embora os intervalos de incerteza BDSKY sejam maiores no passado, a análise mostra variações sazonais consistentes com informações epidemiológicas (Figura 23).

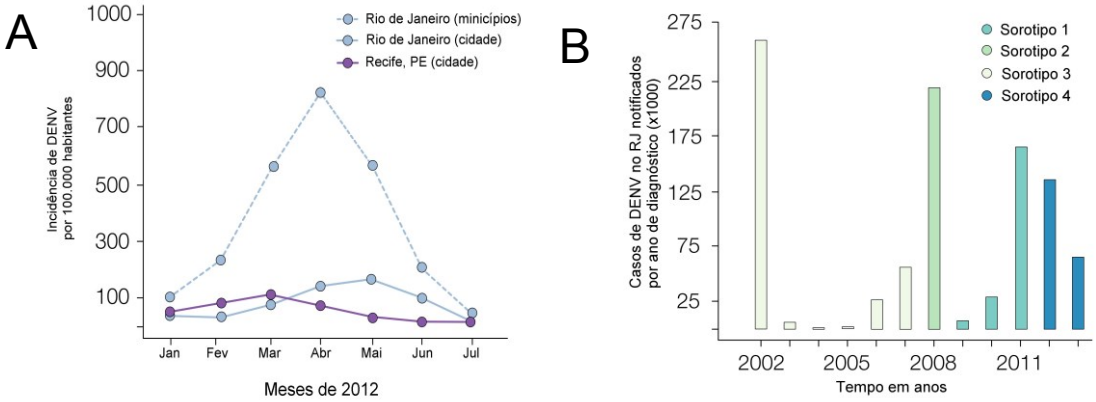


Figura 23 - (A) Incidência de DENV por notificação na cidade do RJ, nos municípios do RJ e na cidade Recife (PE). (B) Número total de casos notificados para cada sorotipo de DENV no Rio de Janeiro (RJ) entre 2002 e 2013. Dados obtidos a partir dos relatórios do SINAN.

O Re começou a aumentar em torno de dezembro de 2011 e atingiu um pico em meados de março de 2012, Re = 1,9 (95% BIC: 1,5 - 2,6) (Figura 22). Em meados de junho de 2012, a estimativa de Re teve uma queda para <1, coincidindo com o final observado da epidemia. De modo geral, o BDSKY sugere um aumento nos primeiros três meses de 2012, seguido de uma queda de Re <1 no segundo trimestre.

A detecção de flutuações sazonais ao longo de vários anos é notável, dado que quase todas as sequências utilizadas na análise foram amostradas no primeiro semestre de 2012. Utilizando a abordagem BDSKY também estimamos o tempo de geração, ou seja, período entre duas infecções mediadas pelos vetores para 21 dias (95% BCI: 11 a 34 dias) e a proporção de casos que foram estimados em 3,42 x 10-5 (95% BCI: 2,12 x 10-8 para 1,22 x 10-4). Se considerarmos o tamanho da

população humana dos dois estados amostrados a partir dos quais foram analisados os dados do genoma, isto corresponde a uma população infectada de pelo menos 940.000 indivíduos até o final de julho de 2012, o que equivale ao triplo do número de casos oficiais notificados durante este período (Figura 23B). A filogenia é significativamente estruturada pela localização (estado) da amostragem (índice de associação = 0,43 e *bootstrap* = 1,00), mas essa estrutura filogenética não parece impactar nossas estimativas através de BDSKY para 2012 porque o modelo capta bem as oscilações observadas nos casos notificados (Figura 23A).

Para investigar se o início do surto de DENV4 no Rio de Janeiro foi associado a um aumento no número de viajantes de outros destinos dentro do Brasil, reunimos dados sobre o número de passageiros que chegaram em voos comerciais para o Rio de Janeiro de todos os outros aeroportos do país, entre janeiro de 2010 e dezembro de 2012. Esses dados foram obtidos da Associação Internacional de Transporte Aéreo, que coleta dados em cerca de 90% de todas as viagens de passageiros em todo o mundo. Verificamos que entre 2010 e julho de 2012, o número de passageiros por mês para o Rio de Janeiro quase dobrou, aumentando em média 77% ao ano durante esse período (Figura 24).

