



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

ESTUDO EVOLUTIVO DO VÍRUS DENGUE PREDOMINANTE NO
ESTADO DO AMAZONAS (2011- 2016), COM FOCO NA DISPERSÃO
VIRAL E NA FALHA NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

DANA CRISTINA DA SILVA MONTEIRO

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

DANA CRISTINA DA SILVA MONTEIRO

ESTUDO EVOLUTIVO DO VÍRUS DENGUE PREDOMINANTE NO
ESTADO DO AMAZONAS (2011- 2016), COM FOCO NA DISPERSÃO
VIRAL E NA FALHA NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Dr. Felipe Gomes Naveca

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M775e Monteiro, Dana Cristina da Silva
Estudo evolutivo do vírus dengue predominante no Estado do Amazonas (2011- 2016), com foco na dispersão viral e na falha no diagnóstico sorológico / Dana Cristina da Silva Monteiro. 2018
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Gomes Naveca
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Dengue. 2. Evolução viral. 3. Ns1. 4. Amazonas. I. Naveca, Felipe Gomes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DANA CRISTINA DA SILVA MONTEIRO

**ESTUDO EVOLUTIVO DO VÍRUS DENGUE PREDOMINANTE NO ESTADO DO
AMAZONAS (2011- 2016), COM FOCO NA DISPERSÃO VIRAL E NA FALHA NO
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Imunologia Básica e Aplicada, da
Universidade Federal do Amazonas como
requisito para obtenção do título de Mestre em
Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em 10 de Agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca, Presidente
Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia

Prof. Dr. Gonzalo José Bello Betancor, Membro
Instituto Oswaldo Cruz-IOC

Prof. Dr. Luís André Morais Mariúba, Membro
Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia

DEDICATÓRIA

Esta conquista eu dedico a Deus e aos meus queridos pais Dulcelene e João.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus todo poderoso que me guia em cada etapa da minha vida.

Aos meus queridos pais Dulcelene e João por todo amor e carinho dedicados a mim, e por acreditarem nos meus sonhos. E ao meu irmão Thiago por estar presente nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Dr. Felipe Naveca, pelo qual tenho imenso respeito e admiração. Obrigada por todos os ensinamentos e pela paciência dedica ao longo dos anos.

As amigas, Val, Karina, Brenda e Camila por toda a torcida, conselhos, ajuda nos experimentos e pela agradável companhia no laboratório.

A amiga Marineide por toda ajuda nos experimentos de sorologia.

Aos amigos Ligia, Victor, André e Antônio por toda torcida e agradável companhia.

Ao LACEN-AM e a Dra. Regina Figueiredo por disponibilizarem a amostras para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da UFAM.

A todos os professores do PPGIBA, em especial a Prof. Aya Sadahiro por todo carinho durante o estágio docência.

A FAPEAM pela Bolsa concedida.

A todos que sempre torceram por mim e que direta ou indiretamente colaboraram para essa conquista.

RESUMO

A dengue é considerada uma das mais importantes arboviroses que atingem o homem. No Brasil, em 2017, foram notificados 252.054 casos prováveis de dengue, dos quais somente no Amazonas foram registrados quase 4 mil casos da doença. A detecção do antígeno NS1 é hoje uma importante ferramenta no diagnóstico rápido da dengue, no entanto, estudos mostram que fatores como sorotipo circulante, região geográfica dos pacientes e infecções secundárias podem estar relacionados com a diminuição da sensibilidade do teste quando comparado com os métodos moleculares. Portanto, com o intuito de avaliar possíveis mutações que possam estar associadas à dispersão da dengue no Amazonas, bem como a falha na detecção do antígeno NS1, realizamos este estudo de evolução do sorotipo/genótipo do vírus do dengue predominante no período de 2011 a 2016 nos municípios do interior e na capital do estado. Ao todo foram analisadas 608 amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue coletados em 26 municípios do Amazonas. As amostras foram submetidas à extração de RNA viral e posteriormente ao método de PCR em tempo real, no qual 181 (29,7%) amostras tiveram resultado positivo. Posteriormente utilizando um protocolo de semi-nested PCR, observamos o predomínio de DENV-4 (N=80), seguido de DENV-2 (N=9) e DENV-1 (N=7). Para os sorotipos de DENV-1 e 2 foram conduzidas reações de PCR convencional e sequenciamento somente para a região do ENV, enquanto que para DENV-4 foi realizado também o sequenciamento da região codificadora para NS1. As análises filogenéticas seguiram de acordo com o método de máxima verossimilhança (ML) no programa PhyML, utilizando o modelo escolhido com a ajuda do programa jModeltest v2.1.7 e por Inferência Bayesiana utilizando o programa BEAST v1.8.4. Foram obtidas 27 sequências completas de ENV e 25 de NS1 de DENV-4, provenientes de sete municípios do Amazonas, todas pertencentes ao genótipo II. As sequências de DENV-1 (2016) e DENV-2 (2011) coletadas em Manaus pertenciam ao genótipo V e Asiático/Americano, respectivamente. Durante a análise das sequências de ENV de DENV-4 foram encontrados 140 sítios variáveis e oito trocas de aminoácido, já nas sequências NS1 foram observados 91 sítios variáveis e sete trocas de aminoácidos. De acordo com a análise filogeográfica ocorreram pelo menos duas introduções independentes do DENV-4 no estado do Amazonas. Além disso, nossos dados também mostraram a propagação do DENV-4 a partir de Manaus para os outros municípios dentro do estado do Amazonas. Nos testes de soroprevalência, 45% (164/360) das amostras foram reagentes para detecção de IgG, não sendo observado diferença significativa entre as amostras NS1-Positivas (43,9%) e NS1-Negativas (47,2%). Acreditamos que este estudo tenha importante papel na vigilância arboviral no estado do Amazonas, relatando não apenas os sorotipos e genótipos de DENV de diferentes municípios, mas também como se deu a disseminação do DENV-4 GII no Estado.

Palavras-Chave: Dengue; Evolução viral; NS1; Amazonas.

ABSTRACT

Dengue is considered one of the most important arboviruses that affects man. In Brazil, in 2017, 252,054 probable cases of dengue were reported, of which only 4,000 cases of the disease were recorded in Amazonas. However, studies have shown that factors such as circulating serotype, geographic region of patients and secondary infections may be related to decreased sensitivity of the test when compared to the molecular methods. Therefore, in order to evaluate possible mutations that may be associated with dengue dispersal in Amazonas, as well as the failure to detect the NS1 antigen, we performed this study of the evolution of the predominant dengue virus serotype/genotype in the period from 2011 to 2016 in the municipalities of the interior and in the capital of the state. A total of 608 serum samples from dengue suspects were collected from 26 municipalities in Amazonas. The samples were submitted to viral RNA extraction and later to the real-time PCR method, in which 181 (29.7%) samples had a positive result. Subsequently using a semi-nested PCR protocol, we observed the predominance of DENV-4 (N = 80), followed by DENV-2 (N = 9) and DENV-1 (N = 7). For the DENV-1 and 2 serotypes, conventional PCR and sequencing reactions were conducted only for the ENV region, whereas for DENV-4 the coding region for NS1 was also sequenced. Phylogenetic analyzes were performed according to the maximum likelihood (ML) method in the PhyML program, using the model chosen with the help of the jModeltest v2.1.7 program and Bayesian Inference using the BEAST v1.8.4 program. 27 complete sequences of ENV and 25 NS1 of DENV-4 were obtained from seven municipalities of Amazonas, all belonging to genotype II. The DENV-1 (2016) and DENV-2 (2011) sequences collected in Manaus belonged to genotype V and Asian / American, respectively. During the analysis of the DENV-4 ENV sequences, 140 variable sites and eight amino acid exchanges were found, whereas in the NS1 sequences 91 variable sites and seven amino acid exchanges were observed. According to the phylogeographic analysis, there were at least two independent entries of DENV-4 in the state of Amazonas. In addition, our data also showed the spread of DENV-4 from Manaus to other municipalities within the state of Amazonas. In the seroprevalence tests, 45% (164/360) of the samples were reagents for IgG detection, and no significant difference was observed between samples NS1-Positive (43.9%) and NS1-Negative (47.2%). We believe that this study has an important role in arboviral surveillance in the state of Amazonas, reporting not only the serotypes and genotypes of DENV from different municipalities, but also how the DENV-4 GII spread in the State.

Keywords: Dengue; Viral evolution; NS1; Amazonas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa com a distribuição geográfica mundial dos surtos de dengue.....	19
Figura 2 - Ciclo de transmissão silvestre e urbano do vírus da dengue.....	22
Figura 3 - Imagem ilustrativa dos eventos imunológicos envolvidos na infecção por DENV.....	26
Figura 4 - Representação do período de detecção viral, proteína NS1 e de anticorpos específicos para dengue.....	29
Figura 5 - Partícula viral madura.....	31
Figura 6 - Representação esquemática do genoma do DENV.....	32
Figura 7 - Imagem ilustrativa dos mecanismos de replicação do vírus dengue.....	34
Figura 8 - Mapa com a localização dos municípios do Amazonas incluídos no estudo.....	39
Figura 9 - Fluxograma com as etapas do processamento das amostras.....	40
Figura 10 - Esquema das reações de PCR para amplificação dos amplicons de DENV-4 (A), DENV-1 (B) e DENV-2 (C).....	47
Figura 11 - Parâmetros utilizados no programa BEAUti para análise filogeográfica das sequências de DENV-4.....	53
Figura 12 - Número de amostras analisadas de acordo com o ano de coleta.....	57
Figura 13 - Resultados de sorotipagem de acordo com ano de coleta. A figura mostra o número de amostras positivas para os diferentes sorotipos no período de 2011 a 2016.....	58
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Teste de padronização da 1ª etapa da reação de semi-nested PCR.....	59
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Resultados da 1ª e 2ª etapa da semi-nested PCR para DENV-1 e 2.....	60
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Visualização dos produtos gerados na PCR convencional para DENV-4.....	61
Figura 17 - Número de amostras positivas na PCR-convencional para DENV-4 de acordo com o município de origem.....	62
Figura 18 - Resultado de genotipagem da amostra 16110401 de DENV-1.....	63
Figura 19 - Árvore filogenética baseada nas sequências de envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-1.....	64

Figura 20 - Resultado de genotipagem da amostra 26718 de DENV-2.....	65
Figura 21 - Árvore filogenética baseada nas sequências de envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-2 e a sequência da amostra 26718.....	66
Figura 22 - Resultado de seleção evolutiva utilizando o programa MEME.....	68
Figura 23 - Árvore filogenética baseada nas sequências do envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-4 e nas cepas obtidas neste estudo.....	71
Figura 24 - Árvore filogenética de ML e mapa de distribuição das amostras de DENV-4 (ENV) obtidas em diferentes municípios do Amazonas.....	72
Figura 25 - Árvore filogenética baseada nas sequências de ENV de isolados brasileiros do genótipo II de DENV-4 e nas cepas obtidas neste estudo.....	73
Figura 26 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências utilizando o software TempEstv1.5.1.....	75
Figura 27 - Resultados da análise realizada com o software Tracer v1.6.....	77
Figura 28 - Árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC) baseada em inferência Bayesiana de 115 sequências de ENV do DENV-4 GII no programa BEAST v1.8.4. e a ferramenta LogCombiner v1.8.0 onde são resumidas as informações de distância genética, espacial e temporal.....	78
Figura 29 - Árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC) baseada na análise Bayesiana de 115 sequências de ENV do DENV-4/GII no programa BEAST v1.10.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
Ct	Cyclethreshold
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DTT	1,4-ditiotreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENV	Proteína de envelope
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
NS1	Proteína Não estrutural 1
M	Molar
Min	Minutos
mM	Milimolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR	PCR em tempo real com Transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Roraima
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
U	Unidades
UTR	<i>untranslated region</i>
μL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores e sondas utilizados no RT-qPCR para detecção de DENV e MS2.....	41
Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação de semi-nested PCR para sorotipagem do DENV (LANCIOTTI et al, 1992).....	43
Tabela 3 - Pares de iniciadores utilizados nas duas etapas e tamanho dos <i>amplicons</i> gerados.....	44
Tabela 4 - Iniciadores usados na PCR-convencional para amplificação das regiões ENV e NS1.....	44
Tabela 5 - Iniciadores usados na 1ª PCR para amplificação da região do ENV dos sorotipos 1, 2 e 3 do DENV.....	46
Tabela 6 - Iniciadores usados na semi-nested PCR para amplificação da região do ENV dos sorotipos 1, 2 e 3 do DENV.....	46
Tabela 7 - Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento de DENV-4.....	49
Tabela 8 - Iniciadores usados nas reações de sequenciamento de DENV-1 e DENV-2.....	50
Tabela 9 - Resultados obtidos pelo método RT-qPCR para detecção do RNA viral.....	55
Tabela 10 - Número de amostras processadas de acordo com o município.....	56
Tabela 11 - Resultados de sorotipagem utilizando o método de semi-nested PCR (LANCIOTTI et al.,1992).....	58
Tabela 12 - Relação de amostras sequenciadas com seus respectivos números de identificação, município de origem, resultado de NS1, data da coleta e regiões do genoma sequenciadas.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. Histórico da dengue no mundo.....	20
2.1.1. Dengue no Brasil	19
2.1.2. Dengue no Amazonas	22
2.2. Ciclo de Transmissão.....	22
2.3. Aspectos clínicos	25
2.4. Patogenia.....	25
2.5. Diagnóstico da dengue	29
2.5.1. Isolamento viral.....	29
2.5.2. Diagnóstico molecular	29
2.5.3. Pesquisa de anticorpos	29
2.5.4. Detecção do antígeno NS1	33
2.6. Características do vírus da dengue	33
2.6.1. Proteínas virais.....	35
2.7. Replicação viral.....	35
2.8. Origem e evolução do DENV	35
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Considerações éticas	41
4.2. Amostras utilizadas no estudo	41
4.3. Extração de Ácido Ribonucléico (RNA viral).....	43
4.4. PCR em tempo real com Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	43
4.5. Produção de Ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).....	43
4.6. Reação de semi-nested PCR (sorotipagem)	43
4.7. PCR - convencional para as regiões do envelope e NS1	46
4.8. Precipitação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol (PEG).....	43
4.9. Sequenciamento dos genes que codificam para as proteínas de Envelope e NS1.....	43
4.10. Análise das sequências e filogenia.....	53
4.11. Análise filogeográfica	53
4.12. Imunoensaio para detecção de IgG anti-dengue	53
5. RESULTADOS	53

5.1. RT-PCR em Tempo Real	53
5.2. Identificação dos sorotipos virais	53
5.3. Padronização e reações de PCR.....	59
5.4 Sequenciamento de Filogenia.....	53
5.5. Imunoensaio para detecção de IgG anti-dengue.....	53
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÃO.....	94
8. REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

A dengue é considerada uma das mais importantes arbovirose que atingem o homem. No mundo, são estimados que cerca de 3,6 bilhões de pessoas estão em risco de contrair a doença, principalmente aquelas que vivem em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas e ambientais favorecem o desenvolvimento e proliferação do principal agente vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (GÚZMAN et al., 2010; WHO, 2018).

A infecção por dengue pode se manifestar de diferentes formas. Na grande maioria evolui de forma assintomática ou com febre indiferenciada, no entanto, também pode evoluir para as formas graves da doença, que podem incluir desde manifestações hemorrágicas até o comprometimento de órgãos (BRASIL, 2016). Desde 2014, o Brasil vem adotando uma nova classificação dos casos de dengue, baseado na revisão realizada pela Organização Mundial da Saúde que diferencia os casos em: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Evidências mostram que uma das principais causas para episódios de dengue grave sejam infecções subsequentes com os diferentes sorotipos do vírus (WHO, 2009; WHO, 2015).

No Brasil, todos os anos são registradas epidemias desta arbovirose. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, somente em 2017 foram notificados 252.054 casos prováveis de dengue no país, sendo 271 casos de dengue grave e 2.590 casos de dengue com sinais de alarme, além de um total de 141 óbitos. Comparando estes números com o mesmo período de 2016 onde foram registrados 1.483.623 casos prováveis de dengue, houve uma considerável redução dos casos suspeitos, o que, segundo o Ministério da Saúde, pode ser atribuído a alguns fatores como a intensificação ao combate ao mosquito, escassez de chuvas em determinadas regiões do país e também a imunidade adquirida por parte da população (BRASIL, 2018).

No Amazonas, em 2017 foram registrados quase 4 mil casos da doença, sendo o terceiro estado da região norte com maior número de notificações (BRASIL, 2018). De acordo com o boletim da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS-AM) referente ao ano de 2016, dos 62 municípios do Amazonas, 39 tiveram registros da doença (FVS, 2016). Apesar dos dados epidemiológicos disponíveis, poucas são as informações a

respeito dos sorotipos que circulam na região, principalmente nos municípios do interior do estado.

Do total de casos anuais da doença, estima-se que mundialmente ocorram cerca de 500.000 casos de dengue com sinais de alarme ou dengue grave e mais de 25.000 mortes, principalmente entre crianças. Por isso identificar precocemente os casos da doença é de vital importância para a tomada de decisões e implantação de medidas que permitam evitar principalmente a ocorrência de óbitos (WHO, 2009; BRASIL, 2016).

Entre as técnicas utilizadas atualmente para o diagnóstico precoce da dengue, se destaca a detecção do antígeno NS1. Esta é uma glicoproteína que pode ser detectada no soro sanguíneo do indivíduo infectado, geralmente do primeiro ao nono dia da doença (YOUNG et al., 2000). Sendo demonstrada uma maior sensibilidade na detecção desta proteína por kits comerciais, quando utilizadas amostras coletadas até o terceiro dia após o início dos sintomas (DUSSART et al., 2006; SILVA et al., 2006; HANG et al., 2009).

Embora a detecção da proteína NS1 seja uma importante ferramenta para o diagnóstico rápido da dengue, diversos grupos em diferentes países relataram uma baixa sensibilidade dos testes em comparação com métodos moleculares. Alguns estudos mostraram que a baixa sensibilidade pode estar relacionada ao sorotipo do dengue, região geográfica dos pacientes e também em casos de infecções secundárias (HANG et al., 2009; GÚZMAN et al., 2010; ARYATI et al., 2013; ACOSTA et al., 2014).

Levando em consideração a falha na detecção do antígeno NS1, que pode contribuir para o atraso na tomada de decisão durante o manejo do paciente, e o desconhecimento dos sorotipos virais circulantes, principalmente nos municípios distantes da capital do Amazonas, tem-se a necessidade de um estudo que contribua para o aumento das informações do vírus dengue circulante no estado.

Portanto, neste estudo buscou-se identificar os sorotipos/genótipos dos vírus dengue circulantes nos municípios do Amazonas durante o período de 2011 a 2016, bem como descrever possíveis mutações ocorridas na região do envelope viral que podem ter contribuído para a fixação de linhagens virais e também na proteína NS1, que podem estar relacionadas com a falha diagnóstica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Histórico da dengue no mundo

No mundo, os primeiros casos bem documentados antes do isolamento viral ocorreram na ilha de Java (Jacarta) e no Egito em 1779, e na Filadélfia em 1780. No entanto, o registro mais antigo foi encontrado em uma enciclopédia chinesa de sintomas e remédios da doença que foi publicado durante a Dinastia Chin (265 a 420 d.C.) e editado em 610 d.C. (Dinastia Tang) e em 992 d.C. (Dinastia Sung do Norte). Nesse período a doença era conhecida pelos chineses como “veneno da água”, pois já se pensava existir uma relação entre insetos voadores e a água. Posteriormente, em 1635 nas Índias Francesas Ocidentais e em 1699 no Panamá também foram feitos registros de surtos relacionados à doença (GLUBER, 1998).

Durante muitos séculos a dengue foi vista como doença benigna, mas depois da segunda Guerra mundial surgiram casos de febre hemorrágica grave, o que pode ter sido ocasionado pela circulação de vários sorotipos na mesma região geográfica. Em 1953, o primeiro registro de surto de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) ocorreu nas Filipinas, mas a confirmação de que o agente causador seria o vírus dengue (DENV) só ocorreu em 1959, com a epidemia de Bangkok na Tailândia (MARTINEZ-TORRES, 1990).

Apesar de a guerra ter contribuído para a distribuição geográfica do vírus e seu vetor, foi a urbanização do sudeste asiático após a guerra que proporcionou as condições ideais para a propagação do vetor (OOI; GLUBER, 2009). A epidemia de FHD atingiu países como Índia, Sri Lanka, Maldivas, Paquistão e o leste da China. No Pacífico Sul e Central, vários países insulares também sofreram epidemias, entre eles Niue, Palau, Micronésia, Ilhas Cook, Taiti, Nova Caledônia e Vanuatu (GLUBER, 1998).

Nas Américas entre as décadas de 50, 60 e maior parte de 70 as epidemias eram raras, pois o principal mosquito vetor, *Aedes aegypti*, tinha sido erradicado de grande parte das Américas Central e do Sul, através de campanhas para eliminação do mosquito que consistiam de fumigação e eliminação dos criadouros. Em 1962, 18 países e ilhas do caribe alcançaram a erradicação, demonstrando assim o sucesso da campanha. No entanto, com perda política importante na maioria dos países que alcançaram a erradicação, houve a diminuição gradual da vigilância, o que fez com que pequenas reinfestações não pudessem

mais ser detectadas. Além disso, o saneamento ambiental insuficiente nos centros urbanos e o rápido crescimento populacional também contribuíram para a circulação do mosquito nas áreas das quais havia sido eliminado (GLUBER, 1998; DICK et al., 2012).

A partir da década de 80 os casos de dengue passaram a crescer consideravelmente. Em 1981 em Cuba, foram registrados 344.203 casos, incluindo 10.312 casos de dengue hemorrágica e 158 óbitos (101 óbitos de crianças) causados pelo genótipo Asiático/Americano do DENV-2, na que foi considerada a principal epidemia de FHD relatada na região (KOURI et al., 1989). No mesmo ano o genótipo I do DENV-4, foi introduzido no Caribe, México e Américas Central e do Sul, causando epidemias em muitos países que em anos anteriores já haviam sofrido surtos causados pelo DENV-1. Em alguns desses países os surtos foram associados a casos esporádicos de FHD como no Suriname (1982), México (1984), Porto Rico (1986), e El Salvador (1987) (DICK et al., 2012).

A reintrodução do DENV-3, genótipo III, nas Américas, ocorreu em 1994 com os primeiros registros na Nicarágua e no Panamá, se alastrando posteriormente para o México e outros países da América Central. Até que em 1998 chega ao Caribe, Porto Rico e América do Sul (GLUBER, 1998).

No continente africano os primeiros relatos de dengue ocorreram no final do século XIX e início do século XX, com epidemias que foram registradas em países como Zanzibar (1823 e 1870), Burkina Faso (1925), Egito (1887 e 1927), África do Sul (1926-1927) e Senegal (1927-1928). Em 50 anos desde o primeiro registro, foram notificados 20 surtos de dengue confirmados laboratorialmente em 15 países da África, sendo a maioria na África Oriental. Além dos surtos, também foram registradas cinco grandes epidemias que somam quase 300.000 casos da doença: Seychelles (1977-1979), Ilha da Reunião (1977-1978), Djibuti (1992-1993), Comores (1992-1993) e Cabo Verde (2009). Atualmente, todos os 4 sorotipos de DENV circulam no continente (AMARASINGHE et al., 2011).

Hoje a dengue é endêmica em pelo menos 100 países localizados em regiões tropicais e subtropicais da Ásia, Pacífico, Américas, África e Caribe (CDC, 2017) (Figura 1). Com um maior número de casos em países em desenvolvimento, onde o crescimento desordenado da população, assim como a falta de saneamento básico contribuem para a proliferação do mosquito vetor. Considerada um grave problema de saúde pública, estima-se que a dengue

cause anualmente em todo o mundo cerca de 50 a 100 milhões de novas infecções (GÓMEZ-DANTÉS; WILLOQUET, 2009; WHO, 2017).

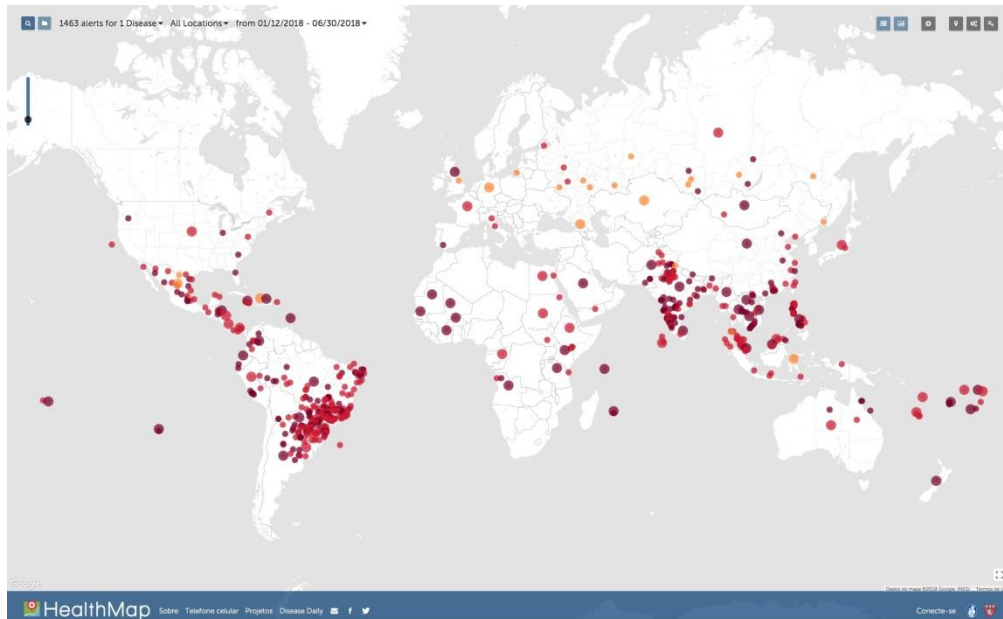


Figura 1 - Mapa com a distribuição geográfica mundial dos surtos de dengue

FONTE: <http://healthmap.org/dengue/pt/>, acesso: 30/06/2018.

2.1.1. Dengue no Brasil

No Brasil os primeiros relatos de surtos datam de 1846 a 1853, ocorridos em São Paulo e Rio de Janeiro. No entanto, as primeiras citações na literatura só foram descritas em 1916 na cidade de São Paulo (SP) (MEIRA et al., 1916) e em 1923 na cidade de Niterói (RJ) (PEDRO et al., 1923). Apesar de casos registrados em anos anteriores a primeira epidemia de dengue no Brasil, confirmada laboratorialmente, somente foi registrada em 1982, na qual foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, de Boa Vista (RR) (OSANAI, 1984; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Entre os anos de 1986 e 1987, de acordo com um levantamento sorológico realizado no Rio de Janeiro, mais de um milhão de pessoas foram infectadas pelo DENV-1, na que foi considerada a primeira grande epidemia já registrada no país. E ainda em 1987, o DENV-1 também atingiu algumas capitais do Nordeste, com uma incidência de 64,6 por 100 mil habitantes, totalizando em dois anos 134.731 casos da doença (TEIXEIRA et al., 2009).

A identificação da circulação de DENV-2 ocorreu em 1990 em Niterói-RJ, onde foram registrados cerca de 17.000 casos, dos quais 2% apresentavam manifestações clínicas graves (BRASIL, 2002). Posteriormente, todas as regiões do Brasil sofreram surtos causados por esse sorotipo, surgindo neste período os primeiros registros de casos fatais relacionados à infecção secundária (NOGUEIRA et al., 2007). Em dezembro de 2000 no mesmo estado, foi identificada pela primeira vez a circulação do DENV-3, causando posteriormente surtos em pequenas cidades e estados da região Sul anteriormente livres de dengue, atingindo em apenas dois anos e meio, 22 dos 26 estados brasileiros (NETO et al., 2005).

No período entre 2002 e 2006 o DENV-3 era o sorotipo mais prevalente no país, no entanto, a partir de 2007 o responsável pela maior parte dos casos passou a ser o DENV-2, causando um surto intenso no estado do Rio de Janeiro com o aumento de casos graves principalmente entre crianças e adolescentes, sendo notificadas entre os anos de 2007 e 2008, 851 mortes em todo o país. No ano seguinte, quase um milhão de casos de dengue e 665 óbitos foram registrados, desta vez o DENV-1 era o responsável pela maior parte deles. Com exceção do estado do Espírito Santo, onde dos 53.708 casos notificados, a maioria era causado pelo DENV-2, e em seguida pelo DENV-1 (FARES et al, 2015).

2.1.2. Dengue no Amazonas

No Amazonas a primeira epidemia de dengue ocorreu entre os anos de 1998 e 1999, na cidade de Manaus, capital do estado. O registro foi realizado através de um sistema de vigilância para síndromes febris agudas indiferenciadas, que foi adotado pela Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Nesse período foram detectadas 3.434 amostras positivas para dengue, sendo o DENV-1 o sorotipo responsável pela epidemia (FIGUEIREDO et al., 2004; FIGUEIREDO, 2008).

Em 2001, uma nova epidemia atingiu o estado, onde foram registrados 18.595 casos suspeitos e a circulação dos sorotipos de DENV-1 e 2. A partir daí, com o aumento da incidência da dengue durante os períodos de chuvas a doença passou a adquirir um caráter endêmico. Posteriormente, analisando amostras coletadas em 2006 e 2007, foram observadas

mudanças no comportamento da doença, tanto em relação à distribuição mensal, quanto no aumento da frequência das formas graves e maior incidência em menores de 15 anos. Além disso, em 2007 foi identificada a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1, 2 e 3 (ROCHA; TAUIL, 2009).

No ano de 2008 em Manaus, foi realizado o primeiro registro de DENV-4 após 25 anos sem registro do sorotipo no País (FIGUEIREDO et al., 2008). Nesse mesmo período segundo um levantamento conduzido no município de Coari, utilizando os dados epidemiológicos obtidos pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde, foi identificado pela primeira vez um surto da dengue na região do Médio Solimões, onde foram registrados quase 700 casos da doença, atingindo principalmente a faixa etária de 10-49 anos (COSTA et al., 2011).

Em 2011, o Amazonas sofreu a pior epidemia já registrada no estado com um total de 57.809 casos confirmados, dos quais 42.249 foram casos registrados somente em Manaus (SUSAM, 2015) e onde pela primeira vez foi detectada a circulação simultânea dos quatro sorotipos do dengue (BASTOS et al., 2012).

De acordo com o levantamento realizado por De Castro e colaboradores (2018), entre 2010 e 2011 a epidemia de dengue atingiu 49 dos 62 municípios do Amazonas, onde em 22 deles as epidemias foram consideradas de alta intensidade, ampla variedade e de longo período de tempo, incluindo principalmente os municípios localizados no entorno de Manaus e Rio Negro. Sendo observada uma associação significativa entre a ocorrência de epidemias extensas de dengue e o número médio de dias com precipitação.

2.2. Ciclo de Transmissão

O ciclo de transmissão do DENV ocorre de duas formas ecológicas e evolucionariamente distintas: o ciclo silvestre, envolvendo primatas não humanos e mosquitos *Aedes* arbóreos, com registros somente no sudeste da Ásia e África, e o ciclo urbano, que envolve o homem e os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (*Stegomia*), que

apresentam hábitos domiciliares e peridomiciliares, respectivamente (CHEN; VASILAKIS et al., 2011) (Figura 2).

O homem é o único hospedeiro que comprovadamente desenvolve a expressão clínica da doença, nos primatas não humanos infectados experimentalmente não foram observados sinais clínicos da infecção, apesar da presença de viremia (GLUBER, 1998). No ciclo urbano o *Aedes aegypti* é o principal mosquito vetor, entretanto outras espécies, tais como *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis*, podem atuar como vetores secundários (CHEN; VASILAKIS, 2011).

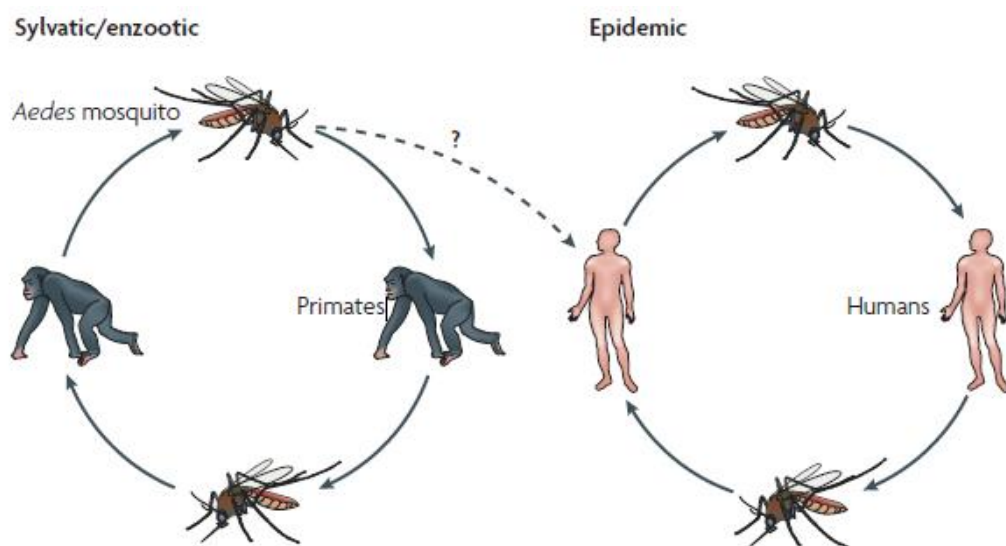


Figura 2 - Ciclo de transmissão silvestre e urbano do vírus da dengue

FONTE: WHITEHEAD et al., 2007.

A transmissão se inicia quando a fêmea do mosquito pica uma pessoa infectada. O vírus multiplica-se no intestino médio do vetor e infecta outros tecidos chegando finalmente às glândulas salivares, período conhecido como incubação extrínseca e que dura em média de 8 a 12 dias. A partir daí o mosquito torna-se apto a transmitir o vírus durante toda a vida (WHO, 2017). Outro importante mecanismo de manutenção e transmissão do DENV sugerido é a transmissão vertical, presente especialmente durante os períodos prolongados de seca ou interepidêmicos (CHEN; VASILAKIS, 2011).

Os recipientes artificiais produzidos e descartados pelo homem de forma inadequada, com capacidade de acumular água tornam-se os principais criadouros do mosquito. Após a postura dos ovos nesses recipientes, ao entrarem em contato com a água em pouco menos de

30 minutos os ovos eclodem e durante sete a nove dias a larvas passam por quatro fases até dar origem ao mosquito adulto. Em geral, a maioria dos mosquitos alimenta-se de néctar de plantas, sendo o comportamento hematofágico, característico exclusivamente das fêmeas, uma vez que as proteínas presentes no sangue auxiliam na maturação dos ovos (NATURE EDUCATION, 2017).

2.3. Aspectos clínicos

A dengue é uma doença febril aguda que pode ser causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais, ocasionando desde um quadro de infecção sintomático a assintomático. Quando sintomático causa uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, variando de formas oligossintomáticas até quadros graves. As principais manifestações clínicas são geralmente febre alta (39°C a 40°C), dor retro-orbital, artralgia, mialgia, anorexia e desconforto abdominal (BRASIL, 2016).

Segundo a nova classificação adotada pelo Ministério da Saúde, são considerados casos suspeitos de dengue, aqueles que apresentarem febre entre dois e sete dias, e duas ou mais manifestações clínicas tais como náusea, vômitos, exantema, cefaléia, mialgias, artralgia, dor retro-orbital, petéquias ou prova do laço positiva. Além disso, são avaliados outros aspectos, como local de residência ou viagens nos últimos 14 dias para regiões onde estejam ocorrendo casos de transmissão da doença ou que tenham a presença do vetor (BRASIL, 2016).

Os casos suspeitos de dengue com sinais de alarme são caracterizados pelo surgimento de um ou mais sinais no período de diminuição ou desaparecimento da febre, como a dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, retenção de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural (lipotímia), hepatomegalia maior do que dois centímetros e aumento progressivo do hematócrito (BRASIL, 2016). Já os casos suspeitos de dengue grave são aqueles que podem apresentar choque, ocasionado pelo extravasamento de plasma, no qual é evidenciado taquicardia, extremidades frias e tempo de enchimento capilar igual ou maior que três

segundos, pulsação fraca, hipotensão arterial, retenção de líquidos com insuficiência respiratória e sangramentos. Além disso, também pode ocorrer o comprometimento de órgãos como fígado, coração, sistema nervoso central, dentre outros (WHO, 2009).

Até o momento não há um tratamento específico para dengue. Na maioria dos casos o paciente passa por uma série de avaliações para saber o grau de risco da doença e recomenda-se a reposição de eletrólitos e administração de medicamentos que combatem os sintomas, como dor e febre. Descartando aqueles medicamentos que podem ocasionar o aumento de hemorragias como o ácido acetil salicílico (AAS), anti-inflamatórios não esteróides e anticoagulantes (BRASIL, 2016).

2.4. Patogenia

Após a picada do mosquito o vírus é inoculado realizando a primeira replicação em células estriadas, lisas e fibroblastos, bem como linfonodos locais. Posteriormente, infectam monócitos, macrófagos e células dendríticas (CD), consideradas principais alvos. Uma vez que o vírus esteja disseminado pelo corpo tem-se a viremia (FIGUEIREDO, 1999; SALAZAR et al., 2014). O mecanismo exato utilizado pelo vírus para entrar na célula não é conhecido, mas vários receptores têm sido implicados na ligação e entrada do vírus em diferentes tipos de células de mamíferos, incluindo moléculas de adesão de células dendríticas (DC-SIGN), receptor de manose, glicosaminoglicanos (GAGs), proteínas de choque térmico HSP90/ HSP70 , moléculas TIM/TAM, bem como os receptores Fc de macrófagos (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

O conhecimento a respeito da patogenia da dengue ainda é limitado, mas fatores tanto do hospedeiro quanto do vírus parecem estar associados aos casos graves. Dentre as principais hipóteses sobre o desenvolvimento de casos graves que foram sugeridas a partir de estudos realizados em regiões epidêmicas destacam-se a patogênese mediada por anticorpos, “tempestade” de citocinas, fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro, características do vírus isolado e carga viral durante a fase aguda (SUN; KOCHER, 2013; FARES et al., 2015).

A infecção secundária com aumento de anticorpos heterólogos é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de dengue grave. Isto se deve a presença de anticorpos anti-DENV produzidos na primeira infecção que tentam inibir a replicação viral através da neutralização do vírus, no entanto, essa ação gera um aumento da infecção de células portadoras do receptor Fc, mecanismo que é conhecido como infecção facilitada por anticorpos (do inglês: *antibody-dependent enhancement-ADE*) (MELINO; PACI, 2007; GÚZMAN et al, 2016). As respostas das células TCD4+ e TCD8+ de memória também desempenham papel importante na patogênese da dengue, ao induzir a produção de citocinas, e enzimas intracelulares que levam a perda de plasma, choque e morte celular (GÚZMAN; KOURI, 2004). Os eventos imunológicos que ocorrem durante a infecção por DENV são mostrados na figura 3.

Alguns eventos autoimunes relacionados a proteínas virais também são estudados. Evidências mostram que a proteína NS1 pode estar envolvida com a disfunção das defesas do hospedeiro e defeitos no sistema circulatório, possivelmente ocasionado pela geração de anticorpos cross-reativos que levariam a depleção plaquetária, apoptose de células endoteliais e ativação do complemento com dano tecidual (AMORIM et al., 2014). Estudos realizados em camundongos demonstraram que anticorpos anti-NS1 ligam-se às plaquetas humanas inibindo a sua agregação e levando ao aumento da hemorragia (WU-HSIEH; YEN; CHEN, 2009). Outro papel no mecanismo de evasão imune relacionado à proteína NS1 é a inibição da ativação da via clássica e da via das lectinas interagindo diretamente com C4 e C1s, protegendo o vírus da neutralização dependente de complemento (AVIRUTNAN et al., 2010).

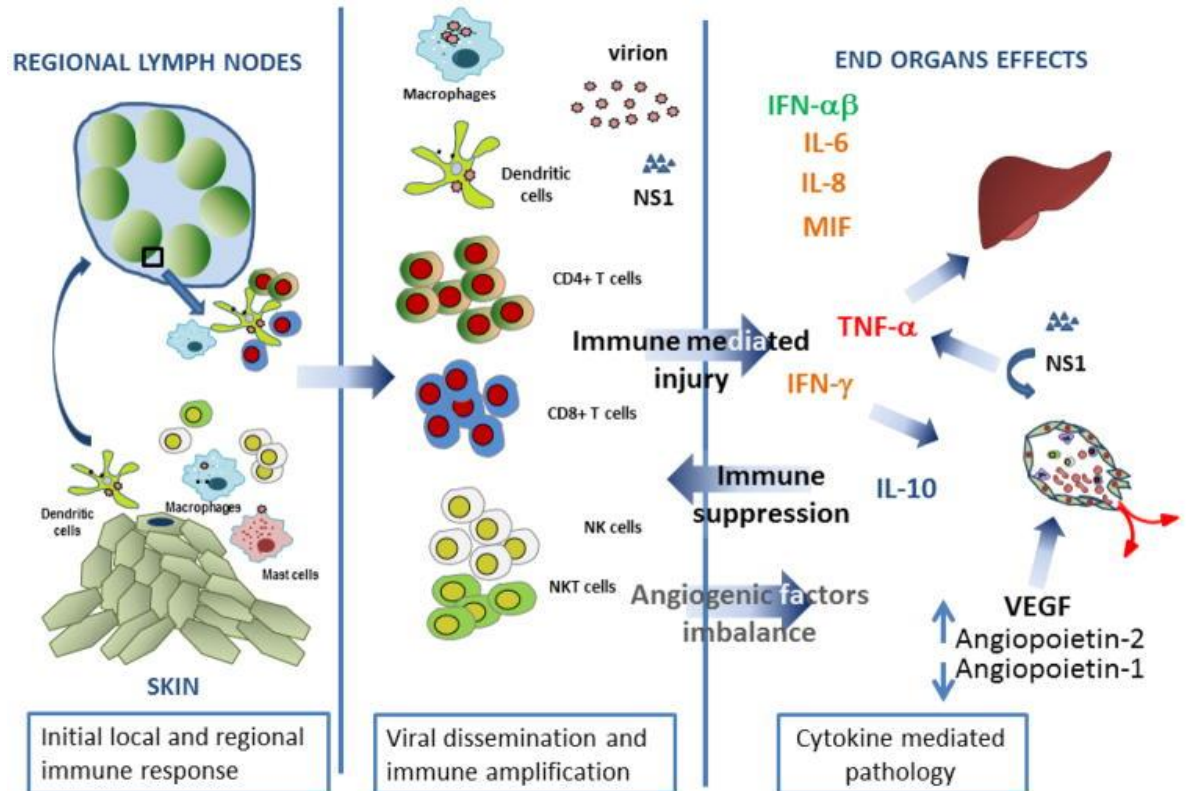


Figura 3 - Imagem ilustrativa dos eventos imunológicos envolvidos na infecção por DENV

FONTE: SRIKIATKHACHORN; MATHEW; ROTHMAN, 2017.

A presença de patologias no hospedeiro como anemia falciforme, diabetes mellitus e asma brônquica, assim como fatores genéticos como o haplótipo HLA também já foram considerados fatores de risco para o surgimento dos casos graves durante a epidemia de dengue hemorrágica ocorrida em Cuba em 1981 (FIGUEIREDO, 1999).

Muitos trabalhos de patogênese são realizados comparando os pacientes com febre da dengue e dengue grave, e embora ambos os casos possam estar associados ao mesmo sorotipo, algumas sequências virais parecem estar relacionadas com uma maior frequência à casos graves. Além disso, alguns sorotipos podem causar quadros hemorrágicos em infecções secundárias, e em infecções primárias podem variar de infecção leve a assintomática. No entanto, em indivíduos que apresentem algum tipo de susceptibilidade é possível que a forma grave apareça durante a infecção primária, desta forma segundo Gúzman e colaboradores (2016) os DENVs não são intrinsecamente "virulentos", mas condicionalmente virulentos.

Condição que é estabelecida, principalmente, na presença de anticorpos heterólogos anti-DENV pré-existentes e não neutralizantes.

2.5. Diagnóstico da dengue

O diagnóstico da dengue na maioria das vezes é baseado exclusivamente nos aspectos clínicos do paciente, no entanto, os sinais e sintomas muitas vezes podem ser confundidos com os de outras doenças febris o que torna o diagnóstico ainda mais difícil, especialmente diante do atual contexto epidemiológico brasileiro com a circulação dos vírus chikungunya, zika, febre amarela e sarampo, que recentemente voltou a causar surtos na região norte do país. No que diz respeito ao diagnóstico específico, destacam-se o isolamento viral, a detecção de ácido nucléico (RNA), detecção de antígenos virais e a pesquisa de anticorpos (SANTOS; ROMANO; WIGG, 2002).

2.5.1. Isolamento Viral

Para a realização do isolamento viral as amostras devem ser coletadas até o quinto dia do início dos sintomas, durante a fase aguda (MEDINA et al., 2012). O isolamento pode ser realizado com a utilização de linhagens de células originadas de mosquitos (C6/36-*Aedes albopictus*; TRA-284-*Toxorhynchites amboinenses* e AP-61- *Aedes pseudoscutellaris*), (IGARASHI, 1978), e linhagens de células originadas de vertebrados como VERO, BHK-21, LLC-MK2. Além disso, também podem ser realizadas *in vivo* em mosquitos. A confirmação do isolamento pode ser feita por imunofluorescência indireta usando anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos ou por meio de métodos moleculares (SHU; HUANG, 2004).

2.5.2. Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares baseadas na detecção do material genético viral, como RT-PCR, nested-PCR, e PCR em tempo real apresentam alta sensibilidade assumindo um importante papel na identificação rápida dos sorotipos virais (PARIDA et al., 2005). Todos esses métodos envolvem basicamente três etapas: extração do RNA, amplificação, detecção e caracterização do produto amplificado. Dentre os diferentes tipos de amostras que são utilizados, estão o sangue total, plasma e soro (TANG; OOI, 2012), alguns trabalhos também destacam o uso da saliva e urina, principalmente daqueles pacientes com dificuldade de coleta, como recém-nascidos e pacientes com síndromes hemorrágicas (POLONI et al., 2010 ; ANDRIES et al., 2016).

A amplificação do material genético viral é feita utilizando iniciadores (*primers*) específicos, transcriptase reversa e uma DNA polimerase termoestável, além de outros reagentes como os desoxinucleotídeos, Mg²⁺ e solução tampão, indispensáveis para a síntese de novas fitas de DNA. Atualmente, sabe-se que existem diversos protocolos que identificam o vírus dengue utilizando iniciadores direcionados para regiões do genoma que são compartilhadas pelos quatro sorotipos ou para regiões sorotipo-específicas (PEELING et al., 2010). Entre estes estão, os protocolos de semi-nested PCR descrito por Lanciotti e colaboradores (1992) e posteriormente modificado por Harris e colaboradores (1998) para uma RT-PCR multiplex que realiza a detecção e sorotipagem do vírus da dengue (LANCIOTTI et al., 1992 ; HARRIS et al., 1998).

Conforme as recomendações do Ministério da Saúde (MS) o período ideal para o diagnóstico molecular da dengue é até o quinto dia após início dos sintomas, período no qual se tem a presença da partícula viral no soro do paciente (BRASIL, 2016). Apesar da alta sensibilidade e especificidade, essas técnicas podem apresentar algumas desvantagens, como a necessidade de equipamentos de custo elevado e uma estrutura laboratorial bem definida, motivos pelos quais nem sempre são encontrados na rotina laboratorial.

2.5.3. Pesquisa de anticorpos

Os testes sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico da dengue por serem relativamente baratos e de fácil execução quando comparados com a cultura ou métodos moleculares (GÚZMAN et al., 2010). Entre os ensaios de detecção de anticorpos vários métodos já foram descritos, incluindo o teste de inibição da hemaglutinação (IH), teste de neutralização (TN), imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (do inglês “*Enzyme-linked immuno sorbent assay*”), fixação do complemento (FC), *Dot blotting*, *Western blotting* e teste rápido de imunocromatografia (para o qual existem vários kits comerciais disponíveis). No entanto, ELISA para captura de IgM e/ou IgG direto ou indireto e o teste de inibição da hemaglutinação (IH) são as técnicas sorológicas mais comumente utilizadas na rotina (SHAMALA, 2015).

A produção de anticorpos para DENV nas infecções primárias e secundárias geralmente são diferentes umas das outras. Na infecção primária, a IgM é normalmente detectada a partir do quinto dia da doença, enquanto que a IgG é detectada em níveis baixos geralmente a partir do sétimo dia após o início da infecção. Já na infecção secundária, os anticorpos IgG são detectados em níveis mais elevados, enquanto que os anticorpos IgM são normalmente detectados nos títulos mais baixos (Figura 4)(GÚZMAN; KOURI, 2004).

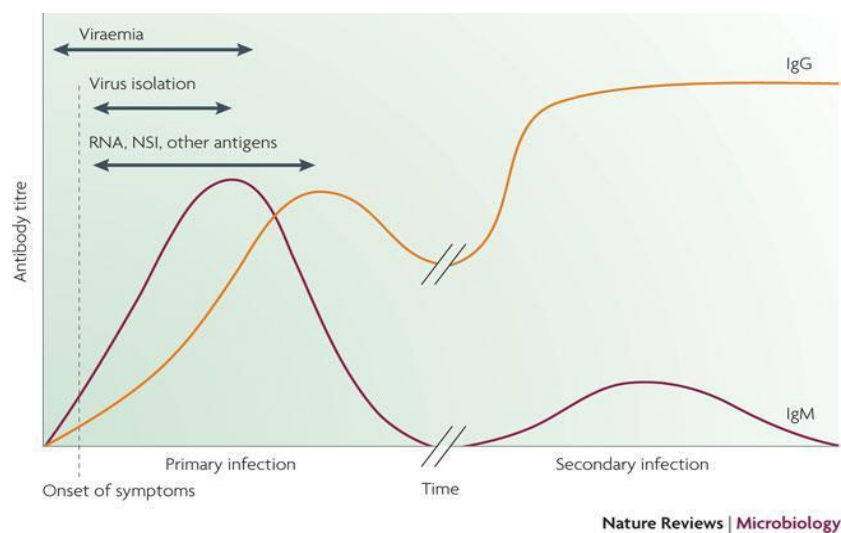


Figura 4 - Representação do período de detecção viral, proteína NS1 e de anticorpos específicos para dengue

FONTE: GÚZMAN et al., 2010.

Durante uma infecção secundária os títulos de anticorpos aumentam rapidamente e reagem amplamente contra muitos flavivírus. Por isso para distinguir as infecções em dengue primária e secundária, a análise das proporções de anticorpos IgM/IgG são agora mais comumente utilizadas do que o teste de inibição da hemaglutinação (WHO, 2009).

2.5.4. Detecção do antígeno NS1

Em 2000, Young e colaboradores descreveram pela primeira vez um ensaio Mac-Elisa para detecção da proteína NS1, tendo em vista o potencial uso dessa proteína como marcador precoce da infecção. Dois anos depois, outro ensaio de ELISA desenvolvido por Alcon e colaboradores também demonstrou que a proteína NS1 circula em altos níveis no soro de pacientes durante a fase aguda da doença e nos primeiros dias do período de convalescência. A partir destes resultados diversos trabalhos passaram a avaliar o potencial uso dessa proteína como marcador precoce da dengue (SHU; HUNG, 2004; DUSSART et al., 2006).

Entre as vantagens oferecidas pela detecção da proteína está o baixo custo, obtenção do resultado em poucos minutos, e mínima estrutura laboratorial necessária. Atualmente kits de detecção da proteína disponíveis no mercado são amplamente utilizados, no entanto, esses ainda não são capazes de diferenciar os sorotipos virais. Além disso, muitos trabalhos mostram a baixa sensibilidade desses testes quando comparados com outros métodos de detecção (LIMA et al., 2010; GÚZMAN et al., 2010; FELIX et al., 2012; ARYATI et al., 2013; ACOSTA et al., 2014).

Alguns autores acreditam que a baixa sensibilidade do teste NS1 estaria relacionada aos casos de infecções secundárias, onde anticorpos anti-DENV pré-existentes seriam responsáveis por sequestrar essas proteínas levando a formação de imunocomplexos. Por isso para melhorar a sensibilidade do diagnóstico na fase aguda, alguns estudos recomendam a combinação da detecção do antígeno NS1 e a pesquisa de anticorpos IgM e IgG específicos para dengue (FRY et al., 2011).

2.6. Características do vírus da dengue

O DENV é um vírus envelopado, esférico com aproximadamente 40-50nm de diâmetro que pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Desta família também fazem parte os vírus causadores da febre amarela (YFV–*Yellow Fever virus*), encefalite japonesa (JEV–*Japanese Encephalitis virus*) e encefalite do Nilo ocidental (WNV–*West Nile virus*) (KUNO et al., 1998). Quanto ao material genético, este apresenta RNA de fita simples com polaridade positiva, e tamanho aproximado de 10,7 kb (kilobases), envolto por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica (GLUBER, 1998) (Figura 5).

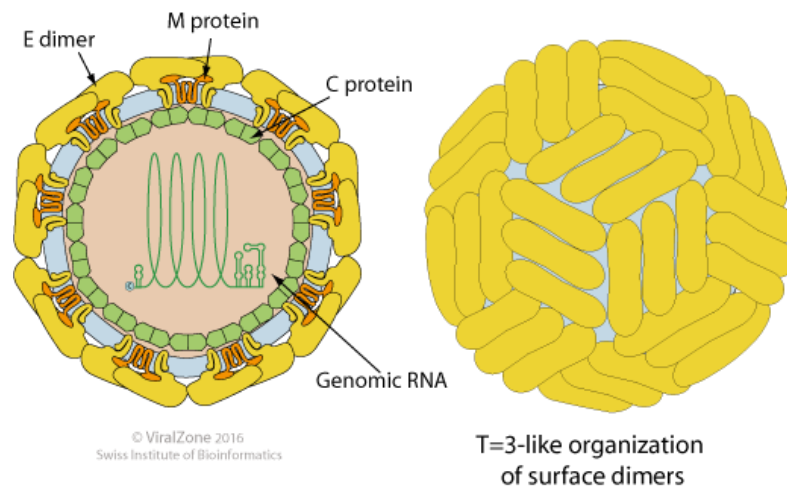


Figura 5: Partícula viral madura.

FONTE: <http://viralzone.expasy.org> (acesso em 27/03/2017).

Apresenta quatro sorotipos antígenicamente distintos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CHEN; VASILAKIS, 2011). A infecção por um dos sorotipos confere imunidade protetora contra o mesmo por toda a vida, mas confere apenas proteção parcial e transitória para infecções subsequentes para os outros três sorotipos (WHO, 2017).