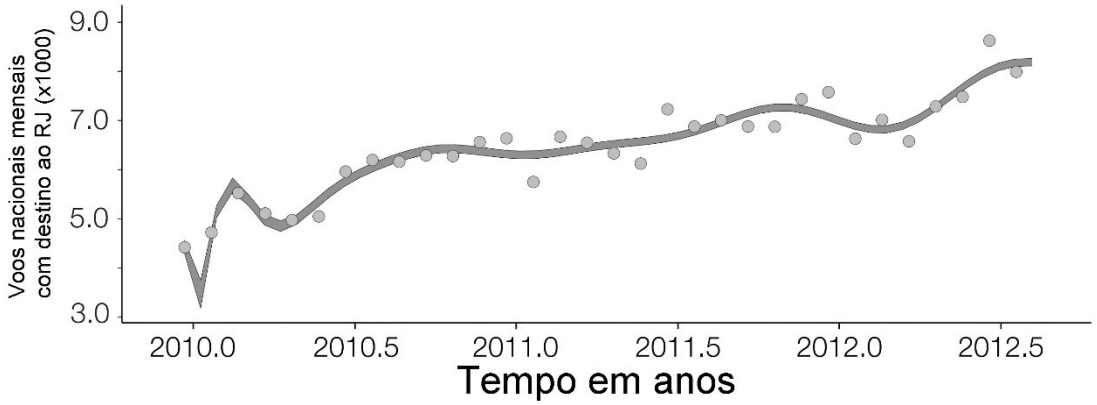


Figura 24 - Número agregado de voos nacionais (pontos cinza escuro) com destino ao RJ entre janeiro de 2010 e julho de 2012.

Por fim, utilizamos o modelo matemático (SEIR), onde a população é dividida em quatro compartimentos: susceptíveis, expostos, infeciosos e recuperados, para explorar detalhadamente as condições ecológicas e as dinâmicas de transmissão vetorial subjacentes ao surto de 2012, levando-se em conta a variação de temperatura como um dos principais determinantes da capacidade vetorial[109]. Compilamos uma série temporal de incidência durante o surto com os casos semanais DENV4+ e ajustamos ao modelo. A figura 25 mostra as estimativas diárias de parâmetros epidemiológicos chaves do modelo SEIR.

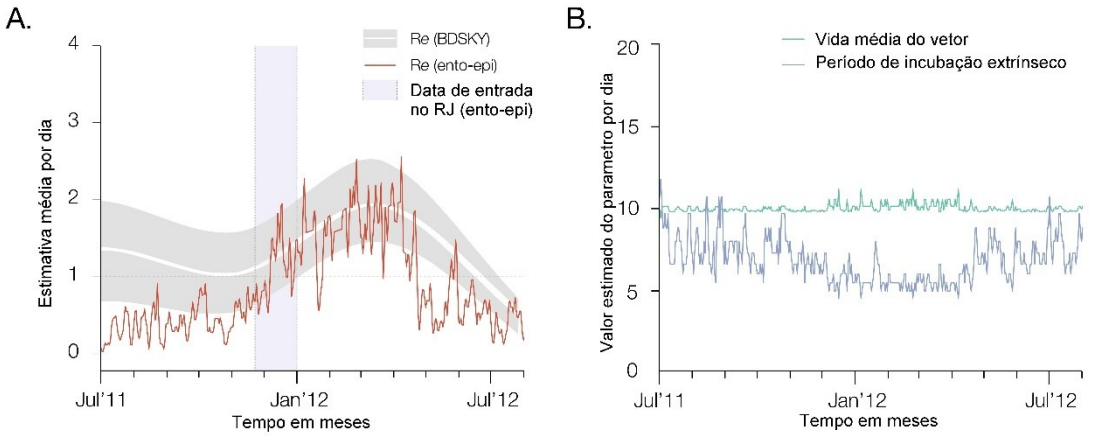


Figura 25 - Dinâmica epidemiológica e entomológica do surto de dengue. (A) A linha vermelha contínua corresponde às estimativas diárias do Re obtidos utilizando o modelo ento-epidemiológico para o período de julho de 2011 a julho de 2012 no estado do Rio de Janeiro. Em cinza os intervalos de confiança de 95% obtidos usando o modelo BDSKY como mostrado na figura 22, com a linha contínua branca representando as estimativas médias do Re através do tempo. (B) A linha verde corresponde ao tempo de vida dos mosquitos Aedes, enquanto a linha roxa corresponde ao período de incubação extrínseca do vetor. A data estimada de entrada da DENV4 no Rio de Janeiro (caixa azul no painel A) foi de novembro a dezembro de 2011.

O aumento inicial e pico de Re em 2012 observado a partir de dados genéticos usando a abordagem BDSKY (Figura 22) corroboram às estimativas de Re a partir do modelo SEIR (Figura 25A). O Re inferior até o final de 2011, estimado a partir dos dados genéticos, pode refletir a ausência de isolados de dengue antes do surto (Figura 23B). Porém, obtivemos uma tendência semelhante utilizando o modelo SEIR, uma vez que este último não depende da contagem de casos antes do surto e apoia a ideia de que os fatores de mosquito e temperatura foram insuficientes para a transmissão de surtos entre meados de 2011 e início de 2012. De acordo com o modelo SEIR, a data do primeiro caso humano da DENV4 -II no Rio de Janeiro ocorreu em torno de novembro a dezembro de 2011. Esta estimativa é consistente

com múltiplas introduções simultâneas no Rio de Janeiro de áreas do Norte do Brasil com alta adequação para a endemicidade do DENV (cenário B).