O genoma do DENV apresenta uma única fase de leitura aberta – ORF (do inglês: *Open Reading Frame*) que codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais - Envelope (E), pré-Membrana (prM) e Capsídeo (C); e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 6) (GÚZMAN et al., 2010). Esta região codificante é flanqueada por duas regiões não codificantes (NC) 5' e 3', que apresentam aproximadamente 450 e 100 nucleotídeos respectivamente. Na região NC 5'

há uma estrutura Cap tipo 1 (m⁷G5'ppp5') e na NC 3' encontra-se uma estrutura “*stem-loop*” (3'SL), que é conservada em todos os flavivírus e duas estruturas “*dumb-bell*” (DB) contendo as sequências conservadas CS2 e RCS2, que atuam na circularização do genoma para a replicação do RNA viral (POLACEK; FRIEBE; HARRIS, 2009).

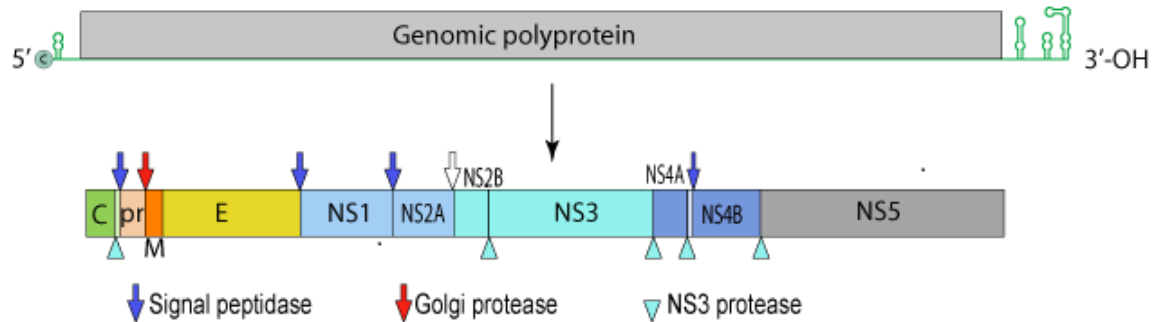


Figura 6 - Representação esquemática do genoma do DENV. As setas representam os sítios de clivagem para as diferentes proteases virais e do hospedeiro após a tradução do RNA

FONTE: adaptado, <http://viralzone.expasy.org>, (acesso em 27/03/2017).

2.6.1. Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) é uma proteína homodímerica com tamanho aproximado de 11 kDa (kilodaltons), que tem papel essencial para encapsidação do genoma. Já a proteína de membrana (PrM/M) é uma proteína maior, N-glicosilada com 27-31 kDa que é clivada no complexo trans-golgi por uma protease do tipo furina durante os estágios finais da montagem do vírus, para posterior liberação das partículas virais maduras (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

A proteína do envelope (E) tem peso molecular em torno de 53 kDa, compõe a classe II N-glicosilada sendo uma proteína dimerica que medeia à ligação do vírus com a membrana celular. Além disso, é responsável por conferir imunidade protetora ao induzir mecanismos de neutralização, antifusão e aumento no número de anticorpos. A sua estrutura tridimensional consiste de um complexo dimerico com duas subunidades idênticas, sendo subdividida em: domínio I, uma estrutura de p-barril orientada paralelamente à membrana viral; domínio II, altamente conservado entre todos os flavivírus funcionando como um peptídeo de fusão

interno; e o domínio C-terminal III, localizado na superfície lateral externa do dímero que está relacionado com a virulência de determinadas cepas virais (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

A NS1 é uma glicoproteína conservada com peso molecular em torno de 46-55 kDa que pode ser encontrada tanto na forma homodimérica associada a membrana, quanto solúvel, hexamérica em forma de barril. Na forma hexamérica é encontrada no soro de pacientes infectados em níveis variáveis e por isso é amplamente utilizada como marcador para o diagnóstico rápido da dengue (MULLER; YOUNG, 2013). As funções da proteína NS1 ainda não estão completamente elucidadas, entretanto, evidências experimentais mostram que a proteína NS1 intracelular co-localiza com RNA e outros complexos de replicação e desempenha um papel essencial como co-fator na replicação viral (MACKENZIE et al., 1996; CHUANG et al., 2013; AMORIM et al., 2014).

A proteína NS2 é clivada em duas subunidades, NS2A e NS2B. A molécula NS2A de 22 kDa está envolvida na montagem do vírus, replicação do RNA e também segundo alguns estudos atua como antagonista do interferon (IFN). NS2B com 14 kDa atua como co-fator da NS3 protease, e a junção de ambas resulta nos eventos de clivagem na maturação da poliproteína viral (MELINO; PACI, 2007; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

As proteínas NS3 e NS5 são centrais para a replicação viral, pois juntas apresentam a maior parte, senão todas, das atividades catalíticas necessárias para o capeamento e replicação do RNA viral. A NS3 apresenta o domínio N-terminal (NS3Pro) e uma porção C-terminal contendo uma RNA trifosfatase (NS3RTPase) e uma RNA helicase (NS3Hel) envolvidas na adição da estrutura Cap na extremidade 5' e síntese de RNA, respectivamente. Já a proteína NS5 contém uma metiltransferase (NS5MTase) no domínio N-terminal e uma RNA-polimerase dependente de RNA (NS5RdRp) no domínio C-terminal (BOLLATI et al., 2010; SUN; KOCHER, 2013).

As glicoproteínas NS4A e NS4B são pequenas com 16 e 27 kDa, respectivamente, são hidrofóbicas e atuam inibindo a sinalização de interferon (IFN). Evidências recentes sugerem um possível papel dessas proteínas na diferenciação de genótipos de DENV endêmicos e silvestres (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

2.7. Replicação viral

O processo de replicação viral inicia-se quando a proteína do envelope se liga ao receptor de membrana, isto irá mediar a entrada do vírus por endocitose. Após a internalização e acidificação do endossoma, ocorre a fusão das membranas virais e vesiculares permitindo assim a liberação do RNA genômico no citoplasma que servirá prontamente como RNA mensageiro. Com a tradução do RNA no retículo endoplasmático rugoso (RER) uma poliproteína é sintetizada e posteriormente clivada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais (C, PrM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1-NS5). Após a tradução do RNA, ocorre a hipertrofia das membranas intracelulares, dando origem a estruturas conhecidas como membranas enroladas e pacotes de vesículas. A síntese de RNA dos flavivírus acontece dentro dos pacotes de vesículas nos chamados complexos de replicação, em associação com as membranas celulares. O RNA de polaridade negativa que serve como molde para a amplificação de RNA genômico tem o processo de síntese iniciado a partir da ação da proteína NS5 viral que atua como RNA polimerase dependente de RNA em associação com a helicase NS3 e outras proteínas não estruturais, assim como fatores do hospedeiro. Através de um mecanismo ainda desconhecido o RNA recém-sintetizado associa-se a proteína do capsídeo (C) e o complexo formado brota pelo lúmen do retículo endoplasmático rugoso adquirindo a bicamada lipídica e as proteínas E e prM do vírus. E com a proteólise mediada por furina de prM na rede trans-Golgi é desencadeado o rearranjo, homodimerização do envelope e formação de novas partículas virais (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011) (Figura 7).

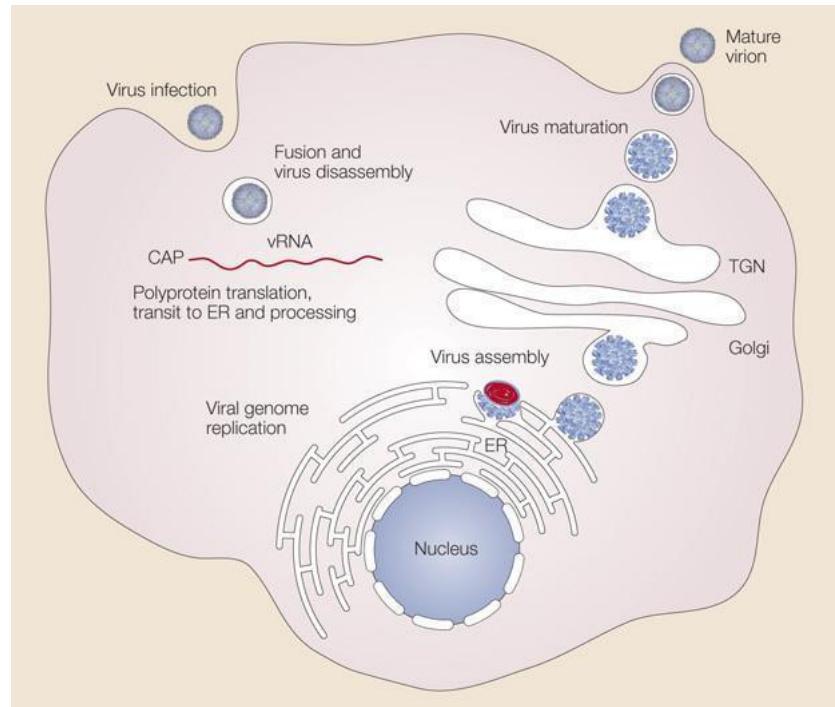


Figura 7 - Imagem ilustrativa dos mecanismos de replicação do vírus dengue. Após a liberação do RNA viral no citoplasma, iniciam-se as etapas de replicação do RNA viral, montagem no retículo endoplasmático (ER), transporte das partículas virais e subvirais através do complexo trans-Golgi (TGN) e clivagem das partículas imaturas por proteases do hospedeiro com posterior liberação por exocitose

FONTE: MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005.

2.8. Origem e evolução do DENV

Muitos aspectos sobre a origem e a evolução do DENV não estão completamente elucidados. Análises filogenéticas indicam que os sorotipos do DENV que circulam hoje em centros urbanos e periurbanos evoluíram de progenitores silvestres, de forma independente, através de uma série de eventos de divergência que ocorreram com o surgimento das grandes populações urbanas. E que estes teriam sido facilitados pela troca de vetores, de mosquitos *Aedes arboréus* para *Ae. Albopictus* (peridomiciliares) e *Ae. Aegypti aegypti* (domiciliares), e dos hospedeiros reservatórios, de primatas não humanos para humanos (CHEN; VASILAKIS, 2009).

No que diz respeito à origem geográfica do DENV, ainda existem dúvidas em relação a Ásia ou África. Gaunt et al., (2001) defende uma origem africana uma vez que muitos arbovírus que são transmitidos por mosquitos mais divergentes circulam apenas na África, além disso acredita-se que o *Ae. aegypti* tenha origem africana apesar dessa espécie ter se tornado vetor na transmissão em humanos somente em um passado mais recente. Entretanto, o registro dos quatro sorotipos virais em humanos e macacos na Ásia e a posição filogenética profunda das linhagens silvestres asiáticas sugere que o vírus tenha origem asiática e não africana (HOLMES; TWIDDY, 2003). O que reforça ainda mais uma possível origem asiática é a alta prevalência da dengue silvestre no sudeste asiático quando comparado com a África. Além disso, trabalhos com colônias de mosquitos em laboratório demonstraram que o mosquito tigre asiático, *A. albopictus*, é consideravelmente mais suscetível à infecção pelo DENV do que *A. aegypti* (ROSEN et al., 1985). Supondo-se que *A. albopictus* teria sido o vetor original do DENV humano e que o vírus posteriormente explorou o *A. aegypti* para facilitar a transmissão em humanos (VASILAKIS et al., 2011).

Uma característica do DENV por ser um vírus de genoma RNA, é a diversidade genética, atribuída principalmente a ausência da atividade de correção da enzima RNA-polimerase dependente de RNA que leva ao surgimento de altas taxas de mutação. De acordo com alguns estudos que estimaram as taxas de substituição baseadas no gene E, as taxas variam entre 4,6 e $11,6 \times 10^{-4}$ substituições/local/ano, para diferentes sorotipos, genótipos e ciclos de transmissão (ZANOTTO et al., 1996; WANG et al., 2000; TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; DRUMMOND et al., 2006; VASILAKIS et al., 2007; KUMAR et al., 2010; RAMIREZ et al., 2010).

Com o aperfeiçoamento dos métodos de sequenciamento e análise do genoma viral, é possível caracterizar cepas de DENV de forma mais eficiente e precisa. Esses avanços permitiram que Rico-Hesse, delineasse as relações evolutivas de DENV-1 e 2, e a partir destes dados introduzisse o termo “Genótipo”, que se refere ao agrupamento de vírus DENV que apresentam divergência na sequência nucleotídica em uma dada região genômica de até 6% (RICO-HESSE, 1990; CHEN; VASILAKIS, 2009).

De acordo com a revisão realizada por Chen & Vasilakis (2009), o DENV-1 dispõe de cinco genótipos: (a) genótipo I, com cepas de todo o Sudeste Asiático, China e Oriente Médio (Arábia Saudita); b) genótipo II, representado por cepas coletadas na Tailândia durante as

décadas de 1950 e 1960; c) genótipo III, que inclui dois isolados silvestres coletados na Malásia; d) Genótipo IV, representando cepas de países do extremo Pacífico (Japão, Coreia, China, Mianmar, Malásia e Indonésia), ilhas do Pacífico Ocidental (por exemplo, Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí) e Austrália; e) genótipo V, que representa a maioria das cepas de DENV-1 coletadas nas Américas, na África Ocidental e na Ásia.

Já o DENV-2 apresenta seis genótipos: a) genótipo asiático I, representado por cepas da Tailândia, Malásia, Camboja, Mianmar, Vietnã e Austrália; (b) genótipo asiático II, com cepas da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México; c) genótipo asiático/americano, que abrange todas as linhagens coletadas no Sudeste Asiático e cepas coletadas na América Central e do Sul e no Caribe nos últimos 30 anos; d) genótipo cosmopolita, representados por cepas distribuídas numa vasta área geográfica, incluindo a África Oriental e Ocidental, o Médio Oriente, o subcontinente indiano, as ilhas do Oceano Índico e Pacífico e a Austrália; (e) genótipo americano, com cepas da América Central e do Sul, Caribe e cepas mais antigas coletadas no subcontinente indiano e nas ilhas do Pacífico; e por fim, (f) o genótipo silvestre, representado por cepas de humanos, mosquitos arborícolas residentes na copa e primatas não humanos coletados na África Ocidental e no Sudeste da Ásia.

Para o DENV-3 foram descritos cinco genótipos: (a) genótipo I, que inclui cepas das áreas marítimas do Sudeste Asiático, principalmente Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas e Taiwan, e as ilhas de o Pacífico Sul (por exemplo, Fiji e Tahiti); (b) genótipo II, representando quase todas as linhagens de várias epidemias ocorridas na Tailândia de 1962 até recentemente, uma única cepa de Cingapura coletada em 1995, um isolado da Indonésia, da amostra de 1998, Taiwan, Vietnã, Bangladesh, Camboja, China, Japão e Myanmar; c) genótipo III, com cepas do Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Singapura, Samoa, África Oriental, América Central e do Sul, Caraíbas e de algumas importadas para a Europa; (d) genótipo IV, com cepas de Porto Rico do início da década de 1960 até o final da década de 1970 e no Taiti; E (e) genótipo V, representado por um protótipo da cepa DENV-3 (H87-1956), e cepas da China de 1987 e 2009 e do Brasil coletadas no início dos anos 2000.

Por fim, o DENV-4 que apresenta quatro genótipos: (a) genótipo I, com cepas das Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia e alguns casos importados no Japão, China e Brasil; (b) genótipo II, representado por cepas de todo o Sudeste Asiático

(Indonésia, Malásia, Cingapura), China, ilhas do Oceano Pacífico Ocidental, Austrália, Caribe e Américas; c) o genótipo III, que inclui cinco cepas tailandesas isoladas entre 1997 e 2001. E o (d) genótipo IV, com as três únicas cepas silvestres conhecidas de DENV-4 isoladas de macacos sentinelas na Malásia durante a década de 1970.

3. OBJETIVOS

Geral

Estudar a evolução do sorotipo do vírus dengue predominante no Amazonas no período de 2011 a 2016, com foco na dispersão do vírus no estado e na falha diagnóstica

Específicos

- Caracterizar os sorotipos e genótipos do vírus dengue circulantes no Amazonas entre 2011 e 2016;
- Identificar mutações na região genômica que codifica para a proteína do envelope que possam ter ocorrido durante a fixação de uma linhagem viral no período de 2011- 2016;
- Inferir as possíveis rotas de dispersão dos genótipos do dengue durante o processo de interiorização da doença no estado do Amazonas;
- Identificar mutações na região genômica que codifica para a proteína NS1 que possam resultar em diagnóstico falso-negativo;
- Estimar a frequência de infecções secundárias;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações éticas

Este estudo faz parte do projeto intitulado: “Epidemiologia Molecular da Dengue e outras arboviroses no Amazonas”, que foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual do Amazonas (número de acesso CAAE: 52379715.2.0000.5016).

4.2. Amostras utilizadas no estudo

Um total de 608 amostras, disponibilizadas pelo Laboratório Central do Amazonas (LACEN-AM) e pela pesquisadora Dra. Regina Figueiredo, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho, todas coletadas no período de 2011 a 2016 com até cinco dias de início dos sintomas, e provenientes de 26 municípios do estado do Amazonas (Figura 8).

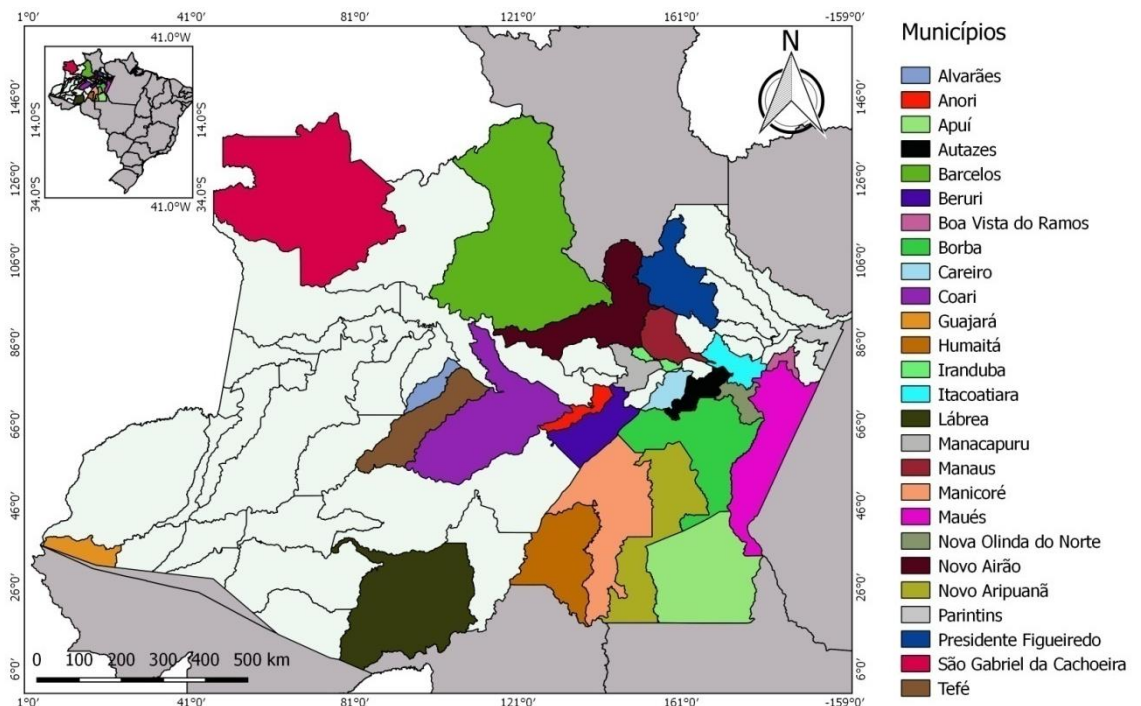


Figura 8 - Mapa com a localização dos municípios do Amazonas incluídos no estudo. Mapa criado com a ajuda do programa QGIS

FONTE: (https://www.qgis.org/pt_BR), autor: Jordam William.

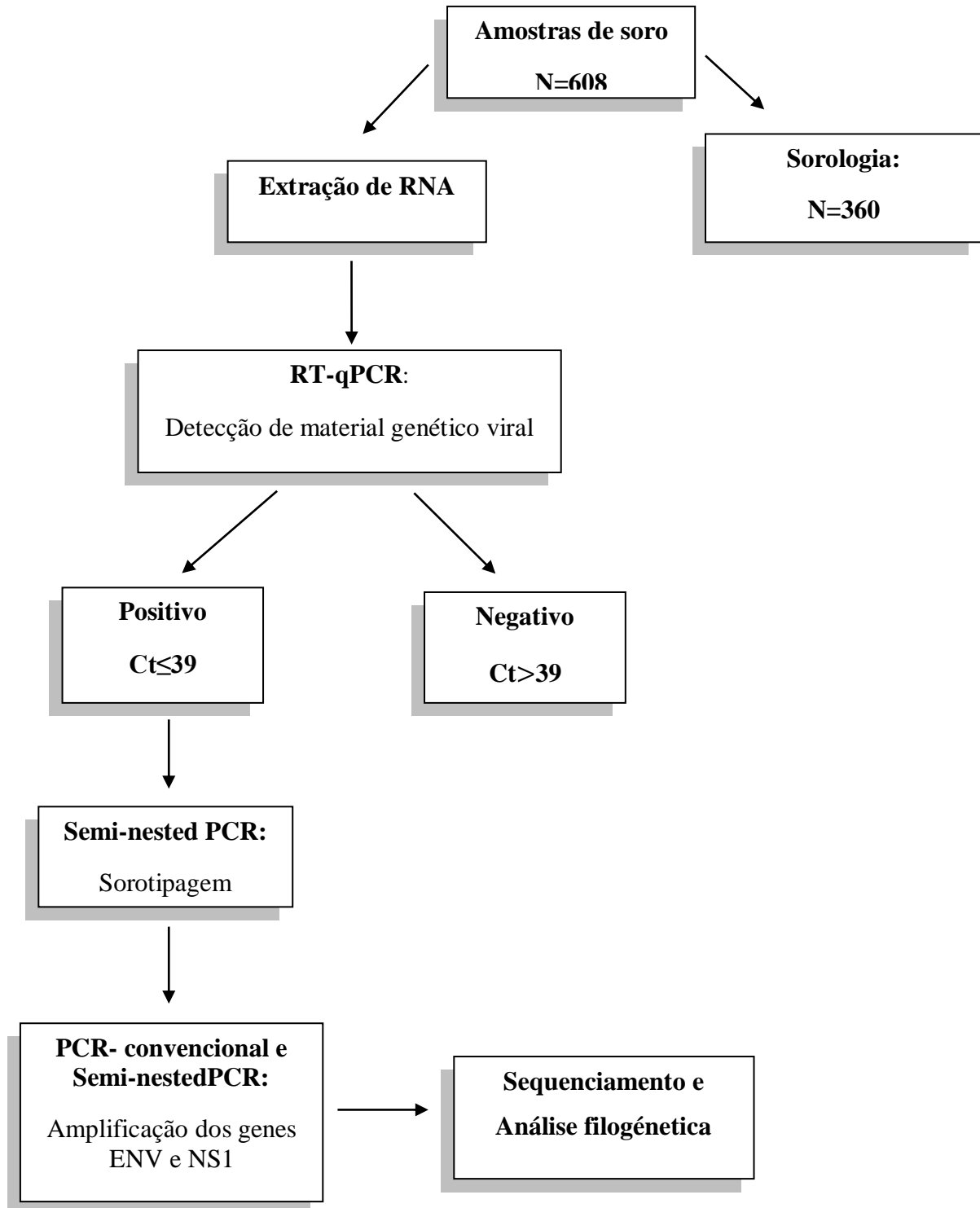


Figura 9 - Fluxograma com as etapas do processamento das amostras

4.3. Extração de Ácido Ribonucléico (RNA viral)

As amostras de soro ou plasma foram submetidas à extração de RNA utilizando o *QIAamp viral RNA mini kit* (QIAGEN. Cat. 52906) de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. No início da extração era adicionado um controle positivo interno, o MS2, um bacteriófago que é utilizado em uma titulação previamente conhecida e que permite monitorar todas as etapas de processamento das amostras. Ao final da extração o RNA era eluído em 60µL de tampão AVE e armazenado em freezer -80°C até posterior uso.

4.4. PCR em tempo real com Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os RNAs extraídos foram testados pelo método de RT-qPCR, com o intuito de identificar as amostras que continham material genético viral, uma vez que esta técnica apresenta alta sensibilidade e possibilita o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. Os iniciadores e a sonda utilizados neste estudo foram previamente descritos (GURUKUMAR et al., 2009), porém com degenerações, tendo como alvo a região 3'UTR do genoma do DENV. Além disso, foram utilizados também os iniciadores e a sonda para detecção do MS2 (NAVECA et al., 2017) que foi utilizado durante a extração das amostras (Tabela1).

Óligo	Alvo	Sequência (5'-3')
Iniciador senso	DENV	GARAGACCAGAGATCCTGCTGTCT
Iniciador anti-senso	DENV	ACCATTCCATTTTCTGGCGTT
Sonda-MGB	DENV	(FAM) ARCATCAWTCCAGGCAC
Iniciador senso	MS2	GCGCAGAATCGCAAATACA
Iniciador anti-senso	MS2	CAACAGTCTGGGTTGCCACTT
Sonda-MGB	MS2	(NED) ATCAAAGTCGAGGTGCC

Tabela 1- Iniciadores e sondas utilizados no RT-qPCR para detecção de DENV e MS2

Nas reações com volume final de 10µL foram utilizados 0,6µL de cada primer mix (5µM) contendo os iniciadores senso e anti-senso, 0,1µL de cada sonda (10µM), 2,5µL do mastermix de PCR *TaqMan® FastVirus 1-Step* (Applied Biosystems), 3,6µL de água livre de nuclease e 2,5µL do RNA extraído da amostra. Posteriormente a reação era conduzida utilizando o equipamento de PCR em Tempo-Real *StepOnePlus™* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C/5 min, 95°C/20 segundos, seguido por 45 ciclos de 95°C/3 segundos e 60°C/30 segundos. As amostras com valor de *cycle threshold* (Ct) \leq 39,0 foram consideradas positivas e posteriormente submetidas ao método de semi-nested PCR (LANCIOTTI et al., 1992) para a identificação do sorotipo viral.

4.5. Produção de Ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA)

A partir do RNA extraído a síntese do cDNA foi realizada utilizando a enzima *Superscript IV®* em uma reação com volume final de 20µL, sendo adicionados 4µL de solução tampão (5X) , 1µL de inibidor de RNase (40U/µL), 1µL de DTT (0,1M) , 1µL de dNTPs (10mM), 4µL de água livre de nucleases e 1µL da enzima *Superscript IV®* (200U/µL) (Invitrogen, ref: 18090-1050).

As reações foram realizadas com iniciadores randômicos e/ou específicos onde 1µL do iniciador randômico (50ng/µL) ou 2µL do iniciador específico D4AS1 (5'-AGAACCTGTTGGATCAACAAC-3') (10µM) era adicionado juntamente com 7µL de RNA em um microtubo de 0,2mL e em seguida levado ao termociclador (Proflex PCR Systems, Applied Biosystems) por 5 minutos a temperatura de 65°C para promover o desenovelamento do RNA e permitir a ligação dos iniciadores. Após esse tempo o microtubo era colocado em banho de gelo por dois minutos e em seguida era adicionado o mix de reação que seguia para incubação no termociclador utilizando o seguinte programa quando utilizados iniciadores randômicos: 25°C/10 min; 37°C/15 min; 45°C/15 min; 50°C/15 min; 55°C/15 min; 60°C/15 min e 85°C/2 min ou 50°C/30 min; 55°C/30 min e 70°C/15 minutos para reação com iniciadores específicos.