Além de capturar a dinâmica do surto de DENV4 (Figura 25A), o modelo SEIR recupera vários outros parâmetros como a expectativa de vida e o período de incubação extrínseca do vetor (mosquito) (Figura 25B). Nossos dados são corroborados com observações anteriores de mosquitos de campo no Rio de Janeiro[124, 125, 134]. Foi estimado o período de incubação extrínseca do *Aedes* (ou seja, o tempo necessário para que o vírus seja detectado na saliva e apto a transmissão após ser ingerido pelo mosquito) em cerca de 7 dias (95% IC: 4,4-10 dias) e sua vida útil em torno de 10,5 dias (IC 95% : 10,1-12,3).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, caracterizamos a dinâmica de um grande surto de dengue urbano no Brasil. Ao combinar os modelos genéticos e epidemiológicos aplicados aos dados de vigilância dos bancos de sangue, mostramos que o surgimento do surto DENV4-II no Brasil foi contingente à introdução de novas cepas em grandes centros populacionais durante um período de tempo de alto potencial de transmissão (R_e >1). Obtivemos tendências epidêmicas semelhantes e estimativas de parâmetros utilizando duas abordagens fundamentalmente diferentes, baseadas em fontes de dados independentes, um modelo filodinâmico nascimento-morte e um modelo matemático SEIR ento-epidemiológico. O pico estimado de transmissão epidêmica em março de 2012 (R_e~2) coincide com o pico observado na detecção de DENV nos doadores de sangue, destacando o potencial de triagem em bancos de sangue para vigilância e detecção precoce de surtos. De uma forma geral, as áreas urbanas e periurbanas de residência da população de doadores/receptores de sangue em estudo podem ser altamente adequadas para surtos de arbovírus, conforme medido pela adequação de *Aedes* ponderada pela densidade populacional humana (Figura 14).

Em nosso estudo, destacamos que dados genéticos podem suportar dados epidemiológicos quando estes são fracos, ausentes ou afetados por sub-relatos. O atual sistema de vigilância DENV no Brasil é baseado em vigilância passiva, com testes clínicos através de testes de detecção de antígenos ou anticorpos. Muitas vezes existe reação sorológica cruzada, não apenas entre diferentes linhagens DENV, mas também com outros *flavivírus* circulantes[135-137]. Enquanto 213.000 casos de dengue foram notificados ao sistema de vigilância nacional em RJ e PE em 2012, inferimos pelo menos um número 3,4 vezes maior de infecções de dengue, de acordo

com as estimativas anteriores com base em dados sorológicos[89, 138]. Recentemente foram encontradas altas taxas de subnotificação de DENV na Bahia[139], ressaltando que o problema da doença causada pelos arbovírus no Brasil é provavelmente subestimado. De uma maneira geral, nossa abordagem pode ser aplicada a outros sorotipos DENV e a outros arbovírus disseminados no Brasil via o mesmo vetor *Aedes* e destaca o valor da integração de dados genéticos e epidemiológicos ao tentar entender a dinâmica de transmissão dos arbovírus.

Os modelos baseados na temperatura e pesquisas entomológicas mostraram que a região amazônica do Brasil é altamente adequada para a transmissão do DENV durante todo o ano[124, 140, 141], uma vez que o clado responsável pelo surto em 2012 parece descender de cepas virais que circulam na região amazônica. A explicação mais parcimoniosa para a ausência de casos notificados em centros urbanos estudados até 2012 (Fig. 18B) é de que o DENV4-II circulou sem ser detectado nas áreas tropicais na região Norte da América do Sul. Um padrão semelhante foi observado para os sorotipos 1, 2 e 3 de DENV[128]. Isso sugere uma dinâmica de fonte distribuidora de DENV no Brasil, com locais na região norte atuando como um reservatório do DENV ou como um local de escalonamento para a propagação de vírus de países vizinhos para o resto do Brasil. Além disso, o fato do Re ser >1 apenas parte do ano no Rio de Janeiro - como demonstrado pelos modelos SEIR e BDSKY, indica que o Rio recebe consistentemente novas linhagens de DENV. Em outras palavras, é improvável que as cadeias de transmissão dentro do Rio de Janeiro sejam sustentadas em várias estações do ano e, portanto, necessitarão de reintrodução da fonte. Outro vírus que foi introduzido a partir do Norte do Brasil é o genótipo asiático do vírus Chikungunya[84]; Após sua entrada no estado do Amapá, o vírus se espalhou rapidamente pelo país[81]. A região de entrada do vírus Zika no Brasil permanece desconhecida.