4.6. Reação de semi-nested PCR (sorotipagem)

Para identificação dos sorotipos do dengue foram realizadas reações de semi-nested PCR, seguindo o protocolo desenvolvido por Lanciotti et al. (1992) e utilizando como amostras os cDNAs randômicos previamente sintetizados. Em síntese, este protocolo tem duas etapas, uma primeira PCR realizada com iniciadores universais do vírus dengue, desenhados com base nas regiões dos genes C e prM, flanqueados por uma sequência conservada entre todos os sorotipos do DENV e uma reação de semi-nested PCR utilizando como amostra o produto da primeira reação e iniciadores específicos para cada sorotipo do vírus. A sequência nucleotídica dos iniciadores e posição no genoma são mostrados na tabela 2. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *GelRedTM* (Biotium, cat. 41003), com tempo de corrida de 1 hora a 80V. E para confirmação do tamanho dos fragmentos gerados (Tabela 3) foi utilizado o padrão de tamanho molecular *LowRanger* 100 pb (Norgen. cat.11500).

Iniciador	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Posição no genoma
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421
TS4	TGTTGTCTTAAACAAGAGAGGTC	506-527

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação de semi-nested PCR para sorotipagem do DENV

FONTE: LANCIOTTI et al., 1992.

Etapa	Iniciadores	Tamanho do amplicon (pb)	Sorotipo
1ª PCR	D1+D2	511	Todos
2ª PCR	D1+TS1	482	DENV-1
2ª PCR	D1+TS2	119	DENV-2
2ª PCR	D1+TS3	290	DENV-3
2ª PCR	D1+TS4	392	DENV-4

Tabela 3 - Pares de iniciadores utilizados nas duas etapas e tamanho dos *amplicons* gerados

4.7. PCR - convencional para as regiões do envelope e NS1

Após a identificação dos sorotipos virais foram realizadas as reações de PCR para as regiões que codificam para o envelope e proteína NS1 tomando como base os iniciadores utilizados em um estudo anterior (NAVECA et al., 2012).

Para o DENV-4 (sorotipo predominante durante o período do estudo) foram avaliadas neste estudo diferentes combinações de iniciadores, e foram selecionados quatro pares, responsáveis por gerar *amplicons* de tamanhos distintos, e que juntos cobrem as regiões ENV e NS1. Os iniciadores utilizados, temperatura de hibridização, posição no genoma e o tamanho dos *amplicons* gerados são mostrados na tabela abaixo (Tabela 4).

<i>Amplicon</i>	Iniciadores	Temperatura	Tamanho	Posição no genoma
<i>Amplicon 1</i>	S1+AS21	62°C	1889 pb	1 - 1889
<i>Amplicon 2</i>	S3+AS16	62°C	3038 pb	982 - 4019
<i>Amplicon 2B</i>	D4 005_1374 + D4 005_3526	55°C	2152pb	1374 - 3526
<i>Amplicon 3</i>	S7+AS14	62°C	1704 pb	3040 - 4743

Tabela 4 - Iniciadores usados na PCR-convencional para amplificação das regiões ENV e NS1

O mix da reação de PCR era preparado com volume final de 50µL contendo 5µL da solução tampão (10X), 1,5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 3µL do primer mix (5µM), 30,3µL de água livre de nucleases e 0,2µL da enzima *Platinum TaqDNA Polymerase* (Invitrogen, cat.10966030). Posteriormente era adicionado 2µL de cDNA no microtubo contendo o mix de reação, seguindo para incubação no termociclador utilizando o seguinte programa: 94°C/2min; 94°C/30s, 55 ou 62°C/30s, 72°C/2-3 min (40X); 72°C/5 min.

As amostras que não amplificaram com os iniciadores descritos a cima foram submetidas a outro protocolo de PCR convencional utilizando uma enzima de alta fidelidade e o par de iniciadores S1 (5'-AGTTGTTAGTCTGTGTGGACC-3') e AS14 (5'-TCCTGACGTCAGCCCAAGATG-3') (NAVECA et al., 2012) que geram um único fragmento de aproximadamente 4743pb, que corresponde a região do ENV e NS1. O mix desta reação apresentava o volume final de 50µL contendo 5µL da solução tampão I (10X), 3µL do primer mix (5µM), 40,8µL de água livre de nucleases e 0,2µL da enzima *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, High Fidelity* (5U/µL)(Invitrogen, cat.12346-086). Posteriormente era adicionado 2µL do cDNA produzido com o primer específico D4AS1 e em seguida os microtubos eram levados ao termociclador sob as seguintes condições: 94°C/2min; 94°C/30s, 65°C/30s, 68°C/5min (15X); 94°C/30s, 60°C/30s, 68°C/5min (30X); 68°C/7min. Ao final desta etapa, os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com *GelRed* (Biotium, cat.41003) por um período de 1 hora e 30 min a 80V. A confirmação do tamanho dos *amplicons* gerados era realizada através da utilização do padrão de tamanho molecular *Fast Ruler Middle Ranger* (ThermoFisher, cat.# SM1113).

Para os sorotipos 1, 2 e 3 realizamos a padronização de um protocolo de semi-nested PCR, no qual foram utilizados iniciadores que se ligam a região genômica que codifica para o envelope. Inicialmente foram testadas diferentes temperaturas de hibridização (50°C, 55°C, 60°C e 63°C) e concentração dos iniciadores (0,5µM e 1,0µM). Para a otimização das reações foram utilizados os cDNAs de DENV-1, 2 e 3 que foram isolados em cultura de células C6/36 e posteriormente confirmados pelo protocolo de Lanciotti et al. (1992).

As reações eram conduzidas em duas etapas distintas, utilizando iniciadores específicos para cada sorotipo. Na primeira etapa o mix com volume final de 25µL era composto por 2,5µL de tampão (10X), 0,75µL de MgSO₄ (50mM), 0,5µL de dNTPs (10mM), 2,5-5µL do primer mix (5µM) (Tabela 5), 0,10µL da enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (5U/µL) (Invitrogen, cat:10966030) e água livre de nucleases para completar o volume.

Posteriormente era adicionado 1µL de cDNA produzido com primer randômico e o microtubo era levado ao termociclador sob as seguintes condições: 94°C/2min; 94°C/30s, (50C°, 55C°, 60C° e 63°C) /30s, 72°C/2 min (35X); 72°C/5 min.

Par de iniciadores usados na 1ª etapa	Sorotipo	Tamanho	Posição no genoma
D1E_FNS + D1E_FNAS	DENV-1	1723pb	812 - 2535
D2E_FNS + D2E_FNAS	DENV-2	1799pb	740-2539

Tabela 5 - Iniciadores usados na 1ª PCR para amplificação da região do ENV dos sorotipos 1 e 2 do DENV

Na segunda etapa eram preparados dois mixes de reação (A e B) contendo os mesmos reagentes utilizados na primeira etapa, com exceção dos pares de iniciadores, onde em cada um dos mixes era utilizada uma combinação de iniciadores distintos mostrados na tabela 6. Na sequência era adicionado 0,1µL do produto gerado na primeira PCR e em seguida os microtubos eram levados ao termociclador a 94°C/2min; 94°C/30s, (50C°, 55C°, 60C° e 63C°) /30s, 72°C/2 min (25X); 72°C/5 min. Os produtos gerados foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com *GelRed*TM (Biotium, cat. 41003) por 1 hora a 80V, e para a confirmação dos resultados foi utilizado o padrão de tamanho molecular *Fast Ruler Middle Ranger* (ThermoFisher, cat.#SM1113).

Par de iniciadores usados na 2ª PCR	Mix	Sorotipo	Tamanho do amplicon
D1E_FNS+ D1E_FNASB	A	DENV-1	1279pb
D1E_FNSB+ D1E_FNAS	B	DENV-1	1166pb
D2E_FNS+ D2E_FNASB	A	DENV-2	865pb
D2E_FNSB+ D2E_FNAS	B	DENV-2	1310pb

Tabela 6 - Iniciadores usados na semi-nested PCR para amplificação da região do ENV dos sorotipos 1 e 2 do DENV

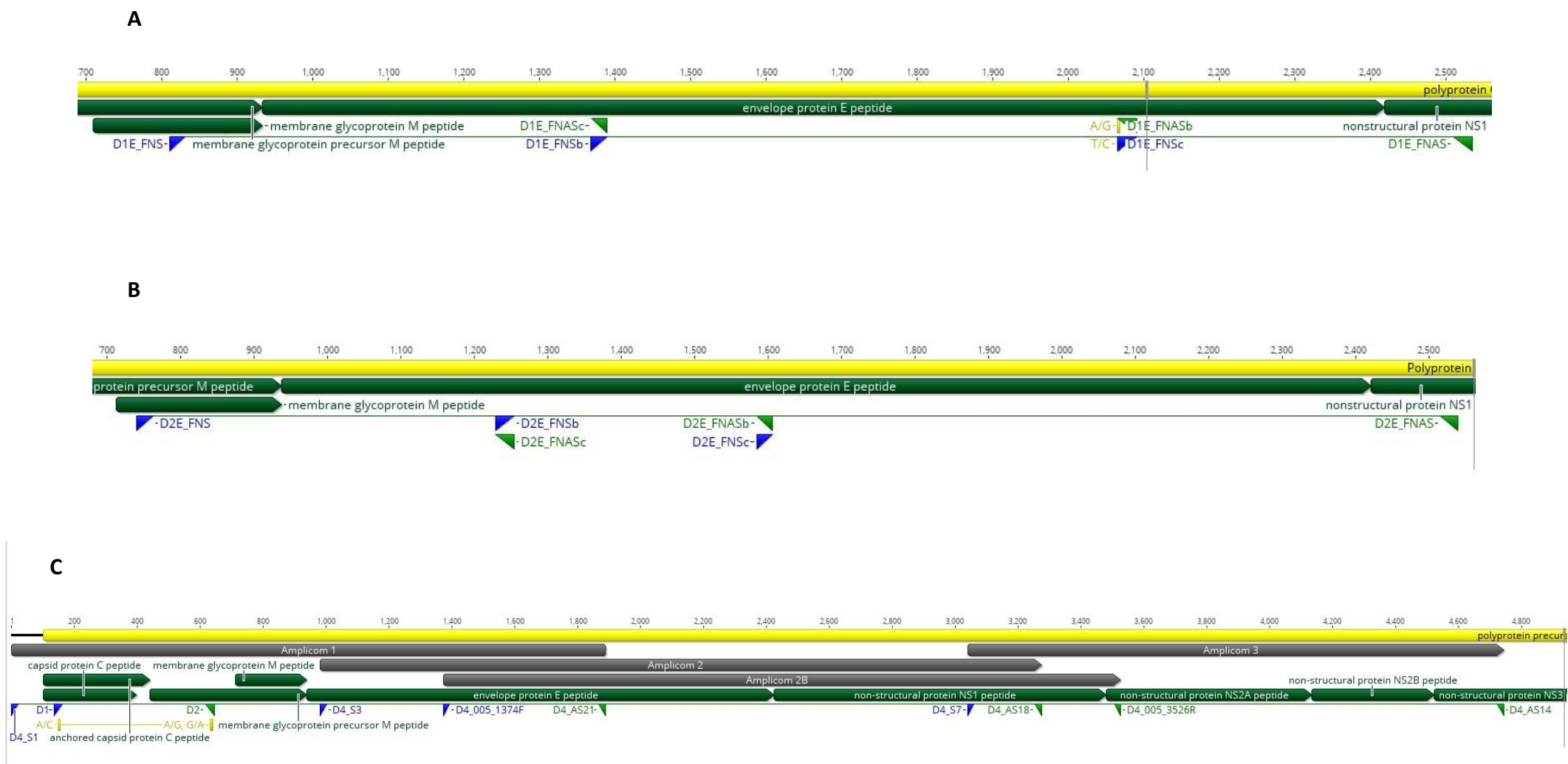


Figura 10 - Esquema das reações de PCR para amplificação dos amplicons de DENV-1 (A), DENV-2 (B) e DENV-4 (C). A figura mostra os pares de iniciadores utilizados e a região genômica amplificada por cada par tendo como base as sequências de referência depositadas no GenBank. Figura produzida com auxílio do software Geneious v10.2.2.

4.8. Precipitação dos produtos de PCR com Polietilenoglicol

Com o intuito de remover óligos e nucleotídeos não incorporados na PCR e que poderiam interferir na reação de sequenciamento, os produtos de PCR foram submetidos ao método de precipitação por Polietilenoglicol (PEG) descrito por Humphreys e colaboradores (1975) e adaptado pelo nosso grupo de pesquisa.

Inicialmente o produto de PCR era transferido para um microtubo de 1,5 mL, e em seguida adicionava-se o PEG (20%) em uma proporção 1:1. O microtubo era então agitado em vórtex por 5 segundos e depois era incubado a 37°C por 15 minutos. Posteriormente seguia para centrifugação a 2500g por 15 minutos a temperatura ambiente e ao fim desta etapa descartava-se o sobrenadante por inversão. Na etapa seguinte era adicionado 125µL de etanol (80%) gelado e centrifugava-se a 1450g por 3 minutos. Novamente o sobrenadante era descartado por inversão e posteriormente o microtubo aberto era levado ao equipamento Speed-Vac a 37°C por 10 a 15 minutos para a remoção de resíduos de etanol. Uma vez certificada à ausência de etanol, era adicionado um volume de água igual ao do produto de PCR submetido à purificação. Após a etapa de purificação o produto era quantificado por espectrofotômetro de microvolume utilizando o equipamento Biodrop Duo (Biochrom).

4.9. Sequenciamento dos genes que codificam para as proteínas de Envelope e NS1

As amostras purificadas foram então submetidas ao sequenciamento capilar tomando como base o método de dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977) e utilizando os iniciadores mostrados nas tabelas 7 e 8. As reações de sequenciamento foram conduzidas em placa utilizando um mix de reação com volume final de 10µL que continha 2µL de solução tampão (5X), 1µL do iniciador (3,2µM), 0,3µL de *BigDye* (2,5X), volume de amostra de acordo com a concentração ideal para o tamanho de cada fragmento e água livre de nucleases para completar o volume. Em seguida a placa era levada ao termociclador sob as seguintes condições: 96°C/1min; 96°C/10s, 55°C/15s, 60°C/2min (20X); 96°C/2min, 55°C/15s, 60°C/3' min (10X); 4°C/∞.

Iniciador	Sentido	Sequência 5' – 3'	Posição
D4S1	S	AGTTGTTAGTCTGTGTGGACC	1-21
D4S2	S	GCTTGATTCCYACYGTAATGG	418-438
D4 PTNES	S	CACATTCAGGAATGGGATTGG	730-750
D4S3	S	TCTCAGGTGGAGCATGGGTCG	982-1002
D4S4	S	GACTTYAATGAGATGATTCTG	1512-1532
D4AS21	AS	ATGCTGTGTTTCTGCCATCTC	1869-1889
D4AS22	AS	TGRTTGGATGTGTCATTCCTAC	1389-1411
D4AS23	AS	CCCTGGGCCATGGTTGTGAC	1029-1048
D4AS24	AS	ATCAATGTCTTCRGGTTCGGT	615-635
D4AS25	AS	TCTYTTCAGAATCCCTGCTGT	282-302
D4S5	S	AGYGCATTAACACTCCATTGG	2091-2111
D4S6	S	ACAACGTGCACACTTGGACAG	2491-2511
D4S7	S	AAAACCAGACCTGGCAGATAG	3040-3060
D4AS18	AS	TGTTGTTCCGGGGCATTCTCC	3255-3275
D4AS19	AS	TCTTCGTTTCATTGGGGCATT	2848-2867
D4AS20	AS	TGATTCCTCCAACAGCTATGC	2374-2394
D4S8	S	AAGAGAACATGGTCAAATCAC	3448-3468
D4S9	S	TGACAACACYCAAGTGGGAAC	3896-3916
D4S10	S	GATGGCTCTTTCTCCATACGG	4374-4394
D4AS14	AS	TCCTGACGTCAGCCCAAGATG	4723-4743
D4AS15	AS	TGCCATTYCATCCCCTGCAC	4308-4328
D4AS16	AS	GCACAAAGGAATGAGTGTGACC	3998-4019
D4AS1	AS	AGAACCTGTTGGATCAACAAC	10629-10649
D4 005_1374	S	GGAGACACCCATGCAGTAGG	1374 -1393
D4 005_3526	AS	GTCAGGCACAACAGACCCAT	3526 - 3507

Tabela 7 - Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento de DENV-4. A tabela contém a sequência e a posição no genoma dos iniciadores usados no sequenciamento dos *amplicons* 1, 2, 2B e 3 de DENV-4. S=senso, AS= anti-senso

Iniciador	Sentido	Sequência 5' – 3'	Posição
D1E_FNS	S	TGGGCYYTGVGACACCCAGG	812 - 831
D1E_FNS B	S	HGGAGAYCAGCAYCARGTKGG	1369 - 1389
D1E_FNAS	AS	GGRGARTCRGCTGRAATTTTRTATTG	2535-2510
D1E_FNAS B	AS	GYTTTTTCRCCYGCYCCTAYYVCGA	2091-2067
D2E_FNS	S	TGGGRYTRGARACRCGRACYGA	740 - 761
D2E_FNSB	S	AYAGAGGNTGGGGDAAYGGATGYGG	1585 - 1605
D2E_FNAS	AS	AAGGGGATTCTGGYTGRAAYTTRT	2539-2516
D2E_FNASB	AS	TCCRGGNARCCAYGGYAAHGG	1605-1585

Tabela 8 - Iniciadores usados nas reações de sequenciamento de DENV-1 e DENV-2. A tabela contém a sequência e a posição no genoma dos iniciadores usados no sequenciamento de DENV-1 e DENV-2. S= senso, AS= anti-senso

Após a reação de sequenciamento os produtos gerados foram purificados utilizando o protocolo EtOH/EDTA/Acetato de sódio, disponível na bula do *Bigdye* v3.1 (Applied Biosystem). Em resumo, após a retirada da placa do termociclador ou congelador a mesma era centrifugada a 2000g por 1 min. Posteriormente adicionava-se 5µL da solução de EDTA 125mM + acetato de sódio a 3M (pH 5,2), certificando-se de que esta solução foi colocada no fundo dos poços. Em seguida era adicionado 25µL de EtOH 100% e a placa foi selada e invertida por 4 vezes. A placa foi então incubada por 15 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e em seguida centrifugada a 2000g por 45 min. O sobrenadante era desprezado e a placa invertida, submetendo a mesma a um ciclo de 180g por 1 min. Posteriormente, foi adicionado 35µL de EtOH a 70% em cada poço da placa, seguido de centrifugação a 1.650g por 15 min a 4 °C. O líquido da placa era descartado e a placa novamente invertida e submetida à centrifugação por 1 min. Em seguida a placa era incubada à 60°C por 15 min no termociclador. No momento do sequenciamento as amostras eram ressuspensas em 10µL de formamida Hi-Di e depois levadas ao agitador de placa seguido de centrifugação rápida. Em seguida a placa era aquecida 95°C por 1 minuto, montada e colocada no sequenciador ABI 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) instalado na plataforma de sequenciamento do ILMD.

4.10. Análise das sequências e filogenia

Os dados obtidos no sequenciamento capilar foram analisados utilizando o software Geneious versão 10.2.2, para a montagem do *contig* de cada amostra, sendo editado manualmente após alinhamento com a sequência de referência depositada no banco de dados do NCBI (*Genbank*).

Para o estabelecimento de relações filogenéticas entre os DENV encontrados neste estudo e os DENV isolados em outras localidades montamos bancos de sequências nucleotídicas do gene do envelope (1485pb) de DENV-1, DENV-2 e DENV-4 de outros estados e países, contendo as informações sobre o local de origem, ano de isolamento e o número de acesso no *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Posteriormente essas sequências foram alinhadas utilizando a ferramenta MAFFT.

Para identificação dos genótipos de DENV-1 e DENV-2 utilizamos a ferramenta: *Dengue Virus Typing Tool* (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool>). E para encontrar o melhor modelo evolutivo a ser seguido, utilizamos o programa jModelTest versão 2.1.7. As árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa PhyML, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML), baseado nos modelos GTR+I+G (GTR-General Time Reversible; I=sítios invariáveis e G=distribuição gama), GTR+G e Tamura Nei + G.

Para identificar possíveis eventos de seleção episódica utilizamos o programa *Mixed Effects Model of Evolution* (MEME), e para recombinação genética usamos a ferramenta *Genetic Algorithm for Recombination Detection* (GARD), ambas disponíveis no servidor online (<http://www.datamonkey.org/meme>).

4.11. Análise filogeográfica

Para a análise filogeográfica montamos um banco de dados contendo 115 sequências de envelope de DENV-4, genótipo II, que incluíam as sequências de ENV obtidas neste estudo e as sequências representativas de todos os estados brasileiros e também de diferentes

países das Américas, coletadas entre 1982 e 2016. Juntamente com estes dados foram adicionadas também sequências representativas dos outros três genótipos do DENV-4, para que posteriormente fosse avaliada a presença de possíveis eventos de recombinação com a ferramenta GARD.

Antes de prosseguir com as outras análises, com o auxílio do software TempEst v1.5.1 investigamos a estrutura temporal das sequências através das funções “*Best-fitting root*” e “*Heuristic residual mean squared*”. Posteriormente esse mesmo banco de dados foi utilizado para análise filogeográfica no programa BEAST v1.8.4 (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) e ferramentas auxiliares BEAUti v1.8.4 (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*), TreeAnnotator v1.8.4, Tracer v1.6.0 e FigTree v1.4.3, todos disponíveis gratuitamente na página <http://beast.community/index.html>.

As etapas de análise foram baseadas no tutorial “*Phylogeographic Diffusion in Continuous Space*” (http://beast.community/workshop_continuous_diffusion) utilizando o dataset de sequências do DENV-4, as datas de coleta de cada amostra e um arquivo de coordenadas geográficas (*traits*). Os principais parâmetros de análise utilizados estão resumidos na figura 11.

The image shows four panels of the BEAUti software interface, detailing the configuration for a phylogenetic analysis. The settings are as follows:

- Substitution Model:** HKY
- Base frequencies:** Estimated
- Site Heterogeneity Model:** None
- Number of Gamma Categories:** 4
- Partition into codon positions:** 3 partitions: positions 1, 2, 3
- Link/Unlink parameters:**
 - Unlink substitution rate parameters across codon positions
 - Unlink rate heterogeneity model across codon positions
 - Unlink base frequencies across codon positions
- Buttons:** Use Yang96 model, Use SRD06 model

Continuous Trait Model: Homogenous Brownian model

- Bivariate trait represents latitude and longitude
- Add random jitter to tips
- Jitter window size:** 0.5
- Estimate phylogenetic signal using tree transform

Clock Type: Uncorrelated relaxed clock

Using the uncorrelated relaxed clock model of Drummond, Ho, Phillips & Rambaut (2006) PLoS Biology 4, e88.

Relaxed Distribution: Lognormal

Use continuous quantile parameterization.

Tree Prior: Coalescent: Exponential Growth

Parameterization for growth: Growth Rate

Citation: Griffiths RC, Tavaré S (1994) Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 344, 403–410 [Parametric Coalescent].
Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W (2002) Genetics 161, 1307–1320 [Serially Sampled Data].

Figura 11 - Parâmetros utilizados no programa BEAUti para análise filogeográfica das sequências de DENV-4

O arquivo gerado no programa BEAUti, contendo os parâmetros da análise filogeográfica foi carregado e submetido a duas corridas independentes no software BEAST v1.8.4, utilizando a biblioteca de alto-desempenho para processamento paralelo BEAGLE, no computador de alta-performance (HPC) *Trestles*, instalado no Centro de Supercomputadores de San Diego, da Universidade da Califórnia, San Diego. O acesso remoto a esta superestrutura computacional se deve ao programa Xsede (*Extreme Science and Engineering Discovery Environment* - <https://www.xsede.org>) da Fundação Nacional de Ciências dos EUA (NSF) e ao portal CIPRES (*Cyber infrastructure for Phylogenetic Research*) Science Gateway v 3.3. - <https://www.phylo.org>).

Os arquivos de saída (.log) foram então carregados no software Tracer v1.6 para avaliar se haviam atingido a convergência através da análise dos valores de ESS (*Effective Sample Size*) > 200, do comportamento do gráfico de traço e da distribuição posterior. Após a análise individual do arquivo de cada corrida para ajuste do *Burn-in*, prosseguimos com a análise dos valores de probabilidade posterior no arquivo combinado. Uma vez que estes valores foram aceitos, o primeiro parâmetro avaliado foi a taxa de substituição (*meanRate*)*, que significa a razão de substituição de um nucleotídeo considerando todos os sítios do alinhamento analisado com o modelo de relógio molecular relaxado não-correlacionado, com uma distribuição subjacente log normal (*uncorrelated relaxed clock model with an underlying log normal distribution* -UCLD). Em seguida foram avaliadas as taxas de substituições para cada uma das três posições dos códons (*CP1.mu*, *CP2.mu*, *CP3.mu*) e a razão de dispersão (*location diffusion Rate*), que promove uma estimativa da dispersão viral em Km/ano.

Os arquivos de árvores formados ao longo da corrida do BEAST foram combinados com a ferramenta LogCombiner v1.8.0. Foi então realizado o *burn-in* das primeiras 2700 árvores, sendo analisadas 27300 árvores, ou 6477 clados únicos, com a ferramenta TreeAnnotator v1.8.4 para a geração da árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC). Esta árvore filogenética, resumindo as informações de distância genética, espacial e temporal foi editada no programa FigTree v1.4.3 para destacar os parâmetros de maior relevância. A

estimativa de sítios sobre seleção positiva ou negativa (dN/dS) foi realizada através do procedimento “*Renaissance Counting*”. O arquivo de alinhamento contendo as 115 sequências de DENV-4 (ENV AM GB 13_NOV_17 Location_red.fasta) foi novamente utilizado em uma nova análise filogeográfica utilizando o programa BEAST em sua versão mais recente (v1.10) e ferramentas auxiliares BEAUti v1.10 (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*), Tree Annotator v1.10, Tracer v1.7.1 e FigTree v1.4.3.(<http://beast.community/index.html>).

Inicialmente avaliamos quatro diferentes modelos para o nosso conjunto de dados conforme sugerido no artigo de Drummond (2007). Os modelos avaliados foram quanto a substituição de nucleotídeos: (I) por posição específica em cada códon (GTR + CP); (II) e o modelo padrão GTR+G+I (G-distribuição gamma, I-sítios invariáveis). Também foram avaliados dois modelos para as taxas de variação nos ramos da árvore: (a) Relógio molecular estrito (*strict clock*); (b) relógio molecular relaxado com distribuição log normal (*uncorrelated log normal-distributed relaxed molecular clock-UCLD*). Assim as combinações avaliadas foram: 1) GTR+CP+strict; 2) GTR+G+I+strict; 3) GTR+CP+UCLD e 4) GTR+G+I+UCLD. Cada modelo foi submetido a duas corridas (MCMC) com 10.000.000 de passos cada uma, sendo as informações coletadas a cada 500 passos.

4.12. Imunoensaio para detecção de IgG anti-dengue

Com o intuito de identificar possíveis infecções secundárias, realizamos a pesquisa de anticorpos IgG anti-dengue em um total de 360 amostras de soro, sendo 180 NS1-Positivo e 180 NS1-Negativo, através do Kit SERION ELISA *classic* Dengue Virus IgG (Würzburg, Germany), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante.

Posteriormente, a relação entre os resultados RT-qPCR, NS1 e IgG foi analisada através de uma tabela de contingência utilizando o teste exato de Fisher bi-caudal (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency2/>). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. RT-PCR em Tempo Real

Neste estudo 608 amostras de pacientes com suspeita de infecção por dengue, coletadas entre 2011 e 2016 de 26 municípios do Amazonas, foram submetidas à RT-qPCR para detecção de material genético viral. No que se refere às amostras concedidas pelo LACEN-AM, das 239 amostras NS1-positivas analisadas, 119 (49,8%) apresentaram $Ct \leq 39$ e foram consideradas positivas e outras 120 (50,2%) apresentaram $Ct > 39$, ou não apresentaram nenhum Ct e foram consideradas negativas. Já em relação as 336 amostras NS1-negativas, 43 (12,8%) tiveram resultado positivo e 293 (87,2%) apresentaram $Ct > 39$ ou não tiveram nenhum Ct. Além disso, também foram analisadas 33 amostras de RNA provenientes da FMT-HVD coletadas nos municípios de Itacoatiara, Tefé e Manacapuru entre 2011 e 2013, das quais 19 amostras (57,5%) apresentaram $Ct \leq 39$ (Tabela 9).

NS1	RT-qPCR	
	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	119/239 (49,8%)	120/239 (50,2 %)
NEGATIVO	43 /336 (12,8%)	293/336 (87,2%)
SEM INFORMAÇÃO	19/33 (57,5%)	14/33 (42,5%)

Tabela 9 - Resultados obtidos pelo método RT-qPCR para detecção do RNA viral

O número de amostras processadas por município e por ano estudado é mostrado na tabela 10 e figura 12, respectivamente.

Município	Nº de amostras processadas
Alvarães	10
Anorí	6
Apuí	1
Autazes	1
Barcelos	1
Berurí	7
Boa Vista do Ramos	2
Borba	17
Careiro	3
Coari	8
Guajará	1
Humaitá	13
Iranduba	3
Itacoatiara	50
Labrea	4
Manacapuru	19
Manaus	275
Manicoré	9
Maúes	24
Nova Olinda do Norte	5
Novo Airão	4
Novo Aripuanã	5
Parintins	50
Presidente Figueiredo	4

São Gabriel da Cachoeira	4
Tefé	82

Tabela 10 - Número de amostras processadas de acordo com o município

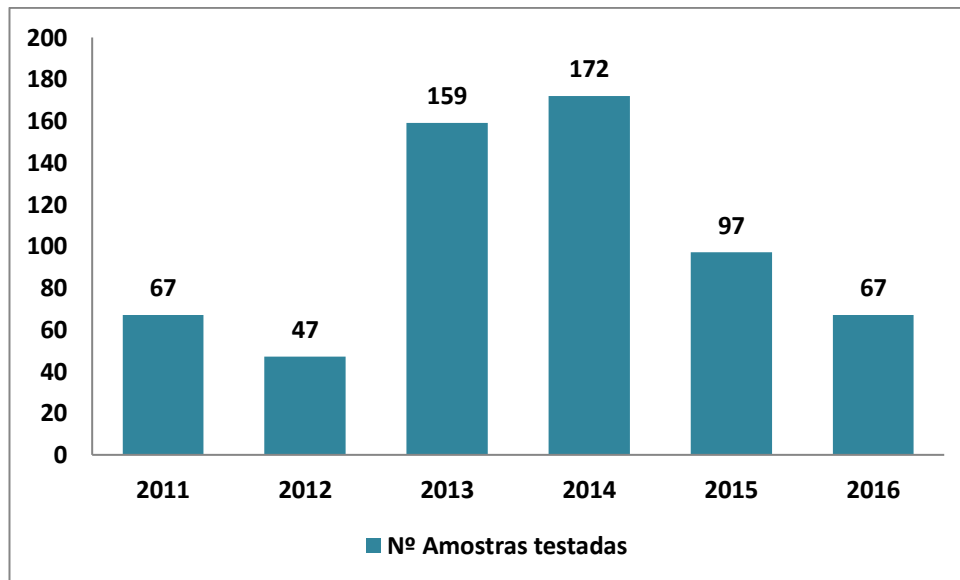


Figura 12 - Número de amostras processadas de acordo com o ano de coleta

5.2. Identificação dos sorotipos virais

Um total de 174 amostras que apresentaram $Ct \leq 38$ no RT-qPCR foram submetidas ao protocolo de semi-nested PCR (LANCIOTTI et al., 1992) para identificação dos sorotipos virais, dentre as quais 96 (55,2%) tiveram resultado positivo, sendo 7 (7,3%) para DENV-1, 9 (9,4%) para DENV-2 e 80 (83,3%) para DENV-4.

No que se refere a origem dessas amostras, dos 26 municípios do Amazonas incluídos no estudo, 10 tiveram amostras positivas para pelo menos 1 dos 3 sorotipos identificados, sendo o DENV-4 detectado em todos (Tabela 11). Além disso, este sorotipo foi o único a ser detectado em todo o período de 2011 a 2016 (Figura 13).

MUNICÍPIO	DENV-1	DENV-2	DENV-4
Boa vista do Ramos	0	0	1
Borba	0	0	2
Itacoatiara	0	0	16
Manacapuru	0	0	2
Manaus	6	7	42
Maués	0	0	3
Novo Airão	0	1	2
Parintins	1	0	1
Tefé	0	1	10
São Gabriel da Cachoeira	0	0	1
Total	7	9	80

Tabela 11 - Resultados de sorotipagem utilizando o método de semi-nested PCR (LANCIOTTI et al.,1992). A tabela mostra o número de amostras positivas em cada município e os sorotipos identificados.

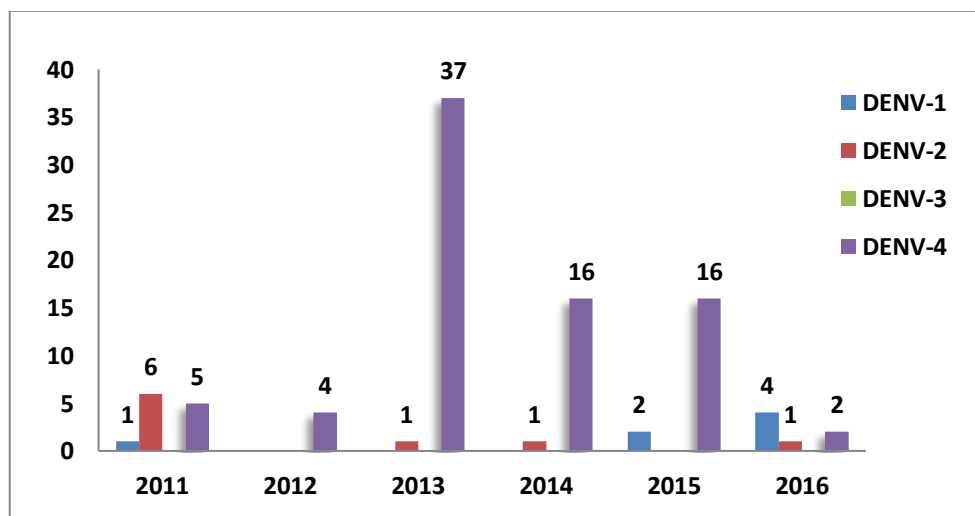


Figura 13 - Resultados de sorotipagem de acordo com ano de coleta. A figura mostra o número de amostras positivas para os diferentes sorotipos no período de 2011 a 2016

Através das reações de semi-nested PCR, foi possível então identificar dentre as amostras testadas, o DENV-4 como o sorotipo predominante. Por este motivo as análises mais detalhadas de sequenciamento e filogeografia foram direcionadas para este sorotipo.

5.3. Padronização e reações de PCR

Para o sequenciamento das amostras de DENV-1 e DENV-2, realizamos testes de padronização de um protocolo de semi-nested PCR que tem como alvo a região do envelope, no qual foram observados os melhores resultados quando utilizada a temperatura de hibridização de 63°C (Figura 14) e concentração final dos iniciadores de 1,0µM.

Com o protocolo estabelecido foram testados os cDNAs de cinco amostras de DENV-1 (16110401, 1500030004097, 160044000399, 160044000457 e 160044000359) e cinco de DENV-2 (33351, 29462, 26718, 160008000045 e 145901000136). Na 1ª PCR somente a amostra de DENV-1 (16110401) foi positiva, enquanto que na 2ª PCR quatro amostras de DENV-1 (16110401, 1500030004097, 160044000457 e 160044000359) e uma de DENV-2 (26718) foram positivas para os dois fragmentos (A e B), e seguiram para tentativa de sequenciamento (figura 15).

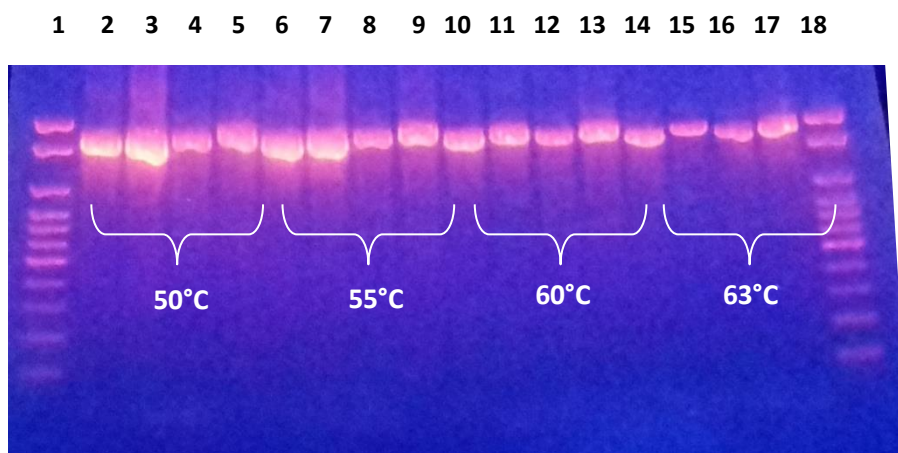


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Teste de padronização da 1ª etapa da reação de semi-nested PCR. Poços 1 e 18- ladder 100pb (Norgen); poços 2, 6, 10 e 14 - DENV-1; poços 3, 7, 11 e 15- DENV-2; poços 4, 8, 12 e 16- DENV-3; e poços 5, 9, 13 e 17- DENV-4 (iniciadores PTNES+AS)

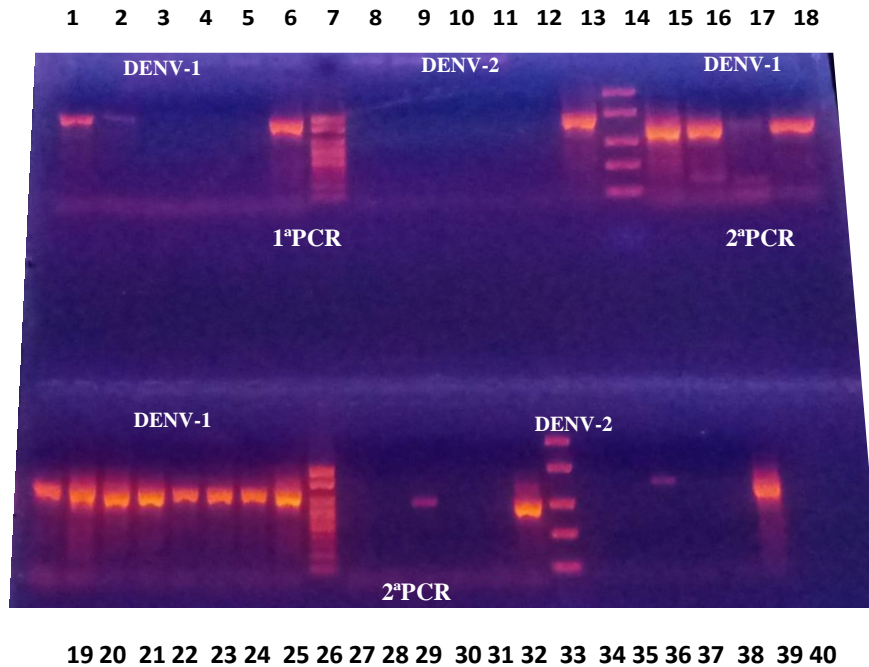


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Resultados da 1^a e 2^a etapa da semi-nested PCR para DENV-1 e 2. 1^a PCR: poços 1-13 (1-5 amostras de DENV-1 e 6-controle positivo (CT+); 7-ladder 100pb; Poços 8-12 amostras de DENV-2 e 13 CT+; 14-ladder 1kb e 2^a PCR: 15-40 (Poços 15-20 amostras de DENV-1 e 26 CT+; 27- ladder 100pb; 28-32 amostras de DENV-2; 34-ladder 1kb; 35-39 amostras de DENV-2 e 33 e 40CT+)

Para que fosse realizado o sequenciamento de DENV-4, todas as 80 amostras positivas pelo método de Lanciotti foram submetidas a reações de PCR convencional tendo como alvos as regiões codificantes para ENV e NS1. Para cada amostra eram realizadas quatro reações distintas que geravam quatro *amplicons* parcialmente sobrepostos que cobriam toda a região do ENV e NS1. Estes quatro *amplicons* foram denominados nesta dissertação como *amplicons* 1, 2, 2B e 3, e após gerados os *amplicons* eram confirmados por eletroforese em gel de agarose, no qual eram visualizados fragmentos com os tamanhos de 1889 pb, 3038 pb, 2120pb e 1704 pb, respectivamente, mostrados na figura 16.

Do total de amostras testadas foram obtidos inicialmente os *amplicons* 1, 2 ou 2B e 3 de 19 amostras. As demais ou tiveram resultado negativo para todos os *amplicons* ou eram positivas apenas para um ou dois *amplicons*. Por isso, com o objetivo de obter o maior número de sequências, algumas amostras foram submetidas a outro protocolo de PCR no qual

foi utilizada uma enzima de alta fidelidade. Desta forma foi possível obter mais 18 amostras com *amplicons* que cobriam toda a região do envelope e NS1, totalizando 37 amostras que seguiram para o sequenciamento, provenientes dos municípios de Itacoatiara, Manacapuru, Manaus, Maúes, Novo Airão, São Gabriel da Cachoeira e Tefé (Figura 17)



Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Visualização dos produtos gerados na PCR convencional para DENV-4. Poço 1-ladder 1k; poços 2, 6, 10, 14, 18 e 22- amplicon1; poços 3, 7, 11, 15, 19 e 23- amplicon 2; poços 4, 8, 12, 16, 20 e 24- amplicon 2B; e poços 5, 9, 13, 17, 21 e 25- amplicon 3

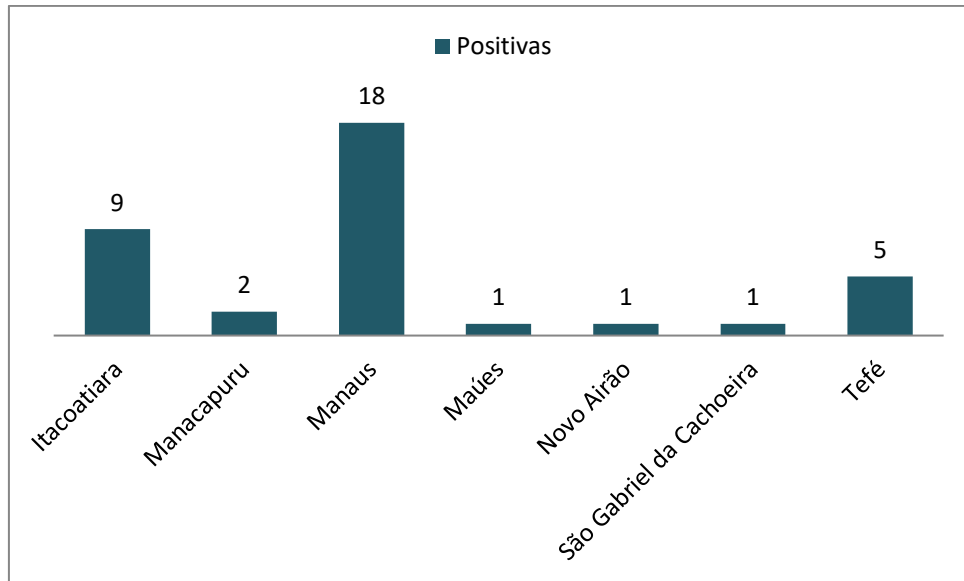


Figura 17 - Número de amostras positivas na PCR-convencional para as regiões ENV e NS1 de DENV-4 de acordo com o município de origem.

5.4. Sequenciamento e Filogenia

DENV-1

O sequenciamento completo do envelope de DENV-1 foi obtido de uma única amostra, denominada 16110401, coletada em 2016 no município de Manaus, visto que as demais amostras não apresentaram boa qualidade no sequenciamento. Os arquivos de saída do sequenciador foram utilizados para montar um *contig* da amostra no programa Geneious versão 10.2.2. A sequência editada foi submetida à análise genotípica utilizando a ferramenta *Dengue Virus Typing Tool*, que permitiu identificá-la como uma cepa pertencente ao genótipo V (Figura 18).

SEQUENCE ASSIGNMENT	
Name	16110401
Length	1485
VIRUS ASSIGNMENT	
Virus assignment	Dengue Serotype 1
SEROTYPE AND GENOTYPE RESULT	
Serotype assignment	Genotype V Supported with phylogenetic analysis and bootstrap 96.0 (>= 70.0)
Genotype	N/A Sequence does not sufficiently overlap with region or subcluster is not available for the type
GENOME REGION	
Sequence starts at position 840 and ends at position 2325 relative to the 1V_KJ189351 reference sequence.	

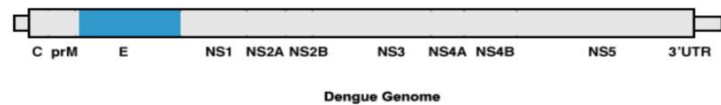


Figura 18- Resultado da genotipagem da amostra 16110401 de DENV-1

A reconstrução filogenética foi realizada de acordo com o método de máxima verossimilhança (ML) do programa PhyML, utilizando o modelo GTR+I+G (p-invar=0.5110; gamma=1.9720) que foi escolhido com a ajuda do programa jModeltest versão 2.1.7. A sequência de DENV-1 obtida neste estudo foi alinhada com outras 89 sequências de ENV de cepas isoladas em outros estados e países disponíveis no GenBank, representando os genótipos que circulam mundialmente. De acordo com os nossos resultados, a amostra 16110401 mostrou maior similaridade (99,6%) com a cepa KX768377, isolada na Argentina em fevereiro de 2016. Outras três cepas também mostraram estreita relação filogenética com o DENV-1 isolado neste estudo, duas delas (Nº acesso Genbank: KF444785.1 e KF444786.1) isoladas a partir de amostras humanas coletadas em 2009 em Roraima apresentando 99,5% de similaridade e uma cepa isolada em mosquito (Nº acesso Genbank: JN713897.1) também em Roraima em 2010 (Figura 19).

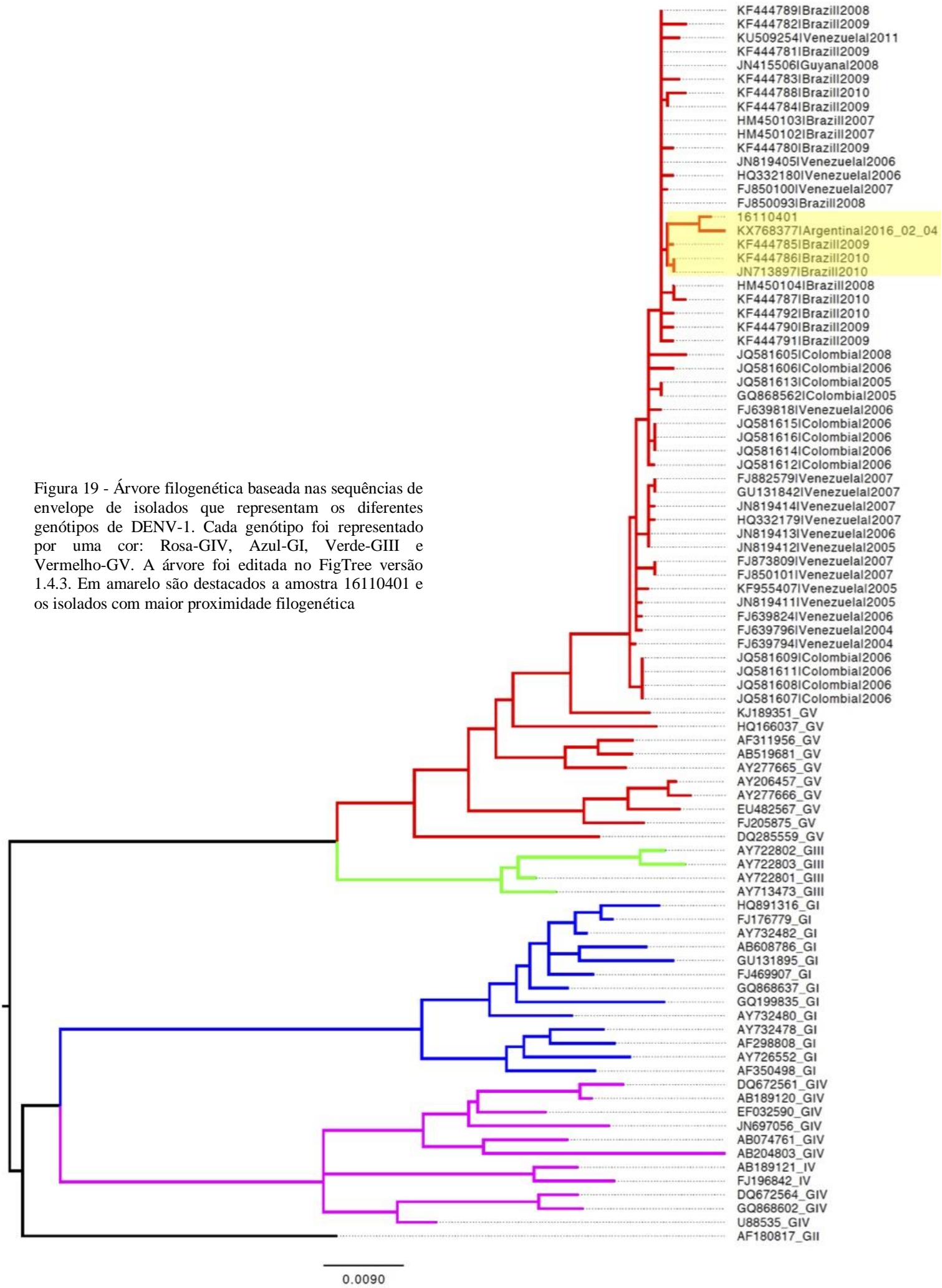


Figura 19 - Árvore filogenética baseada nas sequências de envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-1. Cada genótipo foi representado por uma cor: Rosa-GIV, Azul-GI, Verde-GIII e Vermelho-GV. A árvore foi editada no FigTree versão 1.4.3. Em amarelo são destacados a amostra 16110401 e os isolados com maior proximidade filogenética

DENV-2

O sequenciamento completo do envelope de DENV-2 foi obtido da amostra, identificada como 26718, coletada em 2011 também no município de Manaus. Os dados gerados no sequenciamento foram utilizados para montagem do *contig* da amostra utilizando o programa Geneious 10.2.2. E conforme a análise feita com a ferramenta *Genoma detective*, está é uma cepa pertencente ao genótipo Asiático-Americano (Figura 20). Através do alinhamento com outras 142 sequências de outros estados e países, representando todos os genótipos obtidas com a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), observamos que a amostra de DENV-2 encontrada neste estudo é filogeneticamente relacionada a duas cepas (KP188550 e KT43859), ambas isoladas em São José do Rio Preto (SP) em Junho de 2008 (Figura 21).

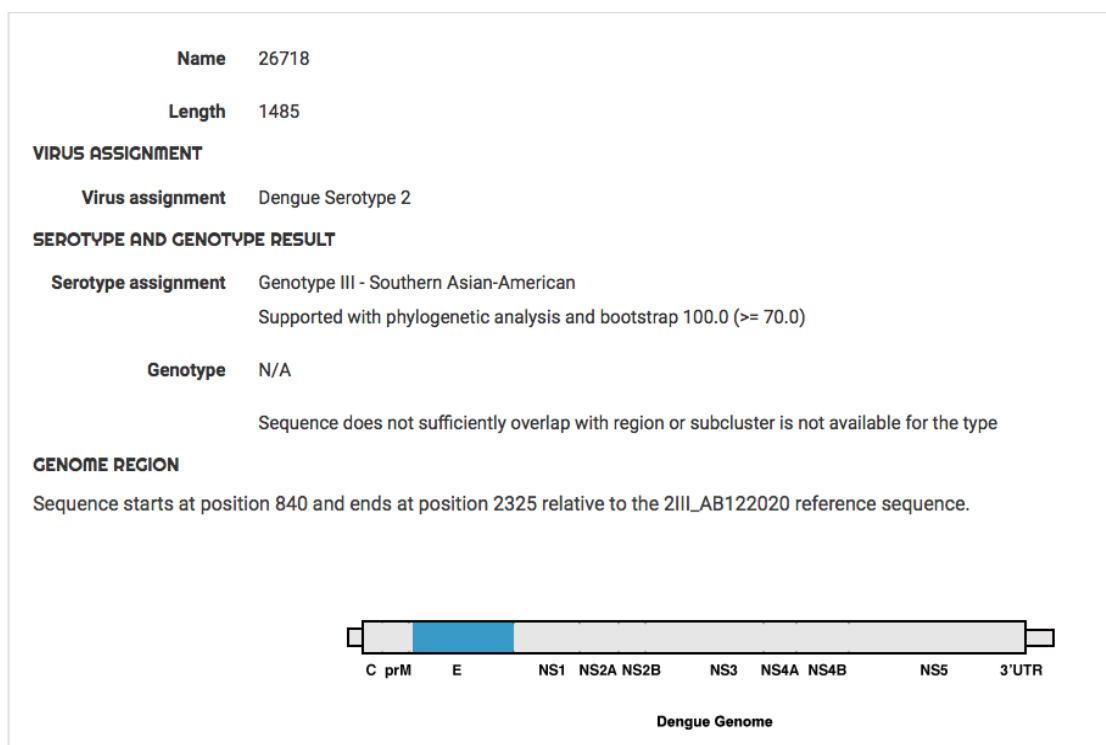


Figura 20 - Resultado de genotipagem da amostra 26718 de DENV-2 através da ferramenta *Genoma detective*

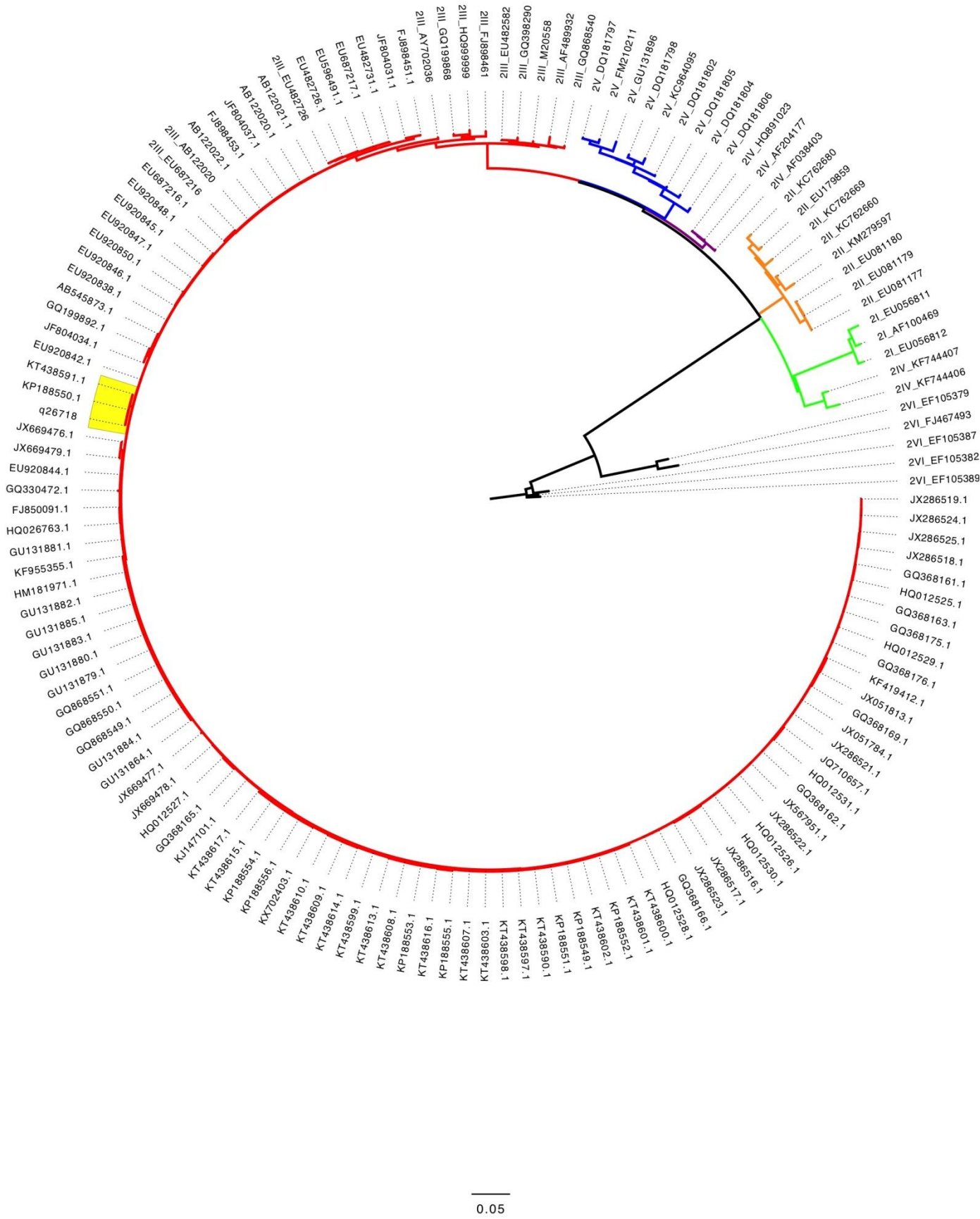


Figura 21 - Árvore filogenética baseada nas sequências de envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-2, construída pelo método de máxima verossimilhança (ML) e o modelo GTR+I+G (p-invar=0.5110; gamma=1.9720). Cada genótipo foi representado por uma cor: Roxo GIV, Azul V, Verde GI e Vermelho II (Asiático/Americano). A árvore foi editada no FigTree v1.4.3. Em amarelo está destacada a amostra 26718 e outros isolados filogeneticamente relacionados

DENV-4

Das 37 amostras de DENV-4 submetidas ao sequenciamento, foi possível obter 27 sequências completas de ENV (1485pb) e 25 de NS1 (1056pb), de amostras coletadas entre 2011 a 2016, nos municípios de Itacoatiara, Manaus, Maués, Novo Airão, São Gabriel da Cachoeira e Tefé (Tabela 12). Quando comparadas entre si as sequências de ENV apresentaram similaridade nucleotídica de 99 a 100% e identidade de 99,6% a 100%. Além disso, foram identificados entre essas sequências 140 sítios variáveis. Já em relação às 25 sequências de NS1, foi observado similaridade de 98,5 a 100% entre elas e 91 sítios de variação.