A densidade populacional no Brasil é mais alta nos centros urbanos litorâneos orientais e meridionais[126], em áreas climáticas onde o risco de estabelecimento do DENV, após a sua introdução, é geralmente limitado a uma determinada janela anual.

Em nosso estudo relatamos a primeira introdução de DENV4-I no Rio de Janeiro. Um único genoma isolado do DENV4-I já havia sido relatado em março de 2011 na Bahia[83], mas as duas sequências do Rio de Janeiro identificadas aqui, revelam uma segunda introdução independente deste genótipo no Brasil e há evidência de que o DENV4-I teve uma circulação limitada no estado do Amazonas em 2008 [142]. No entanto, esses achados apontam ainda mais para o fato de que tanto a mobilidade humana nacional quanto internacional, impulsionam a dinâmica epidemiológica dos arbovírus no Brasil[143].

Nossas estimativas de parâmetros virais e vetoriais obtidos utilizando modelagem matemática, são consistentes com as estimativas previamente publicadas para DENV e *Aedes*. Desta forma, nossas estimativas de Re para DENV4-II ocorridas em estação sazonal (entre os anos 2009-2012, de dezembro a abril) estão em torno de 2,2 (0,62-4,3), em linha com as estimativas anteriores[109, 144-146]. Além disso, verificamos que a variação de temperatura é um fator chave nos parâmetros que ditam a capacidade vetorial, consistentes com outros estudos[109, 124]. A estimativa de vida do vetor e o período extrínseco de incubação estão dentro do esperado para o clima tropical (úmido e seco) do Rio de Janeiro[124, 125, 134]. Os dados genéticos e de séries temporais captaram bem as oscilações sazonais entre janeiro e julho de 2012. Entretanto, as estimativas de potencial de transmissão (Re) sob as duas abordagens variaram consideravelmente antes de janeiro de 2012. Ambos os modelos provavelmente perderam poder preditivo antes dessa data devido à ausência de dados genéticos ou de notificação de casos.

A vigilância genômica nos bancos de sangue é particularmente útil para epidemias virais que se propagam sem serem detectadas em populações sem imunidade. Como exemplo, temos a propagação explosiva do vírus Zika no Brasil, que não foi detectado por pelo menos um ano antes de ser relatado pela primeira vez em março de 2015[147]. Além disso, há a possibilidade de que o vírus do Nilo Ocidental (recentemente encontrado em seres humanos no estado do Piauí[148]), o genótipo ECSA do vírus Chikungunya (disseminado na Bahia[136]) ou o vírus da encefalite japonesa (atualmente circulando no Sul da Ásia) possam causar futuras epidemias de arbovírus no Brasil. Existe uma necessidade de vigilância contínua de patógenos para proteger os suprimentos de sangue e reduzir o risco de transmissão associada à transfusão.

Embora investigássemos a epidemia de um surto urbano de DENV4, não avaliamos o impacto de fatores ecológicos e demográficos na disseminação geográfica do vírus. Outras análises com amostragem espacial mais abrangente são necessárias para identificar inequivocamente *hotspots* de transmissão de DENV no Brasil. Tais análises exigiriam uma rede nacional de vigilância molecular de grande escala, capaz de discriminar espécies de vírus e tipos de DENV. Isso geraria um entendimento quantitativo do modo e do ritmo da propagação dos arbovírus e permitiria que medidas preventivas efetivas fossem projetadas e implementadas de forma eficiente, por exemplo, focalizando as regiões de maior risco de importação e exportação em períodos específicos de elevado risco de surto. De forma geral, os métodos aqui utilizados poderiam ser aplicados a outras espécies de arbovírus. Isto poderia ser particularmente útil para testar a hipótese de uma associação entre a pré-exposição à dengue e a gravidade da doença do vírus Zika[149]. Embora o vetor predominante para o vírus Zika seja o *Aedes aegypti*, é possível que outras espécies de vetores estejam envolvidas na transmissão viral[150]. Embora a incorporação da

dinâmica de espécies de vetores em uma estrutura evolutiva viral permaneça desafiadora[151], a abordagem de modelagem empregada aqui poderia ser estendida para capturar não apenas a dinâmica multivetorial, mas para gerar estimativas diárias de parâmetros chave usando flutuações de temperatura em tempo real. Uma rede de vigilância genética ativa e responsiva para arbovírus é urgentemente necessária nas Américas, não apenas para compreender melhor a história passada da transmissão, mas também para prever a possível invasão de novos vírus, particularmente em regiões onde circula o vetor generalista *Aedes*.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Foram obtidas tendências epidêmicas semelhantes utilizando duas abordagens fundamentalmente diferentes, baseadas em fontes de dados independentes.

Foi possível estimar flutuações sazonais com os dois modelos utilizados (genético e ento-epidemiológico).