Nº de identificação	Município	Resultado de NS1	Data da coleta	Regiões sequenciadas
30241	Manaus	NEG	03/02/2011	ENV e NS1
120001005283	Manaus	POS	12/12/2012	ENV e NS1
130001000323	Manaus	NEG	01/02/2013	ENV e NS1
130005000139	Manaus	POS	08/02/2013	ENV e NS1
130005000217	Manaus	POS	01/03/2013	ENV e NS1
130005000251	Manaus	POS	13/03/2013	ENV e NS1
130016000161	Manaus	POS	27/02/2013	ENV e NS1
130019000041	Manaus	POS	14/03/2013	ENV e NS1
130019000051	Manaus	POS	14/03/2013	ENV e NS1
130019000058	Manaus	POS	13/03/2013	ENV e NS1
130019000166	Manaus	POS	23/04/2013	ENV e NS1
134301000063	Maués	POS	15/04/2013	ENV e NS1
134601000023	Novo Airão	POS	15/04/2013	ENV e NS1
140001000312	Manaus	POS	26/05/2014	ENV e NS1
140005000153	Manaus	POS	26/03/2014	ENV e NS1
143101000030	Itacoatiara	POS	24/02/2014	ENV

143101000033	Itacoatiara	POS	24/02/2014	ENV
143101000074	Itacoatiara	POS	24/02/2014	ENV e NS1
143101000084	Itacoatiara	POS	24/02/2014	ENV e NS1
143101000099	Itacoatiara	POS	24/02/2014	ENV e NS1
145301000111	São Gabriel da Cachoeira	POS	09/10/2014	ENV e NS1
150005000076	Manaus	POS	11/03/2015	ENV e NS1
ITA 55	Itacoatiara	NR	05/04/2015	ENV e NS1
TF 34	Tefé	NR	17/04/2015	ENV e NS1
ITA 63	Itacoatiara	NR	20/04/2015	ENV e NS1
TF 117	Tefé	NR	09/06/2015	ENV e NS1
TF191	Tefé	NR	01/06/2016	ENV e NS1

Tabela 12 - Relação de amostras com seus respectivos números de identificação, município de origem, resultado de NS1, data da coleta e regiões genômicas sequenciadas. POS: Positivo, NEG: Negativo e NR: Não Realizado.

Ao analisarmos as sequências de ENV utilizando a cepa de referência NC_002640 disponível no GenBank, observamos que a maioria das substituições de nucleotídeos foi do tipo transição, sendo que deste tipo de mutação somente cinco levaram a troca de aminoácidos. Na sequência da amostra 130016000161 a substituição no nucleotídeo 1483(C→T) levou a mudança de uma Treonina por Isoleucina (Thr461Ile), já na posição 1829 da amostra 143101000084 a troca de (G→A) causou a substituição de uma Metionina por Isoleucina (Met576Ile). Na posição 1848 (G→A) da amostra 130005000139 uma Glicina foi substituída por uma Arginina (Gly583Arg). Nas amostras ITA 55 e ITA 63, uma mudança no nucleotídeo 2253 (G→A), levou a troca de uma Valina por Isoleucina (Val718Ile), e na amostra TF34 a troca nucleotídica na posição 2378 (A→G) substituiu uma Isoleucina por Valina (Ile759Val).

As únicas substituições do tipo transversão ocorreram nos nucleotídeos 989 (T→A) na sequência das amostras 150005000076, ITA 55, ITA 63; no nucleotídeo 1207 (A→T) da amostra 13001900166 gerando a mudança do aminoácido Tirosina para Fenilalanina na posição 369 da proteína E (Tyr369Phe); na posição nucleotídica 1408 (A→C) da amostra

140001000312 alterando o aminoácido Asparagina para Treonina (Asn436Thr) e na posição 1862 (T→A) também da amostra 150005000076 trocando uma Treonina por uma Isoleucina (Thr587Ile). Através da utilização do programa *Mixed Effects Model of Evolution* (MEME) foi encontrada uma evidência de seleção positiva do códon 157 (Asn157Thr, p-value = 0.08, threshold = 0.1) (Figura 22).

Dentre as sequências de ENV analisadas, aquela que apresentou o maior número de variações na sua sequência foi a amostra 143101000084 coletada no município de Itacoatiara. Além da substituição de aminoácido no resíduo 576 mostrado anteriormente, a sequência apresentou outras oito substituições nos nucleotídeos 1124, 1232, 1361, 1427, 1754, 1793, 2180 e 2258.

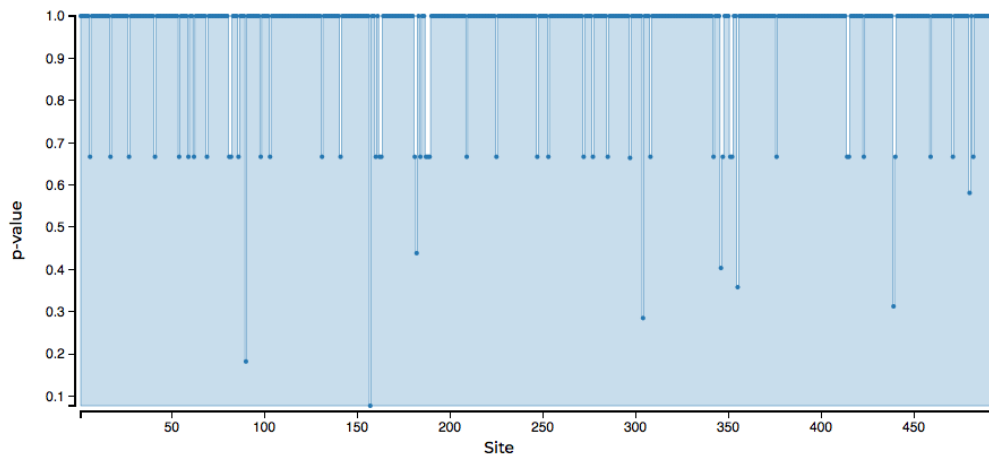


Figura 22 - Resultado de seleção evolutiva utilizando o programa MEME

Em relação às 25 sequências NS1 obtidas neste estudo, entre elas foram observadas sete trocas de aminoácidos, a primeira causada por uma substituição no nucleotídeo 3174 (T→C) da sequência da amostra 130005000217 que levou a troca do aminoácido Fenilalanina para Leucina no resíduo 1025 (Phe1025Leu). Outra ocorreu na posição 3291(A→G) na sequência da amostra 130005000251, resultando na troca de uma Asparagina por um Ácido aspártico (Asn1064Asp) e uma terceira que ocorreu na sequência da amostra 134301000063 coletada no município de Maúes, na qual houve a substituição de Treonina para Alanina (Thr1125Al), devido a substituição no nucleotídeo 3474 (A→G).

Outras três trocas de aminoácidos foram identificadas nas amostras 143101000074, 143101000084 e 143101000099, todas oriundas de Itacoatiara. As substituições nucleotídicas

ocorreram nas posições 3216 (T→A), 3249 (G→A) e 3393(T→A) levando a troca de Valina por Metionina (Val1039Met), Ácido aspártico por Asparagina (Asp1064Asn) e de Leucina para Isoleucina (Leu1098Ile). E a última localizada no nucleotídeo 3395(A→T) na terceira posição do códon, da sequência NS1 da amostra 140005000153 coletada em Manaus, que levou a troca de uma Leucina por uma Fenilalanina (Leu1098Phe).

Somente duas amostras NS1-Negativas (30241 e 130001000323), coletadas em Manaus, puderam ser sequenciadas. Ao compararmos essas duas sequências com as outras de NS1 obtidas neste estudo, observamos que ambas apresentaram somente duas substituições nas posições 2825 (G→A) e 3384 (C→T) da amostra 30241 e nas posições 2918 (C→T) e 3161 (A→T) da amostra 130001000323, todas mutações silenciosas.

As 27 sequências de envelope de DENV-4 obtidas neste estudo foram utilizadas para construção de uma árvore filogenética de acordo com o método de máxima verossimilhança (ML) e o modelo GTR+G (gamma=0.2430) selecionado com a ajuda do programa jModeltest versão 2.1.7, a fim de que fosse realizada a genotipagem das amostras isoladas. De acordo com os nossos resultados todas as cepas de DENV-4 isoladas neste estudo pertencem ao genótipo II (Figura 23).

Posteriormente utilizando a ferramenta *Microreact* disponível online, juntamente com as informações da árvore filogenética de ML na qual estão incluídas as sequências de ENV obtidas neste estudo e outras sequências isoladas no estado, montamos um mapa com a distribuição das amostras de DENV-4 pelos municípios do Amazonas. Na árvore os círculos representam as sequências obtidas neste estudo, sendo cada município representado por uma cor. Já as outras sequências isoladas na região que se encontram disponíveis no GenBank foram representadas por quadrados verdes (Figura 24).

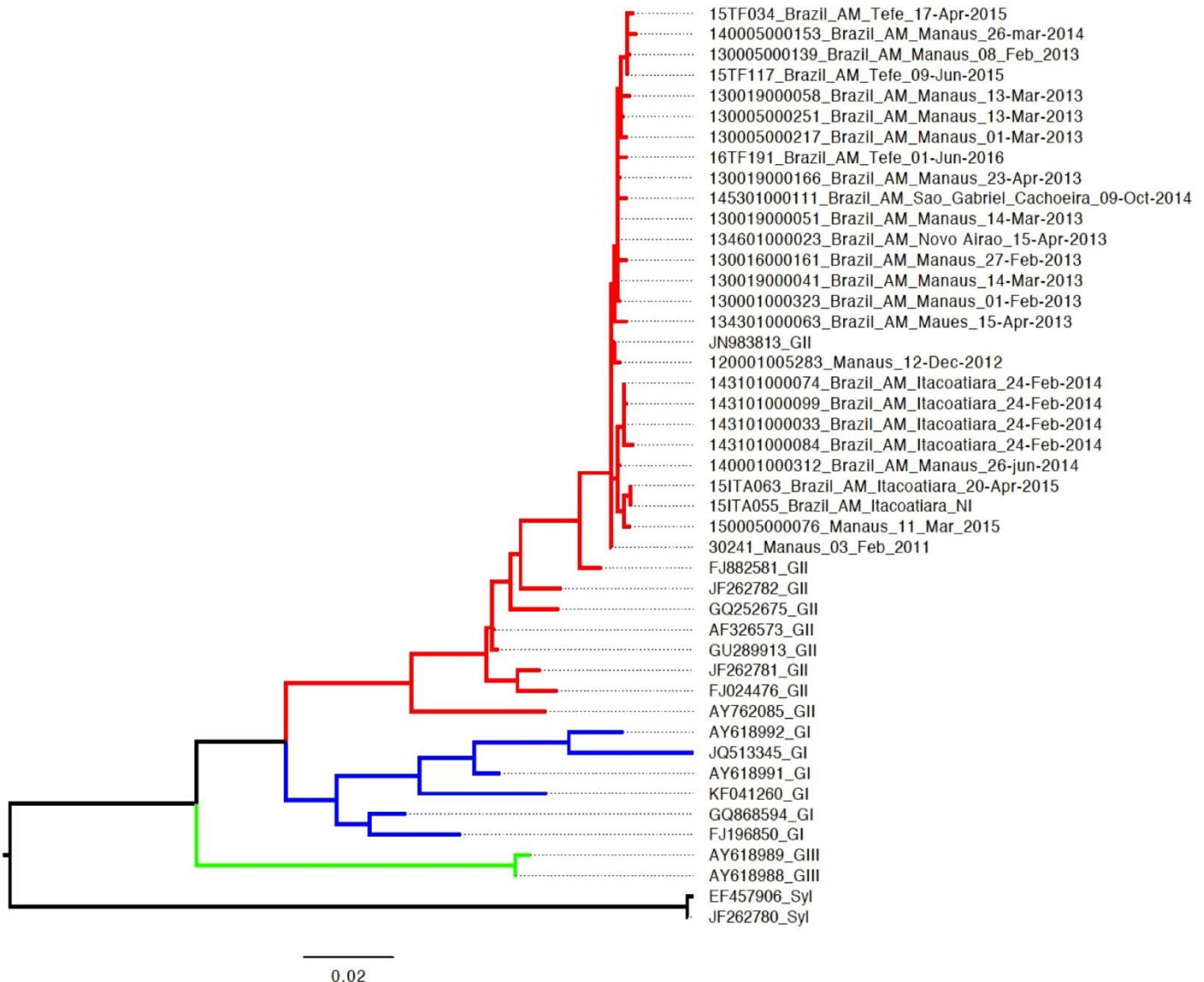


Figura 23 - Árvore filogenética baseada nas seqüências do envelope de isolados que representam os diferentes genótipos de DENV-4 e nas cepas obtidas neste estudo, construída pelo método de máxima verossimilhança (ML) utilizando o modelo GTR+G (distribuição gamma= 0.2430). Cada genótipo foi representado por uma cor: Preto-Silvestre, Verde-GIII, Azul-GI e Vermelho-GII. A árvore foi editada no FigTree versão 1.4.3

Preparamos um banco de dados contendo 164 seqüências brasileiras de DENV-4 genótipo II do período de 1982 a 2015, e utilizando o Geneious versão 10.2.2 realizamos o alinhamento dessas seqüências com as seqüências de ENV obtidas neste estudo. Uma árvore filogenética foi construída utilizando o programa PhyML, de acordo com o método ML e o modelo Tamura Nei + G (gamma= 0.3010), seguindo o Critério de Informação de Akaike (AIC) e o Critério de Informação Bayesiano (BIC). A análise filogenética mostrou dois clados principais representados em vermelho e azul. Todas as amostras deste estudo se agruparam no clado vermelho, juntamente com outras amostras brasileiras, com exceção das amostras, JN559740 isolada em março de 1982 em Boa vista (RR), JQ513334 isolada em novembro de 2010 em Santarém e das amostras JQ513335, JQ513336 e JQ513337 isoladas em janeiro de 2011 em Belém (PA) (Figura 25).

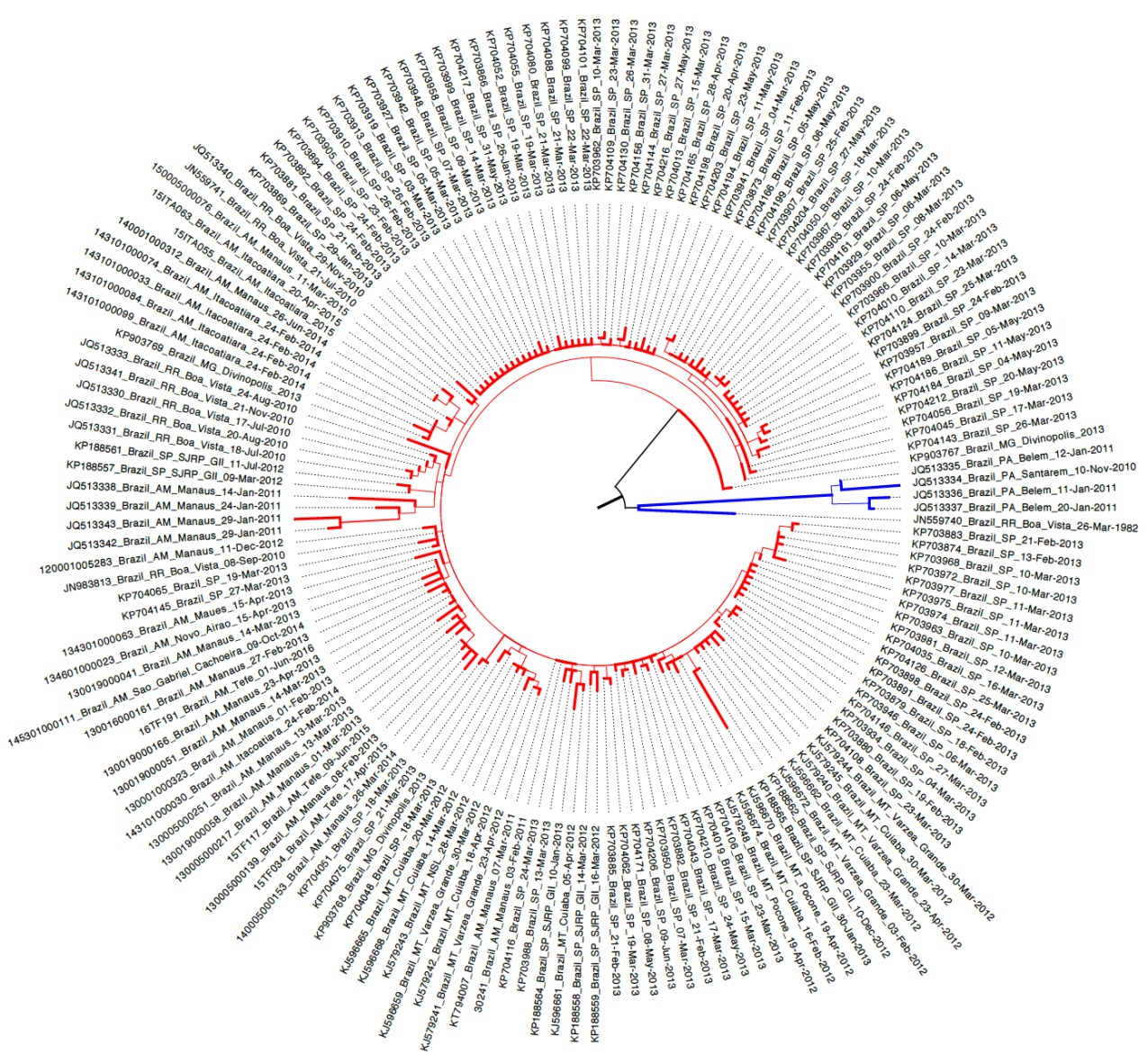


Figura 25 - Árvore filogenética baseada nas sequências de ENV de isolados brasileiros do genótipo II de DENV-4 e nas cepas obtidas neste estudo, construída pelo método de máxima verossimilhança (ML) utilizando o modelo Tamura Nei + G (gamma= 0.3010). Dois cladogramas principais são representados em vermelho e azul. A árvore foi editada no FigTree v1.4.3

Posteriormente utilizando a ferramenta GARD e o banco de dados contendo as 115 sequências de envelope de DENV-4 GII, juntamente com as sequências representativas dos outros três genótipos, não foram observados eventos de recombinação genética.

Já em relação a análise da estrutura temporal realizada com o software TempEst v1.5.1 na qual foram utilizadas as funções “*Best-fitting root*” e “*Heuristic residual meansquared*”, foram obtidos os seguintes resultados: X-intercept (TMRCA) 1981,074 e R² de 0,8093. Os gráficos de divergência em função do tempo “root-to-tip”(Figura 26, A) e de resíduos (Figura 26, B) mostraram boa correlação (R²>0,8), para a maioria das amostras, com exceção de sete sequências de amostras brasileiras previamente publicadas: KP188565 (SP); JQ513343, JQ513342, JQ513339, JQ513338 (AM); JQ513336 e JQ513334 (Pará). A posição destas sequências na árvore filogenética pode ser visualizada na Figura 26, C.

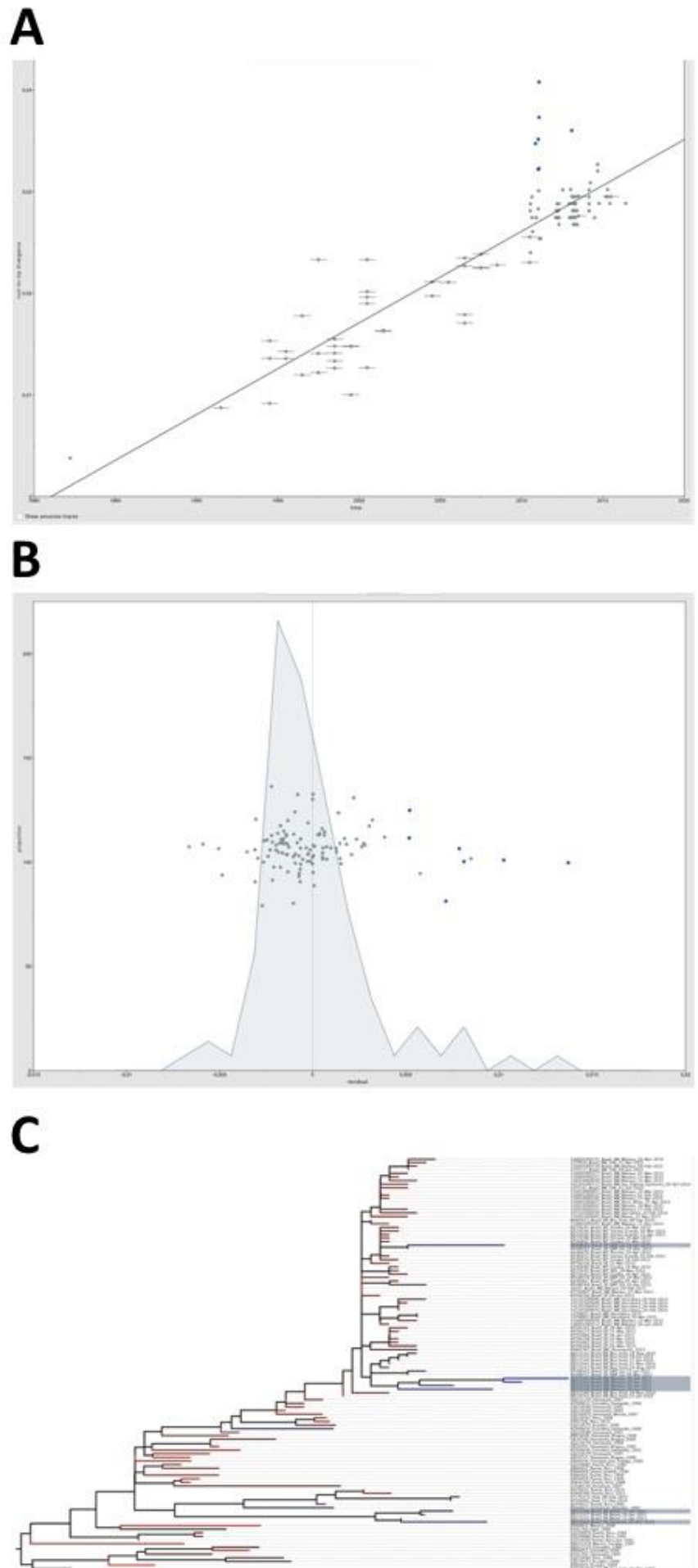


Figura 26 - Resultados da análise de estrutura temporal das sequências utilizando o software TempEst v1.5.1. Os gráficos de divergência em função do tempo “root-to-tip”(Figura 26, A) e de resíduos (Figura 26, B) mostraram boa correlação ($R^2 > 0,8$)

Após as primeiras análises nos programas BEAUti e Tracer, foram analisados os valores de probabilidade posterior no arquivo combinado. O primeiro parâmetro encontrado foi a taxa de substituição (*mean rate*)* equivalente a $1,1627 \times 10^{-3}$ (95% HPD interval $9,6594 \times 10^{-4}$ - $1,3753 \times 10^{-3}$). Em seguida foram avaliadas as taxas de substituições para cada uma das três posições dos códons (*CP1.mu*, *CP2.mu*, *CP3.mu*), onde a taxa de substituição no terceiro códon é maior que no primeiro, o qual é maior que no segundo ($CP3.mu > CP1.mu > CP2.mu$). O terceiro parâmetro avaliado foi a razão de dispersão (*location diffusion Rate*), que promove uma estimativa da dispersão viral em Km/ano. A figura 27 mostra que foi encontrada uma razão de dispersão média do DENV-4 no Brasil de 179,15 (150,54 - 207,56) Km/ano.

Os arquivos de árvores formados ao longo da corrida do BEAST foram combinados com a ferramenta LogCombiner v1.8.0. Foi então realizado o *burn-in* das primeiras 2700 árvores, sendo analisadas 27300 árvores, ou 6477 clados únicos, com a ferramenta TreeAnnotator v1.8.4 para a geração da árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC). Esta árvore filogenética, resumindo as informações de distância genética, espacial e temporal foi editada no programa FigTree v1.4.3 para destacar os parâmetros de maior relevância, o resultado final está demonstrado na figura 28. E através do procedimento '*Renaissance Counting*' não foram observados sítios sobre seleção positiva. Apenas três sítios (149, 412 e 461) com seleção neutra. Todos os outros mostraram forte seleção negativa.

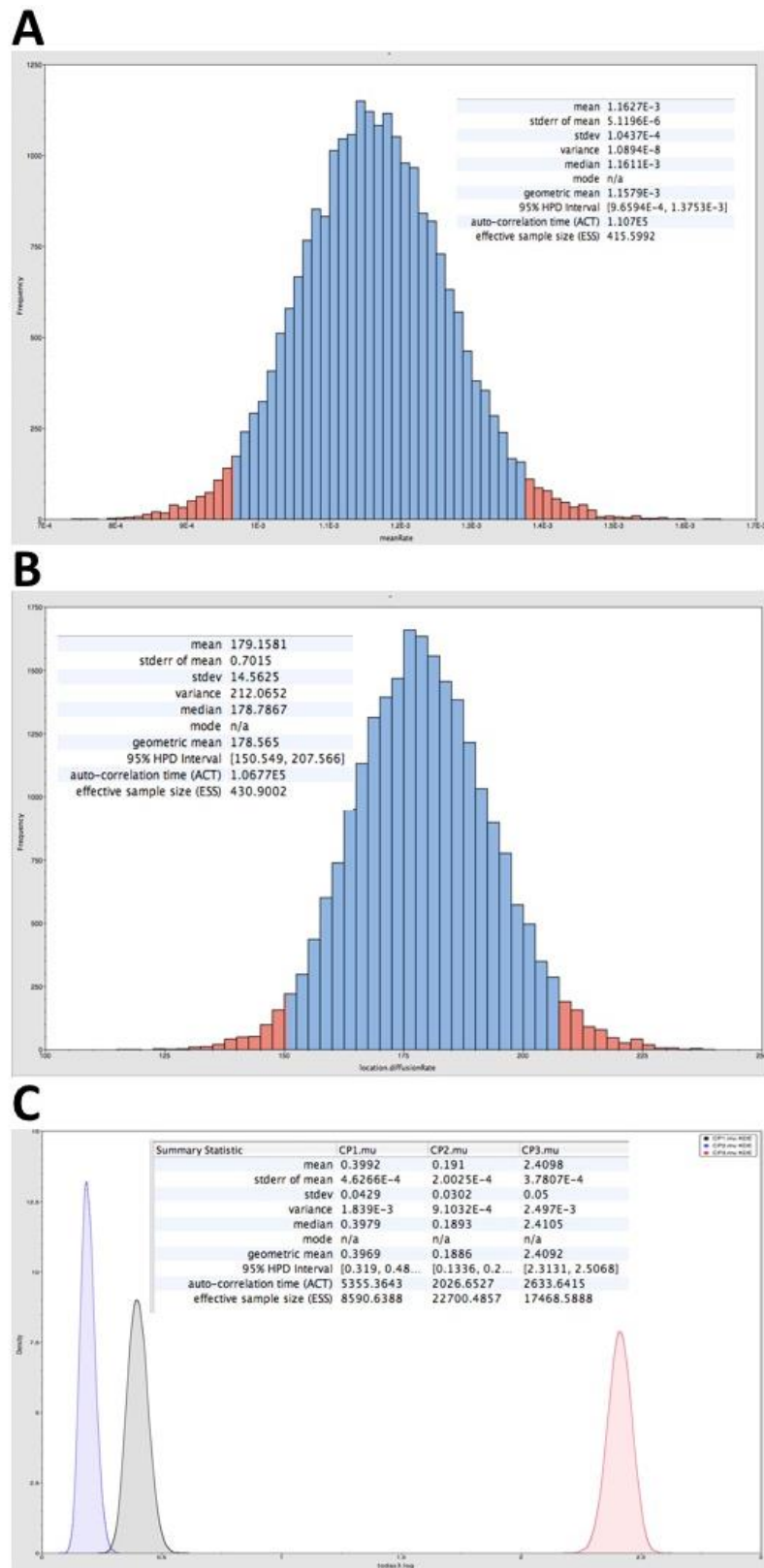


Figura 27 - Resultados da análise realizada com o software Tracer v1.6

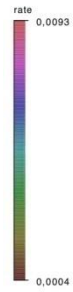
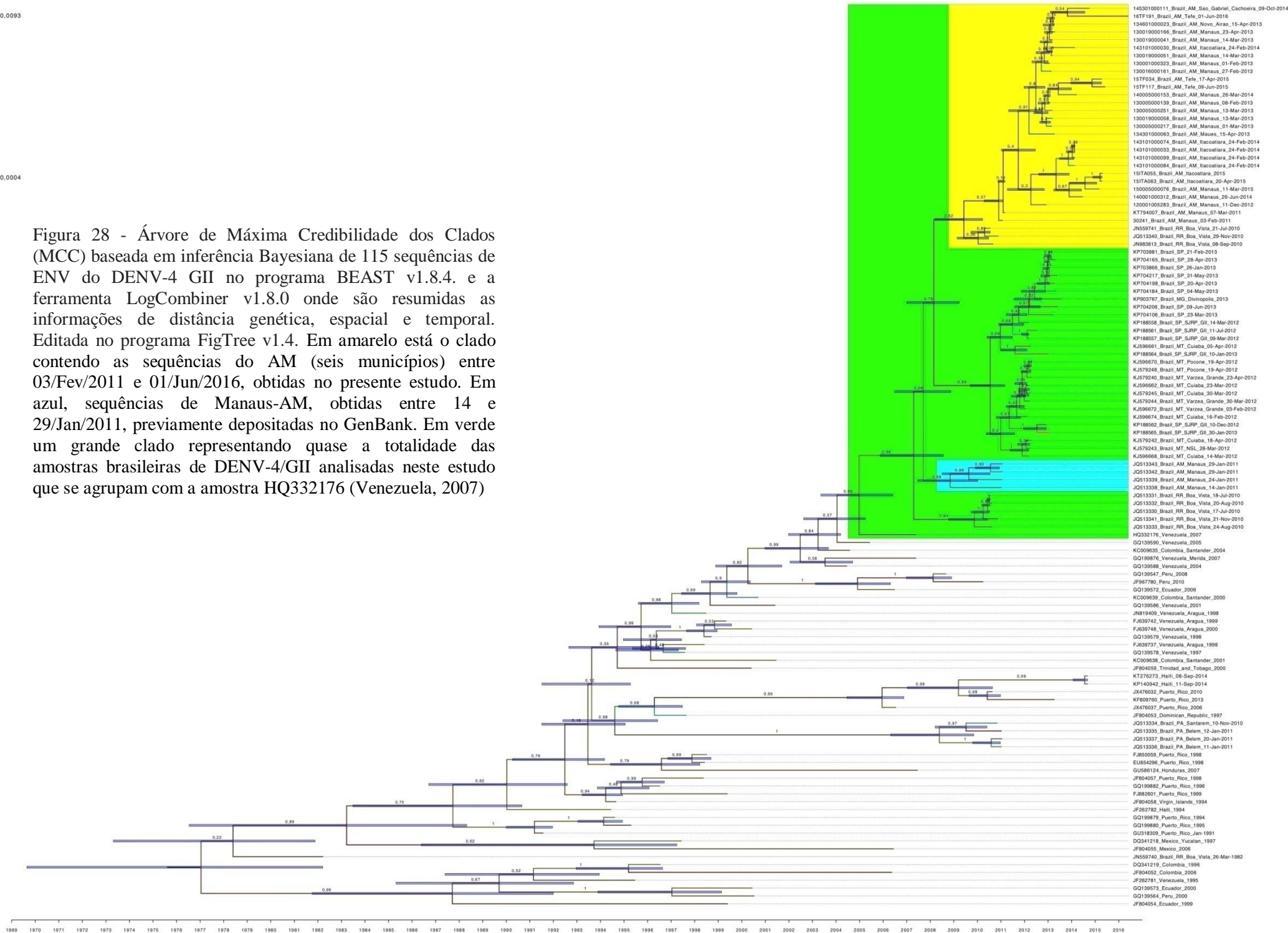


Figura 28 - Árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC) baseada em inferência Bayesiana de 115 seqüências de ENV do DENV-4 GII no programa BEAST v1.8.4. e a ferramenta LogCombiner v1.8.0 onde são resumidas as informações de distância genética, espacial e temporal. Editada no programa FigTree v1.4. Em amarelo está o clado contendo as seqüências do AM (seis municípios) entre 03/Fev/2011 e 01/Jun/2016, obtidas no presente estudo. Em azul, seqüências de Manaus-AM, obtidas entre 14 e 29/Jan/2011, previamente depositadas no GenBank. Em verde um grande clado representando quase a totalidade das amostras brasileiras de DENV-4/GII analisadas neste estudo que se agrupam com a amostra HQ332176 (Venezuela, 2007)



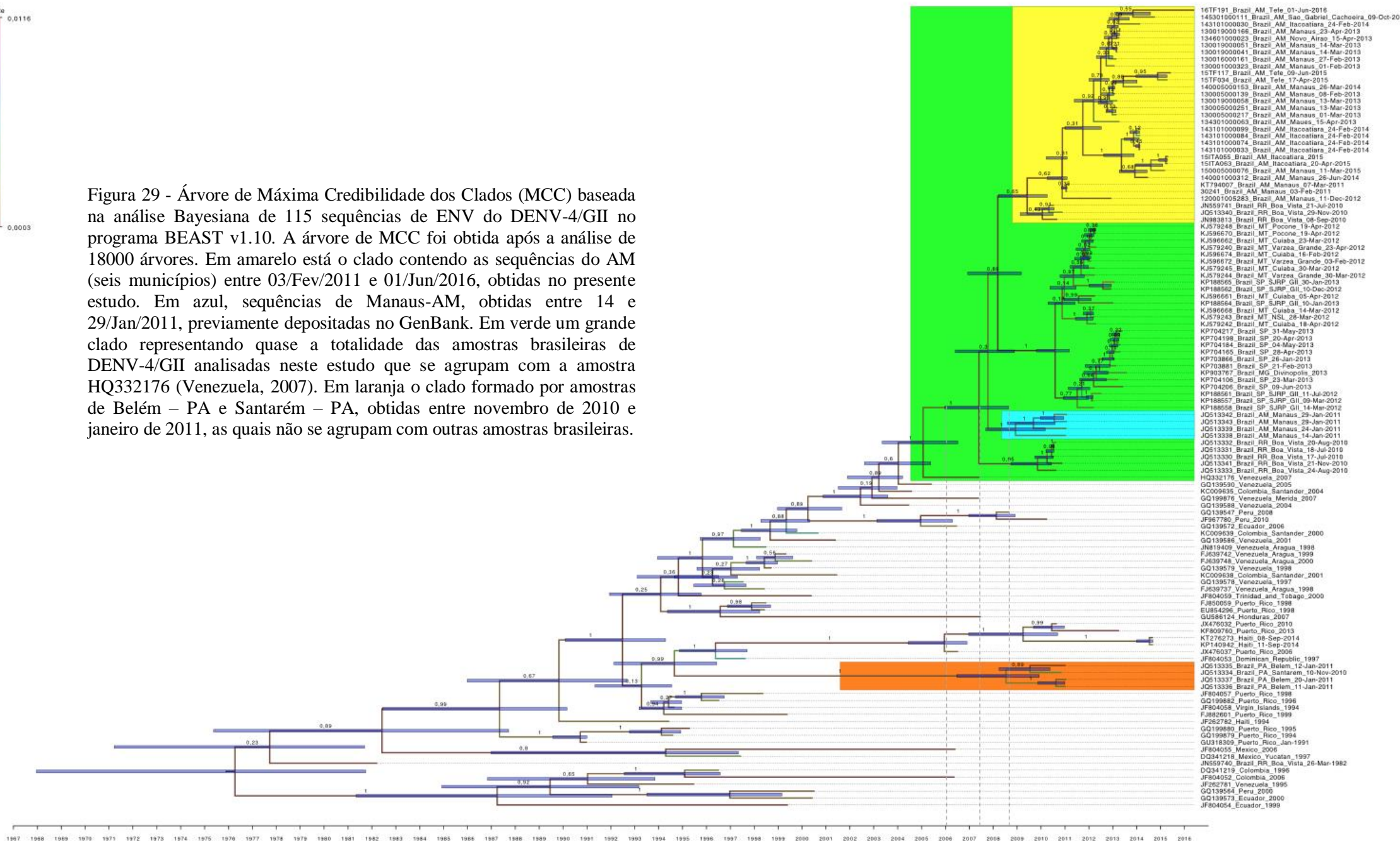
Através de outra análise filogeográfica utilizando o programa BEAST em sua versão mais recente (v1.10) avaliamos quatro diferentes modelos para o nosso conjunto de dados conforme sugerido no artigo de Drummond (2007): 1) GTR+CP+strict; 2) GTR+G+I+strict; 3) GTR+CP+UCLD e 4) GTR+G+I+UCLD. Após duas corridas (MCMC) com 10.000.000 passos cada uma, sendo as informações coletadas a cada 500 passos, os resultados dos valores de verossimilhança (*likelihood*) dos 4 modelos foram: 1) GTR+CP+strict = -3649.819; 2) GTR+G+I+strict = -3744.918; 3) GTR+CP+UCLD = -3648.741 e 4) GTR+G+I+UCLD = -3743.562, sendo assim decidimos prosseguir com o modelo de menor valor: **GTR+CP+UCLD = -3648.741.**

Após as análises iniciais de convergência avaliamos a taxa de substituição (*mean Rate*) cujo valor encontrado foi de $1,145 \times 10^{-3}$ ($7,7377 \times 10^{-4}$ - $1,6996 \times 10^{-3}$), sendo as taxas para cada posição nos códons: 2,3934 (2,1888 – 2,6218, CP3); 0,4157 (0,2515 – 0,6064, CP1) e 0,191 (0,082 – 0,3321, CP2). A estimativa da dispersão viral média do DENV-4 no Brasil (representada pelo parâmetro *location diffusion Rate*) foi de 175,979 [95% HPD interval 147,693 - 201,4358] Km/ano.

A árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC) foi obtida após a remoção de 10% das árvores iniciais (*bun-in*) no programa TreeAnnotator v1.10 e editada no programa FigTree v1.4.3 (Figura 29).



Figura 29 - Árvore de Máxima Credibilidade dos Clados (MCC) baseada na análise Bayesiana de 115 seqüências de ENV do DENV-4/GII no programa BEAST v1.10. A árvore de MCC foi obtida após a análise de 18000 árvores. Em amarelo está o clado contendo as seqüências do AM (seis municípios) entre 03/Fev/2011 e 01/Jun/2016, obtidas no presente estudo. Em azul, seqüências de Manaus-AM, obtidas entre 14 e 29/Jan/2011, previamente depositadas no GenBank. Em verde um grande clado representando quase a totalidade das amostras brasileiras de DENV-4/GII analisadas neste estudo que se agrupam com a amostra HQ332176 (Venezuela, 2007). Em laranja o clado formado por amostras de Belém – PA e Santarém – PA, obtidas entre novembro de 2010 e janeiro de 2011, as quais não se agrupam com outras amostras brasileiras.



5.5. Imunoensaio para detecção de IgG anti-dengue

Para estimar o número de infecções secundárias das amostras incluídas neste estudo realizamos a pesquisa de anticorpos IgG anti-dengue através de um kit comercial de ELISA de um total de 360 amostras, das quais 180 eram positivas para NS1 e 180 eram negativas para detecção do antígeno. Do total de amostras analisadas, 164 (45%) amostras foram reagentes para detecção de IgG, 141(39%) foram não reagentes e 55 (15,2%) foram indeterminadas. Em relação somente as 180 amostras NS1-positivas, 79 (43,9%) foram reagentes, 64 (35,6%) não reagentes e 37 (20,5%) indeterminadas. E das 180 amostras NS1-negativas, 85 (47,2%) foram reagentes, 77 (42,8%) não-reagentes e 18 (10%) indeterminadas (Figura 30).

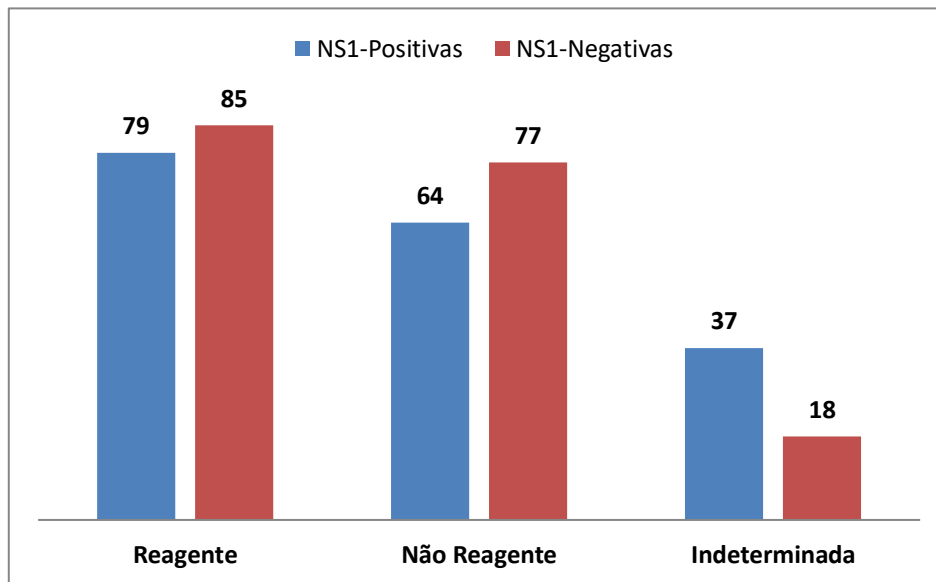


Figura 30 - Resultados da detecção de anticorpos IgG anti-DENV

Para avaliar a associação entre os resultados de sorologia IgG e de RT-qPCR, aplicamos o teste exato de Fisher's bi-caudal, no qual foi observado a existência de relação estatisticamente significativa ($p=0.0379$) entre eles. Também foi observada uma associação ainda maior entre os resultados de NS1 e de RT-qPCR ($p=0.0001$). No entanto, entre os resultados de NS1 e IgG não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.730$).

6. DISCUSSÃO

No Brasil, assim como em outros países, a dengue é considerada a arbovirose de maior importância em termos de saúde pública. Nas últimas décadas, as taxas de incidência da doença aumentaram consideravelmente nos países do continente americano, sendo observado um padrão endemo-epidêmico com surtos que se manifestam geralmente de cada 3 a 5 anos (DICK et al., 2012).

Eventos históricos da doença, incluindo a primeira confirmação laboratorial do DENV realizada no ano de 1982 em Boa Vista (RR), na qual foram identificados os sorotipos 1 e 4 (OSANAI, 1984), bem como o primeiro registro do DENV-4 em Manaus (AM) após 25 anos sem notificação deste sorotipo no país (FIGUEIREDO et al., 2008), e posteriormente a detecção da circulação simultânea dos quatro sorotipos no mesmo município em 2011 (BASTOS et al., 2012), reforçam a importância da vigilância molecular da dengue na região norte.

No entanto, para compreender melhor o processo de entrada e disseminação dos sorotipos do dengue em diferentes regiões geográficas ao longo do tempo, é importante também estudar o processo evolutivo dos vírus circulantes, a fim de identificar possíveis variações na sequência genética do vírus que possam estar associadas a uma melhor dispersão, agravamento dos casos ou até mesmo com falhas no diagnóstico.

No presente trabalho realizamos um estudo de evolução genética do sorotipo do dengue predominante nos municípios do Amazonas durante o período de 2011 a 2016. Para tal foram utilizadas amostras de soro de pacientes com suspeita de infecção por dengue que eram mantidas em um banco de amostras do Laboratório Central do Amazonas (LACEN-AM) e também amostras de RNA que faziam parte de um projeto coordenado pela Pesquisadora Regina Figueiredo, da Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

Após realizarmos a extração de RNA, as amostras foram submetidas ao RT-qPCR para a detecção do material genético viral. Este método foi utilizado inicialmente, pois permite analisar de forma mais rápida e simultaneamente um grande número de amostras. Um total de 608 amostras foram analisadas, das quais 181 (29,7%) foram positivas. Considerando

o envio dessas amostras dos municípios mais distantes até a capital, assim como o tempo de armazenamento, é possível que tais fatores possam ter contribuído para um menor número de amostras positivas, uma vez que o RNA é uma molécula instável e pode facilmente sofrer degradação (DETTOGNI; LOURO, 2017). Além disso, é importante considerarmos também a circulação de outros arbovírus na região (MOURÃO et al., 2015; NAVECA et al., 2017), já que estes podem causar sintomas que se assemelham aos da dengue.

Posteriormente, para identificação dos sorotipos utilizamos o protocolo de semi-nested PCR descrito por Lanciotti e colaboradores (1992). Este protocolo que já foi amplamente utilizado em diversos estudos (FIGUEIREDO et al., 2008; PINHO et al., 2015; MARTINS et al., 2014; NASCIMENTO; SOUZA; NAVECA, 2016; HERINGER et al., 2017), permitiu que detectássemos dentre as amostras analisadas, 80 amostras positivas para DENV-4, 7 para DENV-1 e 9 para DENV-2. Acreditamos que o maior número de amostras positivas no RT-qPCR em relação ao semi-nested PCR deve-se principalmente a maior sensibilidade deste primeiro método, já demonstrada em alguns estudos (DAGHER et al., 2004, NAGARAJ et al., 2006, GAMA et al., 2007), além de uma possível variação nos sítios de ligação dos iniciadores, uma vez que estes foram desenhados por Lanciotti ainda no início dos anos 1990.

Em nosso estudo não detectamos nenhuma amostra positiva para DENV-3, no entanto, outros trabalhos conduzidos entre 2011 e 2016 identificaram a circulação deste sorotipo em diferentes estados brasileiros, dentre eles, Mato Grosso (HEINEN et al., 2015), Bahia (CAMPOS et al., 2015) Minas Gerais (ANDRADE et al., 2016); Góias (ROCHA et al., 2017); e Ceará (RAMALHO et al., 2018). Mas com exceção do estudo realizado em Minas Gerais, onde o DENV-3 foi o sorotipo predominante, e no qual foi detectada a circulação dos genótipos I e III (ANDRADE et al., 2016), todos os outros tiveram poucas amostras positivas para este sorotipo, variando entre uma e três.

O DENV-3, que teve seu primeiro registro no Brasil em 2000, mais especificamente no estado do Rio de Janeiro, foi entre 2002 e 2006 o sorotipo mais prevalente em todo o país, sendo associado ao aumento expressivo no número de casos graves (NOGUEIRA et al., 2005). No Amazonas, em um estudo conduzido em Manaus entre 2006 e 2007, o aumento dos casos graves foi observado principalmente na faixa etária menor que 15 anos, com uma frequência de 66% das amostras positivas para DENV-3 (ROCHA; TAUIL, 2009). Um ano depois, ao serem investigados casos da doença em crianças de 0 a 10 anos, também residentes em Manaus, o DENV-3 foi o único sorotipo detectado (da COSTA; FAÇANHA, 2011).

Durante a circulação deste sorotipo no país os casos eram associados ao genótipo III, no entanto, durante as epidemias ocorridas na região norte entre 2002 e 2004, foram encontradas evidências da co-circulação de dois genótipos (III e V) (NOGUEIRA et., 2008).

De acordo com Allicock et al. (2012), um importante fator que pode contribuir para baixa frequência da circulação ou substituição de uma determinada linhagem que circulou por um longo período, é a presença de diferentes sorotipos ou genótipos na mesma região geográfica. A hiperendemicidade poderia levar a padrões complexos de competição seletiva, sendo influenciado pela suscetibilidade a respostas imunológicas cruzadas do hospedeiro a sorotipos, genótipos ou linhagens co-circulantes (ZHANG et al., 2005). Perfil este que inclusive já foi observado em Manaus em 2011, no qual os quatro sorotipos do dengue circularam simultaneamente (BASTOS et al., 2012).

No país, entre 2007 e 2009, o DENV-3 deixa de ser o sorotipo mais prevalente, sendo substituído pelo DENV-2, que ressurgiu causando uma série de casos graves no país (SALLES et al., 2018). Segundo Pollett et al. (2018) os sorotipos recém-introduzidos podem causar mudanças e deslocamento de sorotipos anteriormente dominantes, levando assim ao considerável aumento da diversidade do DENV.

Uma vez identificado o DENV-4 como sorotipo predominante dentre as amostras analisadas, direcionamos nossas análises mais robustas de sequenciamento e filogenia para este sorotipo. Para os demais sorotipos foi realizado apenas o sequenciamento da região do ENV com o intuito de identificar os principais genótipos que circularam na região.

Os dados gerados foram editados manualmente para a montagem dos contigs de cada amostra utilizando as sequências de referência disponíveis no GenBank. Infelizmente nem todas as sequências apresentaram eletroferogramas de boa qualidade, sendo, portanto necessário retirá-las das análises subsequentes.

DENV-1

A sequência de DENV-1 obtida neste estudo (16110401) coletada em maio de 2016 no município de Manaus foi identificada como pertencente ao genótipo V. Resultado que já esperado, uma vez que este genótipo tem sido o mais prevalente nas Américas nos últimos 40 anos (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2016). Ao fazermos a reconstrução filogenética da

amostra obtida neste estudo juntamente com isolados de outros estados e países da América, observamos que a amostra apresentou maior similaridade (99,6%) com uma cepa isolada na Argentina em fevereiro de 2016, durante um surto da doença no qual foi observada a circulação de duas linhagens distintas, uma originada na Venezuela em 1999 e a outra nas Ilhas Virgens Britânicas em 1984 (TITTARELLI et al., 2017). Além disso, a sequência de DENV-1 obtida em nosso estudo também apresentou estreita relação filogenética com outras duas cepas isoladas a partir de amostras humanas coletadas em 2009 em Roraima e uma amostra isolada de mosquito também em Roraima em 2010 (99,5%) (Figura 19).

No país o DENV-1 teve seu primeiro registro em 1981 no estado de Roraima, no entanto, somente a partir de 1986 ao ser introduzido no Rio de Janeiro atingindo mais de um milhão de indivíduos, a dengue passou a receber maior atenção. Com registros posteriores nos estados do Ceará e Alagoas em 1986 e em Pernambuco em 1987 (FARES et al., 2015). Durante alguns anos com a introdução dos sorotipos DENV-2 e DENV-3, o DENV-1 teve uma circulação baixa e silenciosa, no entanto, durante o surto ocorrido entre 2009 e 2011 duas novas linhagens circularam no sudeste do país (dos SANTOS et al., 2011).

Um estudo recente feito por Salles e colaboradores (2018), a partir dos dados dos órgãos de vigilância em saúde, mostra que desde 2010 o DENV-1 tem sido o sorotipo de maior incidência nas regiões brasileiras, com exceção das regiões norte e nordeste onde esse aumento ocorreu somente a partir de 2014. Dados que corroboram com nosso estudo, uma vez que das sete amostras positivas para DENV-1, duas foram coletadas no ano de 2015 e quatro em 2016.

DENV-2

No que diz respeito à sequência de DENV-2 (26712) obtida neste estudo, coletada em março de 2011 também no município de Manaus, nossas análises mostraram que a mesma pertence ao genótipo Asiático-Americano. Este resultado foi semelhante a outro estudo realizado também em Manaus no mesmo ano (MARTINS et al., 2014). Ao submetermos esta sequência à reconstrução filogenética juntamente com sequências representativas dos diferentes genótipos, isoladas em outros estados e países das Américas a mesma apresentou

estreita relação filogenética com duas cepas isoladas em São José do Rio Preto (SP) em junho de 2008 (Figura 21).

De acordo com a classificação genotípica feita por Chen & Vasilakis (2009) o genótipo Asiático/Americano inclui dois grandes subclados, o primeiro com todas as linhagens coletadas no Sudeste Asiático e o segundo com as cepas coletadas na América Central e do Sul e no Caribe nos últimos 30 anos. Esta última linhagem foi provavelmente introduzida do Vietnã em Cuba em 1981 sendo associada pela primeira vez no hemisfério ocidental com os quadros graves da doença (KOURI et al., 1989). A partir daí, as linhagens desse genótipo tem sido responsáveis pelo deslocamento de cepas menos virulentas em muitas regiões das Américas, levando a grandes epidemias com aumento da patogenicidade (WATTS et al., 1999; WILLIAMS et al., 2014).