Se considerarmos o tamanho da população dos estados amostrados, foram ao menos 940.000 indivíduos infectados até o final de julho de 2012;

O possível ancestral comum da maioria das cepas responsáveis pelo surto no RJ teve sua introdução estimada entre abril de 2009 a setembro de 2010.

A epidemia de 2012 parece descender de cepas virais que circulam na região amazônica, a explicação mais parcimoniosa para a ausência de casos notificados nos centros urbanos estudados até 2012 é que o DENV4-II como ocorreu com o genótipo asiático do vírus Chikungunya;

Os voos nacionais para o Rio de Janeiro foi um dos impulsionadores para a epidemia de DENV4 no RJ em 2012

Este trabalho descreveu a primeira detecção do genótipo I no RJ em dois indivíduos não epidemiologicamente ligados, e a segunda introdução no Brasil;

Os bancos de sangue possuem grande potencial para vigilância e detecção precoce de surtos de arbovírus no Brasil;

Análises com amostragem espacial mais abrangente são necessárias para identificar inequivocamente *hotspots* de transmissão de DENV no Brasil.

Uma rede de vigilância genética ativa e responsiva para arbovírus é urgentemente necessária no Brasil, não só para compreender melhor a história de surtos passados, mas também para prever a possível invasão de novos vírus, particularmente em regiões onde circula o *Aedes*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. Nature. 2013;496(7446):504-7.

2. Mark E. Beatty WL, Dianna M. Edgil, Harold S. Margolis. Estimating the total world population at risK for locally acquired Dengue infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2007;77(S5):01.

3. WHO. World Health Organization Dengue and severe dengue. who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/; 2014.

4. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. Trends in microbiology. 2014;22(3):138-46.

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

6. Weaver SC. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. Trends in microbiology. 2013;21(8):360-3.

7. Guzman MG, Harris E. Dengue. Lancet. 2015;385(9966):453-65.

8. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2003;3(1):19-28.

9. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. Mol Biol Evol. 2003;20(1):122-9.

10. Myat Thu H, Lowry K, Jiang L, Hlaing T, Holmes EC, Aaskov J. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. Virology. 2005;336(2):163-72.

11. Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M. DGV: Dengue Genographic Viewer. Front Microbiol. 2016;7:875.

12. Zhang C, Mammen MP, Jr., 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. Journal of virology. 2005;79(24):15123-30.

13. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. Virology. 1993;197(1):216-24.

14. 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(2):244-51.

15. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. Virology. 2002;298(1):63-72.

16. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. Advances in virus research. 2008;72:1-76.

17. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. Journal of virology. 2000;74(7):3227-34.

18. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. The Journal of general virology. 1994;75 (Pt 1):65-75.

19. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. Virology. 2002;301(1):148-56.

20. Viruses ICoTo. Virus Taxonomy: 2016 Release Budapest, Hungary: International Committee on Taxonomy of Viruses; 2017 [updated August 2016. 2017 (MSL #31):[Available from: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

21. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, et al. Flaviviridae. Intervirology. 1985;24(4):183-92.

22. Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clinical microbiology reviews. 2000;13(1):67-82, table of contents.

23. Lindsey HS, Calisher CH, Mathews JH. Serum dilution neutralization test for California group virus identification and serology. Journal of clinical microbiology. 1976;4(6):503-10.

24. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. The Journal of general virology. 1989;70 (Pt 1):37-43.

25. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. Journal of virology. 1998;72(1):73-83.

26. Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(2):548-53.

27. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell. 2002;108(5):717-25.

28. Noble CG, Shi PY. Structural biology of dengue virus enzymes: towards rational design of therapeutics. Antiviral research. 2012;96(2):115-26.

29. Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. Pharmacol Ther. 2013;137(2):266-82.

30. Swaminathan S, Khanna N. Dengue: recent advances in biology and current status of translational research. Current molecular medicine. 2009;9(2):152-73.

31. Friebe P, Harris E. Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication. Journal of virology. 2010;84(12):6103-18.

32. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annual review of microbiology. 1990;44:649-88.

33. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nature reviews Microbiology. 2005;3(1):13-22.

34. Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Cohen WH, Gentry MK, Timchak RL, et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1989;41(5):576-80.

35. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. Genes & development. 1998;12(15):2293-304.

36. Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. Journal of virology. 2000;74(7):3253-63.

37. Novak JE, Kirkegaard K. Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. Genes & development. 1994;8(14):1726-37.

38. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology. 1998;245(2):203-15.

39. Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. Journal of virology. 2001;75(10):4633-40.

40. Vaughn DW. Invited commentary: Dengue lessons from Cuba. American journal of epidemiology. 2000;152(9):800-3.

41. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. The Journal of infectious diseases. 2000;181(1):2-9.

42. Zeng L, Falgout B, Markoff L. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. Journal of virology. 1998;72(9):7510-22.