No Brasil os principais surtos causados pelo DENV-2 ocorreram em 1990, inicialmente no Rio de Janeiro, se espalhando posteriormente para os outros estados, e nos anos de 1998 e 2007-2008 em todo país. Oliveira et al. (2010) buscando investigar o parentesco entre os isolados obtidos nesses períodos, observaram que as cepas de DENV-2 isoladas durante a epidemia de 1998 foram agrupadas com sequências da epidemia de 1990, sugerindo que os vírus circulantes nestes dois períodos epidêmicos pertencem à mesma linhagem da cepa DENV-2 originalmente encontrada no estado do Rio de Janeiro. Já as sequências da epidemia de 2007/2008 representaram na árvore filogenética um grupo monofilético, mostrando uma circulação temporal de vírus geneticamente diferentes no Rio de Janeiro, que pode ser resultado da evolução local do DENV-2, ou mesmo da introdução de uma nova linhagem de DENV-2 na região.

De acordo com outro estudo, no qual foram comparadas as sequências obtidas em 2008 no município de São José do Rio Preto com sequências de diferentes genótipos DENV-2, foi observada a existência de três linhagens de DENV-2 bem apoiadas no país. A primeira (BR1) incluindo linhagens brasileiras isoladas em 1998 e 2000 e cepas da Venezuela, Colômbia e Porto Rico, isoladas de 1990 a 1998. A linhagem BR2 que contém cepas isoladas de 2000 a 2006, na região norte do país, intimamente relacionadas com cepas isoladas em 1998 em Porto Rico. E por fim a linhagem BR3 que inclui juntamente com duas cepas da região Norte as 12 sequências de DENV-2 isoladas em São José do Rio Preto (DRUMOND et al., 2013). Duas dessas sequências (KP188550 e KT43859) são as mesmas que mostraram maior proximidade filogenética com a sequência obtida em nosso estudo.

DENV-4

Na análise filogenética das 27 sequências de ENV de DENV-4 coletadas entre os anos de 2011 a 2016 em sete municípios do Amazonas (Itacoatiara, Manaus, Maúes, Novo Airão, São Gabriel da Cachoeira e Tefé) identificamos somente à circulação do genótipo II (Figura 23). Este resultado foi semelhante não só com outros estudos realizados na região norte (NUNES et al., 2012; MARTINS et al., 2014; NASCIMENTO; SOUZA; NAVECA, 2016), mas também com os de outras regiões do país (de SOUZA et al., 2011; BRANCO et al., 2015; COLOMBO et al., 2016; VILLABONA-ARENAS et al., 2016; HERINGER et al., 2017).

De acordo com a literatura o genótipo II circula nas Américas desde sua introdução no Caribe, na década de 1980, a partir do sudeste da Ásia (FOSTER et al., 2003). Estudos mostram que após a introdução no continente americano este genótipo foi o responsável por vários surtos em muitos países do Caribe e da América do Sul (SHU et al., 2009; FORSHEY et al., 2009; FERNÁNDEZ et al., 2011). No Brasil, o primeiro registro do vírus foi feito em 1982 (OSANAI et al. 1984), e de acordo com a análise filogenética feita por Nunes et al. (2012) o genótipo II teria emergido e reemergido no Brasil por mais de 3 origens distintas (Sudeste da Ásia, região do Caribe e Venezuela).

Apesar de identificarmos somente a presença do genótipo II, alguns estudos mostraram também a circulação do genótipo I, ambos de origem Asiática (De MELO; ROMANO; ZANOTTO, 2009; FIGUEIREDO et al., 2011). Nunes et al. (2012) por sua vez identificaram no país a circulação simultânea dos dois genótipos (GI e GII). Em seu estudo foram analisadas amostras de 2010-2011 dos estados do Pará, Amazonas, Roraima e Bahia. O genótipo I foi detectado de um isolado de paciente febril autóctone em 2011 em Salvador, demonstrando, que ao menos naquele período, houve a circulação deste genótipo na capital da Bahia. Já as amostras coletadas nos outros estados eram pertencentes ao genótipo II.

Com o intuito de identificarmos uma possível relação dos DENV-4 GII obtidos neste estudo como os de outros estados brasileiros e de outros países do continente Americano, alinhamos as 27 sequências de ENV com outras 164 sequências não redundantes. Observamos a formação de dois grupos principais com relação às amostras oriundas da região Norte do país. Em um deles se agruparam as sequências obtidas neste estudo juntamente com quase todas as amostras brasileiras, e no outro grupo as sequências JN559740 isolada em março de 1982 em Boa Vista (RR), JQ513334 isolada em novembro de 2010 em Santarém e das

amostras JQ513335, JQ513336 e JQ513337 isoladas em janeiro de 2011 em Belém (PA) obtidas no estudo de Nunes et al. (2012) (Figura 25).

Um segundo alinhamento contendo 115 sequências representativas de estados brasileiros e também de diferentes países das Américas, coletadas entre 1982 e 2016 foi realizado. De acordo com os nossos resultados, duas introduções distintas do genótipo II de DENV-4 ocorreram no Amazonas a partir de 2008. A primeira delas incluindo as sequências obtidas em Roraima no ano 2010 e no Amazonas em 2011. E a segunda incluindo as 27 sequências de DENV-4 obtidas neste estudo do período de 2011 a 2016 e outras sequências do Amazonas e Roraima. Por algum motivo desconhecido as quatro sequências obtidas dos municípios de Santarém e Belém nos anos de 2010 e 2011 não se agruparam com as demais cepas brasileiras, mostrando maior proximidade com cepas da República Dominicana (1997), Porto Rico (2006, 2010, 2013) e Haiti (2014) (Figura 28).

Durante a análise da taxa de substituição em cada um dos códons das sequências obtidas neste estudo realizada com o software Tracer v1.6, observamos que a taxa de substituição na terceira posição códon foi maior que no primeiro, que por sua vez foi maior que o segundo. Tal fenômeno é o esperado para sequências codificantes, uma vez que as mudanças em terceiras posições raramente afetam a sequência proteica deduzida. Além disso, durante a estimativa de sítios sobre seleção positiva (diversificadora) ou negativa (purificadora) (dN/dS), feito com o procedimento “*Renaissance Counting*” foram encontrados apenas três sítios (149, 412 e 461) com seleção neutra. Todos os outros mostraram forte seleção negativa.

No estudo de Villabona-Arenas et al (2016) as substituições nucleotídicas também foram na sua maioria no terceiro códon, onde a partir da taxa geral de substituições foi sugerido seleção purificadora significativa principalmente em quatro sítios (92, 133, 184 e 225) localizados nos domínios centrais e de dimerização da proteína.

Assim como a maioria dos vírus RNA, os vírus da dengue geralmente são encontrados sob forte seleção purificadora, e embora se tenha havido a hipótese de que esse processo de seleção contribua para a extinção e substituição de linhagens, nenhum estudo demonstrou explicitamente o papel da seleção negativa no deslocamento de linhagem ou na extinção da variante dentro da linhagem (POLLETT et al., 2018).

Durante a análise das 27 sequências de ENV, foi identificado entre elas um total de 140 sítios de variação nucleotídica, que resultaram em oito trocas de aminoácidos, três

localizadas no domínio II da proteína de envelope e cinco no domínio III. Alterações na glicoproteína E são consideradas de suma importância, uma vez que a mesma é responsável por mediar a entrada do vírus na célula assim como induzir a resposta imune protetora ao estimular a produção de anticorpos (WEAVER; VASILAKIS 2009). Além disso, é sugerido que o domínio III contenha resíduos envolvidos no tropismo e virulência entre os flavívirus. Um importante estudo desenvolvido por Leitmeyer et al. (1999) mostrou que a mutação N390D no domínio III, tinha potencial determinante de virulência no genótipo Americano de DENV-2.

Através de outra análise de detecção de seleção episódica no conjunto de sequências obtidas neste estudo realizada com o programa MEME foi encontrada evidência de seleção positiva na posição do códon 157 do ENV (Asn157Thr, p-value = 0.08, default threshold = 0.1), no entanto, este resultado difere do obtido com o procedimento “*Renaissance Counting*”. Utilizando a mesma ferramenta Martin et al (2016) analisou as linhagens de DENV-4 circulantes em Porto Rico, e identificou seleção positiva nos códons 111 (Val111Ile) do capsídeo e no códon 3345 do gene NS5 (Val3345Ala).

Em relação às 25 sequências NS1 obtidas neste estudo, observamos entre elas 91 sítios de variação que resultaram na troca de sete de aminoácidos. Três dessas trocas de aminoácidos foram identificadas somente nas amostras 143101000074, 143101000084 e 143101000099, todas oriundas do município de Itacoatiara. As substituições nucleotídicas ocorreram nas posições 3216 (T→A), 3249 (G→A) e 3393(T→A) levando a troca de Valina por Metionina (Val1039Met), Ácido aspártico por Asparagina (Asp1064Asn) e de Leucina para Isoleucina (Leu1098Ile), respectivamente.

De acordo com alguns estudos a proteína NS1 tem um papel essencial como co-fator na replicação viral (MACKENZIE et al., 1996; CHUANG et al., 2013; AMORIM et al., 2014), o que mostra a importância de determinar se a diferença de aminoácidos, entre as cepas estudadas, afeta a antigenicidade e atividade biológica da NS1 (Dos SANTOS et al., 2002). No estudo de Suzuki et al. (2007) durante criação de um cDNA infeccioso a partir de cepa protótipo brasileira de DENV-1, foi observado que o resíduo Y (Tirosina) na posição 247 de NS1, altamente conservado nos DENV-1, pode ser importante para função da NS1. Esta posição foi modificada somente na representante da linhagem 1b, onde a tirosina (Y) foi substituída por uma fenilalanina (F), sendo conservada nas demais linhagens.

Somente duas amostras NS1-Negativas (30241 e 130001000323), coletadas em Manaus, puderam ser sequenciadas. Ao compararmos essas duas sequências com as outras obtidas neste estudo, observamos que ambas apresentaram somente duas substituições de nucleotídeos. Infelizmente o baixo número de sequências NS1- Negativas impossibilitou uma análise genética mais aprofundada que pudesse relacionar a presença de mutações com a falha na detecção do antígeno NS1.

Uma vez que alguns estudos demonstram que a baixa sensibilidade do teste NS1 pode estar associada aos casos de infecções secundárias (FRY et al., 2011; ACOSTA et al., 2014), nós submetemos um total de 360 amostras (180 NS1-positivas e 180 NS1-negativas) a pesquisa de anticorpos IgG pelo método de ELISA. Ao analisarmos essas amostras observamos que os dois grupos apresentaram resultados muito semelhantes quanto a presença de IgG (NS1-Positivas=43,9% e NS1-Negativos=47,2%).

Quando analisadas a relação entre os resultados de IgG e de RT-qPCR através do teste exato de Fisher's bi-caudal, observamos a existência de uma relação estatisticamente significativa ($p=0.0379$), assim como na relação entre os resultados de NS1 e RT-qPCR ($p=0.0001$). No entanto, entre os resultados de NS1 e IgG não observamos diferença estatisticamente significativa ($p=0.7308$). Resultado que foi distinto ao obtido por Hang e colaboradores (2016), no qual a presença de IgG anti-DENV nas amostras analisadas em dois ensaios distintos foi associada a uma redução significativa ($P < 0,001$) na sensibilidade de NS1.

O sequenciamento dos DENV isolados no Amazonas permitiu não somente a identificação dos sorotipo/genótipos que circulam na região, mas também a identificação mutações que são específicas das linhagens circulantes no estado, que podem contribuir para sua contínua circulação na região e seu potencial epidêmico. Este estudo demonstra a importância de estudos moleculares para o entendimento da origem e evolução do vírus dengue, sinalizando para a possível utilização dos mesmos, como ferramenta de predição de epidemias em programas de vigilância epidemiológica.

7. CONCLUSÃO

- 1- Durante o período de 2011 a 2016 os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 circularam no Amazonas.
- 2- As amostras de DENV-1 (2016) e DENV-2 (2011) isolados em Manaus pertenciam ao Genótipo V e Asiático/Americano, respectivamente.
- 3- As 27 sequências de ENV e 25 de NS1 de DENV-4 foram obtidas sete municípios: Itacoatiara, Maúes, Manaus, Novo Airão, São Gabriel da Cachoeira e Tefé.
- 4- A análise filogenética a partir do gene ENV dos DENV-4 que circularam no estado do Amazonas durante os anos de 2011 a 2016, mostrou que todos pertencem ao genótipo II.
- 5- Na análise de todos os isolados a pressão evolucionária foi seleção purificadora. No entanto uma evidência de seleção positiva foi encontrada na posição do códon 157 do ENV utilizando a ferramenta Mixed Effects Model of Evolution (MEME).
- 6- Não foi possível estabelecer uma relação entre mutações no gene NS1 e a falha na detecção do antígeno, devido o baixo número de sequências obtidas de amostras NS1-Negativas.
- 7- Ao relacionarmos os resultados de IgG e RT-qPCR, e de NS1 e RT-qPCR observamos relação estatisticamente significativa. Com exceção dos resultados de NS1 e IgG, onde não houve diferença.

8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, P. O. A. et al. False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by ns1 ag kits. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* v. 56, n: 5, 447-450, 2014.
- ALLICOCK, O. M. et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Mol Biol Evol.*; 29(6):1533-43, 2012.
- AMARASINGHE, A. et al. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg Infect Dis.* 17(8): 1349-54, 2011.
- AMORIM, J. H, et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Research* 181, 53–60, 2014.
- ANDRADE, E. H. P. et al. Spatial–Temporal Co-Circulation of Dengue Virus 1, 2, 3, and 4 Associated with Coinfection Cases in a Hyperendemic Area of Brazil: A 4-Week Survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 94(5), pp. 1080–1084, 2016.
- ANDRIES, A. et al. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimen. *BMC Infectious Diseases*, 16: 20, 2016.
- ANOOP, M. et al. Complete genome sequencing and evolutionary analysis of dengue virus serotype 1 isolates from an outbreak in Kerala, South India. *Virus Genes*, 45:1–13, 2012.
- ARGIMÓN, S. et al. Microreact: visualização e compartilhamento de dados para epidemiologia genômica . *Microb Genom.* 2(11):doi:10.1099/mgen.0.000093. 2016.
- ARYATI, A. et al. Performance of commercial dengue NS1 ELISA and molecular analysis of NS1 gene of dengue viruses obtained during surveillance in Indonesia. *Infectious Diseases*, 13:611, 2013.
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *The Journal of Experimental Medicine*, 22 March 2010.

BARRETO, M. L; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos avançados*. 22 (64), 2008.

BASTOS, M. de S. et al. Simultaneous circulation o fall four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45 (3): 393-394, May-jun, 2012.

BOLLATI, M. et al. Structure and functionally in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Research*, vol 87: 125-148, August 2010.

BRANCO, M. S. et al. Dengue in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010-2012. *Trop Med Int Health*. 20(12):1707-10. Dec 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Fundação Nacional de Saúde.– Brasília: 2002.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. Ministério da Saúde– Brasília, 5. ed. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de vigilância em saúde. Boletim epidemiológico: volume 49, N° 2 – 2018.

BRUYCKER-NOGUEIRA, F. de. et al. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution* 45, 454–460, 2016.

CAMPOS, G. S. et al. Dengue Virus 4 (DENV-4) Re-Emerges after 30 Years in Brazil: Cocirculation of DENV-2, DENV-3, and DENV-4 in Bahia. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 68, 45–49, 2015.

CDC (Centers for Disease Control e Prevencion). Dengue > Epidemiology, 2017, disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>. Acesso em: 27 de Março de 2017.

CHEN, R; VASILAKIS, N. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses*. 3, 1562-1608, 2011.

CHUANG, Yung-Chun. et al. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 20:42, 2013.

COLOMBO, T. E. et al. Dengue virus surveillance: Detection of DENV-4 in the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. *ActaTropica* 164, 84–89, 2016.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):155-70, Mar 2015.

DAGHER, H. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods.* 117(2):113-21, May 2004.

DETTOGNI, R. S; LOURO, I. D. Desafios da extração do RNA do vírus da dengue (ligação e extração ao DNA: métodos, aplicações e limitações). ResearchGate, Chapter January 2017.

De CASTRO, D. B. et al. Dengue epidemic typology and risk factors for extensive epidemic in Amazonas state, Brazil, 2010–2011. *BMC Public Health.* 18:356, 2018.

Da COSTA, C. A; FAÇANHA, G. P. Sorotipos virais de dengue identificados em crianças de Manaus, Estado do Amazonas, 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 44(2) :249-251, Mar-Abr, 2011.

De MELO, F. L; ROMANO, C. M, ZANOTTO, P. M. d. A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis.* 3(4): e 390, 2009.

De SOUZA, R.P. et al. Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(12): e1439, 2011.

DICK, O. B, et al. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87(4), pp. 584–593, 2012.

Dos SANTOS, C.N. et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Research.* 90(1-2):197-205, 2002.

Dos SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology Journal.* 8:387, 2011.

DUSSART, P. et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clinical and Vaccine Immunology.* 13, 2006, 1185-1189

DRUMMOND, A. J, et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4, e88, 2006.

DRUMMOND, A. J; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214, 2007.

DRUMMOND, B. P. et al. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/ Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. *PLoS ONE.* 8(3): e 59422, 2013.

FARES, R. C. G, et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *BioMed Research Internacional.* ID: 321873, 2015.

FELIX, A. C, et al. Low Sensitivity of NS1 Protein Tests Evidenced during a Dengue Type 2 Virus Outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clinical and Vaccine Immunology.* 19(12): 1972–1976, Dec 2012.

FIGUEIREDO, L.T.M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina, Ribeirão Preto,* 32: 15-20, jan./mar. 1999.

FIGUEIREDO, R. M. P. de. et al. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 37 (6); 476-479, Nov-Dez 2004.

FIGUEIREDO, R. M. P. de. et al. Dengue vírus type 4, Manaus, Brazil. *Emerging infectious diseases,* v. 14, n. 4, p. 667–9, Abr 2008.

FIGUEIREDO, R. M. P. et al. – Coinfection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 53(6): 321-3, 2011.

FORSHEY, B. M. et al. Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. *Emerg Infect Dis.* 15 (11):1815-8, Nov 2009.

FOSTER, J. E. et al. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology.* 306, 126–134, 2003.

FVS- Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas. Boletim de Vigilância em Saúde, 2016.

FRY, S. R, et al. The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. *Plos Neglected Tropical Disease*. 5, June 2011.

GAMA, B. E. et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol*. 116(4):427-32, Aug 2007.

GAUNT, M. W, et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*. 82, 1867–1876, 2001.

GEBHARD L. G, FILOMATORI C. V, GAMARNIK A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 3(9):1739-56, Sep 2011.

GÓMEZ-DANTÉS, H; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 25, Sup1:S19-S31, 2009.

GURUKUMAR, K. R, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology Journal*. 6:10, 2009.

GÚZMAN, M. G; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. 8; 69-80, 2004.

GÚZMAN. M. G. et al. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 4(8): e 811, 2010.

GÚZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (12): S7-16, DEC 2010.

GÚZMAN, M. G. et al. Dengue infection. *Nature Reviews/ Disease Primers*. v2, 2016.

GLUBER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 11, No. 3: 480–496, July 1998.

HANG, V. T. et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v3, January 2009.

HARRIS, E, et al. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Journal of clinical Microbiology*, p. 2634–263, Sept. 1998.

HEINEN, L. B. S, et al. Dengue outbreak in Mato Grosso State, Midwestern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 57(6): 489-496, 2015.

HERINGER, M. et al. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region. *BMC Infectious Diseases*. 17:410 2017.

HOLMES, E C; BURCH, S S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*. 8 (2):74–7, 2000.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus *Infection*. *Genetics and Evolution*, 2003.

HUMPHREYS, G. O.; WILLSHAW, G. A.; ANDERSON, E. S. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochimica et biophysica acta*. v. 383, n. 4, p. 457–463, 1975.

IBGE, 2015. Disponível em: WWW.ibge.gov.br/apps/população/projecao/, acesso em: 05 Janeiro de 2016.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. *Journal of General Virology* 40, 531-544, Set 1978.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*. 72(1), 73, 1998.

KOURI, G.P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: Lessons from the cuban epidemic, 1981. *Bull. World Health Org*. 67, 375–380, 1989.

KUMAR, S. R. et al. Evolution, dispersal and replacement of american genotype dengue type 2 viruses in India (1956–2005): Selection pressure and molecular clock analyses. *J. Gen. Virol.* 91, 707–720, 2010.

LANCIOTTI, Robert S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* p. 545-55, Mar, 1992.

LAUGHLIN, C. A, et al. Dengue Research Opportunities in the Americas. *The Journal Infections Disease.* 012:206, October 2012.

LEMEY, P. et al. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular biology and evolution.* 27:1877-1885, 2010.

LEMEY, P. A. et al. A counting renaissance: combining stochastic mapping and empirical Bayes to quickly detect amino acid sites under positive selection. *Bioinformatics.* 28, 3248-3256, 2012.

LIMA, M. R. Q. et al. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. *Plos Neglected Tropical Disease.* Vol4, July 2010.

MARTIN, E. et al. Insights into the molecular evolution of Dengue virus type 4 in PuertoRico over two decades of emergence. *Virus Research,* 213, 23–31, 2016.

MARTINS, V. d. C. et al. Clinical and Virological Descriptive Study in the 2011 Outbreak of Dengue in the Amazonas, Brazil. *PLoS ONE,* 9(6): e100535, 2014.

MARTINEZ-TORRES, M. E. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Marti, 180p, 1990.

MACKENZIE, J. M; JONES, M. K; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. *Virology,* 220, 232–240, 1996.

MEDINA, F. et al. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*, 15D.2.1-15D.2.24, November 2012.

MEIRA, R. “Urucubaca” gripe ou dengue? Dengue. In: _____. *Clínica médica*. São Paulo: Gráfica O Estado de S. Paulo, 1916. p.273-85.

MELINO, S; PACI, M. et al. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS Journal*. 2986-3002, 2007.

MOURÃO, M. P. G. et al. - Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(Suppl I): 20-26, 2015.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R. J; ROSSMANN, M. G. A. Structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews/ Microbiology*. Vol 3, January 2005.

MULLER, D. A; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*. 98, 192–208, 2013.

NASCIMENTO, V. A. do; SOUZA, V. C de, NAVECA, F. G. Complete genome of a dengue virus serotype 4 strain from Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Vol. 111(2): 141-143, February 2016.

NATURE, Education. Disponível em: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-transmission-22399758>, acesso: 27/03/2017.

NAGARAJ, T. et al. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol*. 36(1):17-23, May 2006.

NAVECA, F. G. et al. Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. *Journal of virology*. V. 86, n. 3, p. 1897–8, Fev. 2012.

NAVECA, F. G. et al. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Vol. 112(7): 510-513, July 2017.

NETO, R. J. Pires, et al. Molecular epidemiology of type 1 e 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38: 843-852.

NOGUEIRA, R. M. R; ARAÚJO, J. M. G; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica*, 22(5):358–63, 2007.

NOGUEIRA, M. B. et al. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the northern region of Brazil during the 2002–2004 epidemics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 103, 483–488, 2008.

NUNES, M. R. T. et al. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 18, No. 11, November 2012.

OLIVEIRA, M. F. et al. Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 16, No. 3, March 2010.

OOI, E; GLUBER, D. J. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25 Sup 1: S115-S124, 2008.

OSANAI, C. H. A epidemia de dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981-1982. Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, 1984.

PARIDA, M. et al. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. p. 2895–2903, June 2005.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnosis tests: dengue. *Nature Reviews/ Microbiology*. December 2010.

PEDRO, A. O dengue em Niteroi. *Brazil-Médico*, v.1, n.13, p.173-7, 1923.

FRIEBE, P; HARRIS, E. Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol*. 90(Pt 3):687-92, Mar 2009.

- POLLETT, S. et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. *Infect Genet Evol.* 25; 62:279-295. April 2018.
- POLONI, T. R. et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology Journal.* 7: 20, 2000.
- PINHO, A. C. O. et al. Asian genotypes of dengue virus 4 in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 143, 3114–3117, 2015.
- RAMIREZ, A. et al. Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: Diversification, rates and population dynamics. *Viol. J.* 7, 329, 2010.
- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 174, 479–493, 1990.
- ROCHA, L. A; TAUIL, P. L. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 42(1):18-22, Jan-Fev, 2009.
- ROCHA, B. A. M. et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. *Infectious Diseases of Poverty.* 6:116, 2017.
- ROSEN, L, et al. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 603–615, 1985.
- SILVA, F G da, et al. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1- dengue - São Paulo. *BEPA.* 8 (91):14-26, 2011.
- SALAZAR, M. I. et al. The role of cell proteins in dengue virus infection. *Journal of Proteomics.* Vol 111, 6–15, Dec 2014.
- SALLES, T. S, et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & Vectors.* 11:264, 2018.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467, 1977.

SANTOS, N; ROMANOS, Mtv; WIGG M.D. *Introdução à virologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed.; 2002.

SUN, P; KOCHHEL, T. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal*. ID 843469, 11 pages, 2013.

Secretária de Estado Saúde do Amazonas (SUSAM). Departamento de Planejamento e Gestão. *Plano Estadual de Saúde-PES 2012-2015*, 2015.

SRIKIATKHACHORN, A; MATHEW, A; ROTHMAN, A. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol*. 39:563–574, 2017.

TANG, K. F; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10 (8), 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 1: S7-S18, 2009.

TITTARELLI, E. et al. Dengue Virus 1 Outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 23, No. 10, October 2017.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol. Biol. Evol.* 20, 122–129. 2009.

RAMALHO, I. L. C. et al. Dengue 4 in Ceará, Brazil: characterisation of epidemiological and laboratorial aspects and causes of death during the first epidemic in the state. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 113(11): e180320, 2018.

SHAMALA, DS. Laboratory Diagnosis of Dengue: A Review. *The Internacional Medical Journal Malaysia*. 14-1, June 2015.

SHU, P; HUANG, J. Current Advances in Dengue Diagnosis. Clinical and diagnostic laboratory immunology. Vol. 11, No. 4, p. 642–650, July 2004.

SUZUKI, R. et al. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology*. 362, 374–383, 2007.

VASILAKIS, N. et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue-2 viruses. *J. Virol.* 81, 9591–9595, 2007.

VILLABONA-ARENAS, C. J. et al. Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. *Peer J*, 4: e1892, 2016.

WANG, E, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* 74, 3227–3234, 2000.

WATTS, D. M. et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 354(9188):1431-4, Oct 23. 1999.

WEAVER, S. C; 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*. 9, 523–540, 2009.

WILLIAMS, M. et al. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 Is Associated with a Severe Dengue Outbreak in the Peruvian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91(3), pp. 611–620, 2014.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. 5, 518-528, July 2007.

WHO. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. New edition. Ed. [s. 1] WHO Library Cataloguing-in- Publication. Data: 2009.

WHO. Dengue and severe dengue. Fact sheet, Updated July 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 14 de Janeiro de 2017.

WU-HSIEH, B. A; YEN, Y. T; CHEN, H. Dengue Hemorrhage in a Mouse Model. *Annals of the New York academy of sciences*. 1171: E42–E47, 2009.

YOUNG, P. R, et al. An antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 38, 3, 1053-1057, March 2000.

ZANOTTO, P. M. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 548–553, 1996.

ZHANG, C. et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J. Virol.* 79, 15123–15130, 2005.