43. Yocupicio-Monroy RM, Medina F, Reyes-del Valle J, del Angel RM. Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA. Journal of virology. 2003;77(5):3067-76.

44. Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. Advances in virus research. 2003;59:229-74.

45. Urcuqui-Inchima S, Patino C, Torres S, Haenni AL, Diaz FJ. Recent developments in understanding dengue virus replication. Advances in virus research. 2010;77:1-39.

46. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. Infect Disord Drug Targets. 2009;9(3):327-43.

47. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. Trends in microbiology. 2000;8(2):74-7.

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

49. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. Advances in virus research. 2003;59:315-41.

50. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2009;9(4):523-40.

51. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. Virology. 2002;303(1):110-9.

52. A AN, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, et al. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. Virology. 2004;329(2):505-12.

53. Aviles G, Meissner J, Mantovani R, St Jeor S. Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina. Virus research. 2003;98(1):75-82.

54. Aviles G, Paz MV, Rangeon G, Ranaivoarisoa MY, Verzeri N, Roginski S, et al. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995-2001. Emerging infectious diseases. 2003;9(6):738-42.

55. Aviles G, Rowe J, Meissner J, Manzur Caffarena JC, Enria D, St Jeor S. Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay. Archives of virology. 2002;147(11):2075-87.

56. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C, et al. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1995;52(3):241-6.

57. Chungue E, Deubel V, Cassar O, Laille M, Martin PM. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. The Journal of general virology. 1993;74 (Pt 12):2765-70.

58. Balmaseda A, Sandoval E, Perez L, Gutierrez CM, Harris E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1999;61(6):893-7.

59. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. Emerging infectious diseases. 2003;9(7):800-9.

60. Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kobayashi N. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. Archives of virology. 2001;146(7):1381-90.

61. Foster JE, Bennett SN, Vaughan H, Vorndam V, McMillan WO, Carrington CV. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. Virology. 2003;306(1):126-34.

62. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. Virology. 2004;329(1):168-79.

63. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. The Journal of general virology. 1997;78 (Pt 9):2279-84.

64. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. Seminars in immunology. 1992;4(2):121-7.

65. Almond J, Clemens J, Engers H, Halstead S, Khiem HB, Pablos-Mendez A, et al. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, VietNam. Vaccine. 2002;20(25-26):3043-6.

66. Balmaseda A, Hammond SN, Tellez Y, Imhoff L, Rodriguez Y, Saborio SI, et al. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. Tropical medicine & international health : TM & IH. 2006;11(6):935-42.

67. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1988;38(1):172-80.

68. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. American journal of epidemiology. 2002;156(1):40-51.

69. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1997;56(5):566-72.

70. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG, Laksono I, Ma'roef C, et al. A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1999;61(3):412-9.

71. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health. 2002;11(4):223-7.

72. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. American journal of epidemiology. 1984;120(5):653-69.

73. Rigau-Perez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. The Lancet infectious diseases. 2006;6(5):297-302.

74. Halstead SB. Dengue. Lancet. 2007;370(9599):1644-52.

75. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1977;26(3):337-43.

76. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. Nature reviews Microbiology. 2010;8(12 Suppl):S7-16.

77. Sabin AB. Research on dengue during World War II. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1952;1(1):30-50.

78. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. The Yale journal of biology and medicine. 1970;42(5):311-28.

79. Halstead SB, Nimmannitya S, Yamarat C, Russell PK. Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. Japanese journal of medical science & biology. 1967;20 Suppl:96-103.

80. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science. 1988;239(4839):476-81.

81. Janeiro SdEdSdRd. Boletim Epidemiologico 07/2015: Dengue Cenario Epidemiologico e Perspectiva para o Ano de 2016. 2015.

82. Acosta PO, Maito RM, Granja F, Cordeiro Jda S, Siqueira T, Cardoso MN, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerging infectious diseases. 2011;17(10):1979-80; author's reply 80-1.
83. Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. Emerging infectious diseases. 2012;18(11):1858-64.

84. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. BMC Med. 2015;13:102.

85. Faria NR, Azevedo Rdo S, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. Science. 2016;352(6283):345-9.

86. Azevedo RS, Silva EV, Carvalho VL, Rodrigues SG, Nunes-Neto JP, Monteiro H, et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. Emerging infectious diseases. 2009;15(11):1830-2.

87. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, McAuley JD, Tobler LH, Kamel H, et al. Screening the blood supply for West Nile virus RNA by nucleic acid amplification testing. The New England journal of medicine. 2005;353(5):460-7.

88. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2014;19(14).

89. Sabino EC, Loureiro P, Lopes ME, Capuani L, McClure C, Chowdhury D, et al. Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. The Journal of infectious diseases. 2016;213(5):694-702.

90. Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. The New England journal of medicine. 2008;359(14):1526-7.

91. Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. Aedes aegypti in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98(1):43-54.

92. Schatzmayr HG, Nogueira R. M. R., Travassos da Rosa, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1986;81(2):245-6.

93. Nogueira RMR, Miagostovich, M. P., Lampe, E., Sousa, R. W., Zagne, S. M. O., Schatzmayer, H. G. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1991. Epidemiol Infect. 1993;111(1):163-70.

94. Nogueira RMR, Miagostovich, M. P., Filippis, A. M. B., Pereira, M. A. S., Schatzmayer, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(7):925-6.

95. Munoz-Jordan JL, Collins CS, Vergne E, Santiago GA, Petersen L, Sun W, et al. Highly sensitive detection of dengue virus nucleic acid in samples from clinically ill patients. Journal of clinical microbiology. 2009;47(4):927-31.

96. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics. 2012;28(12):1647-9.

97. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30(4):772-80.

98. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. Bioinformatics. 2014;30(22):3276-8.

99. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014;30(9):1312-3.

100. Rambaut A. Path-O-Gen v1.4 2014 [Available from: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/pathogen/.

101. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol. 2012;29(8):1969-73.

102. Ayres DL, Darling A, Zwickl DJ, Beerli P, Holder MT, Lewis PO, et al. BEAGLE: an application programming interface and high-performance computing library for statistical phylogenetics. Syst Biol. 2012;61(1):170-3.

103. Kimura M, Weiss GH. The Stepping Stone Model of Population Structure and the Decrease of Genetic Correlation with Distance. Genetics. 1964;49(4):561-76.

104. Gill MS, Lemey P, Faria NR, Rambaut A, Shapiro B, Suchard MA. Improving Bayesian population dynamics inference: a coalescent-based model for multiple loci. Mol Biol Evol. 2013;30(3):713-24.

105. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. Mol Biol Evol. 2005;22(5):1185-92.

106. Rambaut A. FigTree v1.4.2. 2015.

107. Stadler T, Kuhnert D, Bonhoeffer S, Drummond AJ. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(1):228-33.

108. Bouckaert R, Heled J, Kuhnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLoS Comput Biol. 2014;10(4):e1003537.

109. Lourenco J, Recker M. The 2012 Madeira dengue outbreak: epidemiological determinants and future epidemic potential. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(8):e3083.

110. Lourenco J, Recker M. Natural, persistent oscillations in a spatial multi-strain disease system with application to dengue. PLoS Comput Biol. 2013;9(10):e1003308.

111. Wearing HJ, Rohani P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(31):11802-7.

112. Yang HM, Macoris ML, Galvani KC, Andrighetti MT, Wanderley DM. Assessing the effects of temperature on dengue transmission. Epidemiol Infect. 2009;137(8):1179-87.

113. Focks DA, Daniels E, Haile DG, Keesling JE. A simulation model of the epidemiology of urban dengue fever: literature analysis, model development, preliminary validation, and samples of simulation results. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1995;53(5):489-506.

114. Otero M, Solari HG, Schweigmann N. A stochastic population dynamics model for Aedes aegypti: formulation and application to a city with temperate climate. Bull Math Biol. 2006;68(8):1945-74.

115. Schoolfield RM, Sharpe PJ, Magnuson CE. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. J Theor Biol. 1981;88(4):719-31.

116. Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, Thomas MB, et al. Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by Aedes aegypti. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(18):7460-5.

117. Yang HM, Macoris ML, Galvani KC, Andrighetti MT, Wanderley DM. Assessing the effects of temperature on the population of Aedes aegypti, the vector of dengue. Epidemiol Infect. 2009;137(8):1188-202.

118. Trpis M, Hausermann W. Dispersal and other population parameters of Aedes aegypti in an African village and their possible significance in epidemiology of vector-borne diseases. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1986;35(6):1263-79.

119. Chan M, Johansson MA. The incubation periods of Dengue viruses. PLoS One. 2012;7(11):e50972.

120. Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. Bull World Health Organ. 1981;59(4):623-30.

121. Lounibos LP, Escher RL. Sex ratios of mosquitoes from long-term censuses of Florida tree holes. J Am Mosq Control Assoc. 2008;24(1):11-5.

122. Mohammed A, Chadee DD. Effects of different temperature regimens on the development of Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 2011;119(1):38-43.

123. Gelman A, Rubin DB. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. 1992:457-72.

124. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MU, Messina JP, Reiner RC, Jr., et al. Global temperature constraints on Aedes aegypti and Ae. albopictus persistence and competence for dengue virus transmission. Parasit Vectors. 2014;7:338.

125. Brady OJ, Johansson MA, Guerra CA, Bhatt S, Golding N, Pigott DM, et al. Modelling adult Aedes aegypti and Aedes albopictus survival at different temperatures in laboratory and field settings. Parasit Vectors. 2013;6:351.

126. Sorichetta A, Hornby GM, Stevens FR, Gaughan AE, Linard C, Tatem AJ. High-resolution gridded population datasets for Latin America and the Caribbean in 2010, 2015, and 2020. Sci Data. 2015;2:150045.

127. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, et al. The global compendium of Aedes aegypti and Ae. albopictus occurrence. Sci Data. 2015;2:150035.

128. Nunes MR, Palacios G, Faria NR, Sousa EC, Jr., 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.

129. Pybus OG, Suchard MA, Lemey P, Bernardin FJ, Rambaut A, Crawford FW, et al. Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(37):15066-71.

130. Raghwani J, Rambaut A, Holmes EC, Hang VT, Hien TT, Farrar J, et al. Endemic dengue associated with the co-circulation of multiple viral lineages and localized density-dependent transmission. PLoS Pathog. 2011;7(6):e1002064.

131. Nogueira RMR, Eppinghays, A. L. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:255-6.

132. Rocco IM, Silveira VR, Maeda AY, Silva SJ, Spenassatto C, Bisordi I, et al. First isolation of Dengue 4 in the state of Sao Paulo, Brazil, 2011. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2012;54(1):49-51.

133. Stadler T, Kouyos R, von Wyl V, Yerly S, Boni J, Burgisser P, et al. Estimating the basic reproductive number from viral sequence data. Mol Biol Evol. 2012;29(1):347-57.

134. Maciel-de-Freitas R, Codeco CT, Lourenco-de-Oliveira R. Daily survival rates and dispersal of Aedes aegypti females in Rio de Janeiro, Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2007;76(4):659-65.

135. Cardoso CW, Paploski IA, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MM, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. Emerging infectious diseases. 2015;21(12):2274-6.

136. Faria NR, Lourenco, J., Cerqueira, E. M., Lima, M. M., Pybus, O. G., Alcantara, L. C. J. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. PLoS Currents Outbreaks. 2016;1.

137. Pessoa R, Patriota JV, Lourdes de Souza M, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. Medicine (Baltimore). 2016;95(12):e3201.

138. Busch MP, Sabino EC, Brambilla D, Lopes ME, Capuani L, Chowdhury D, et al. Duration of Dengue Viremia in Blood Donors and Relationships Between Donor Viremia, Infection Incidence and Clinical Case Reports During a Large Epidemic. The Journal of infectious diseases. 2016;214(1):49-54.

139. Silva MM, Rodrigues MS, Paploski IA, Kikuti M, Kasper AM, Cruz JS, et al. Accuracy of Dengue Reporting by National Surveillance System, Brazil. Emerging infectious diseases. 2016;22(2):336-9.

140. Codeco CT, Honorio NA, Rios-Velasquez CM, Santos Mda C, Mattos IV, Luz SB, et al. Seasonal dynamics of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(4):614-20.

141. Degener CM, Azara TM, Roque RA, Codeco CT, Nobre AA, Ohly JJ, et al. Temporal abundance of Aedes aegypti in Manaus, Brazil, measured by two trap types for adult mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(8):1030-40.

142. de Melo FL, Romano, C. M., Zanotto, P.M.A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4):e390.

143. Bogoch, II, Brady OJ, Kraemer MU, German M, Creatore MI, Kulkarni MA, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. Lancet. 2016;387(10016):335-6.

144. Coelho GE, Burattini MN, Teixeira Mda G, Coutinho FA, Massad E. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(6):535-9.

145. Favier C, Degallier N, Rosa-Freitas MG, Boulanger JP, Costa Lima JR, Luitgards-Moura JF, et al. Early determination of the reproductive number for vector-borne diseases: the case of dengue in Brazil. Tropical medicine & international health : TM & IH. 2006;11(3):332-40.

146. Marques CA, Forattini OP, Massad E. The basic reproduction number for dengue fever in Sao Paulo state, Brazil: 1990-1991 epidemic. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994;88(1):58-9.

147. Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569-72.

148. Vieira MA, Romano AP, Borba AS, Silva EV, Chiang JO, Eulalio KD, et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2015;93(2):377-9.

149. Paul LM, Carlin, E. R., Jenkins, M. M., Tan, A. L., Barcellona, C. M., Nicholson, C. O., Trautmann, L., Michael, S. F., Isern, S. Dengue Virus Antibodies Enhance Zika Virus Infection. bioRxiv. 2016;http://dx.doi.org/10.1101/050112.

150. Ayres CF. Identification of Zika virus vectors and implications for control. The Lancet infectious diseases. 2016;16(3):278-9.

151. Rasmussen DA, Boni MF, Koelle K. Reconciling phylodynamics with epidemiology: the case of dengue virus in southern Vietnam. Mol Biol Evol. 2014;31(2):258-71.