



Universidade Federal do ABC

Juliana Sá Teles de Oliveira Molina

**Diagnóstico e tipagem molecular dos vírus da Dengue de
uma população de SP notificada com Febre da Dengue
por critério clínico epidemiológico**

SANTO ANDRÉ - SP

2017

Juliana Sá Teles de Oliveira Molina

**Diagnóstico e tipagem molecular dos vírus da Dengue de
uma população de SP notificada com Febre da Dengue
por critério clínico epidemiológico**

TCC apresentado à Universidade Federal do ABC
como requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança
Centro de Ciências Naturais e Humanas
Universidade Federal do ABC

SANTO ANDRÉ

2017

Ficha Catalográfica

Molina, Juliana Sá Teles de Oliveira

Diagnóstico e tipagem molecular dos vírus da Dengue de uma população de SP notificada com Febre da Dengue por critério clínico epidemiológico / Juliana Sá Teles de Oliveira Molina. — 2017.

38 fls. : il.

Orientadora: Márcia Aparecida Sperança

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André, 2017.

1. Dengue. 2. diagnóstico molecular. 3. proteína pré-membrana. I. Sperança, Márcia Aparecida. II. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2017. III. Título.

Juliana Sá Teles de Oliveira Molina

**Diagnóstico e tipagem molecular dos vírus da Dengue de
uma população de SP notificada com Febre da Dengue
por critério clínico epidemiológico**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Aparecida Sperança (UFABC)

Dra. Andreia Moreira dos Santos Carmo (Instituto Adolfo Lutz)

Dra. Aline Diniz Cabral (UFABC)

I. SUMÁRIO

I. SUMÁRIO	i
II. RESUMO.....	ii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
1.1. Contextualização.....	1
1.2. Aspectos Gerais do Vírus da Dengue.....	3
1.3. Imunopatologia.....	5
1.4. Epidemiologia.....	8
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Amostras de Plasma Humano	13
3.2. Extração de RNA de Plasma Humano, Diagnóstico e Tipagem Molecular dos Vírus da Dengue.....	13
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

II. RESUMO

O vírus dengue (DENV) pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, agente etiológico da Dengue e suas formas mais severas, Dengue com sinais de alarme e Dengue grave, é atualmente o arbovírus mais prevalente no mundo. Existem quatro sorotipos de DENV geneticamente distintos, DENV 1-4, transmitidos naturalmente aos humanos pela fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*. As causas das formas graves da doença ainda não são totalmente conhecidas, mas sabe-se que estão associadas à co-circulação de diferentes sorotipos do vírus, infecções secundárias por estirpes geneticamente distintas, às características genéticas dos vírus e dos hospedeiros, além da capacidade de dispersão e adaptação do vetor, resultando em epidemias com atributos regionais. No interior do Estado de São Paulo, cidades de médio porte, como Marília, têm sido acometidas por epidemias de Dengue. A cidade de Marília possui alto fluxo populacional e migrações de todo o território nacional devido às suas atividades sociais e econômicas. Para evitar ou minimizar as epidemias causadas pelos DENV é necessário monitorar a circulação dos vírus e a presença de vetores em uma comunidade para o conhecimento da área onde ocorre a transmissão, quais sorotipos estão circulando e que tipo de doença está associado aos tipos circulantes. Portanto, esse projeto tem por objetivo investigar os sorotipos e subtipos dos vírus da dengue circulantes na maior epidemia da cidade, ocorrida no ano de 2015. Para tanto, utilizamos 200 amostras de plasma de pacientes sintomáticos com diagnóstico clínico epidemiológico e notificação compulsória de infecção por dengue, submetidos a hemograma no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília para controle dos níveis de plaquetas durante a epidemia. O RNA total extraído das amostras de plasma foi utilizado em reação de RT/PCR e *nested*-PCR para detecção e tipagem dos DENV por amplificação de um fragmento do gene que codifica a proteína do capsídeo (C) e pré-membrana (prM) do vírus. Os fragmentos obtidos tiveram tamanho correspondente ao DENV1, o qual foi confirmado por sequenciamento e comparação com sequências disponíveis no banco de dados - GenBank. Espera-se que o conhecimento das características genéticas dos DENV circulantes associadas às características epidemiológicas da população da cidade de Marília-SP acometida por DENV possa contribuir para o melhor manejo de Dengue na cidade.

Palavras-chave: Dengue, diagnóstico molecular, proteína pré-membrana (prM).

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Contextualização

Atualmente, a dengue se constitui em uma das mais importantes arboviroses humanas do Brasil, assim como nos demais países tropicais e subtropicais, caracterizando um grave problema de saúde pública. Trata-se de uma infecção viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo seu principal vetor no Brasil, a espécie *Aedes aegypti*. Sua transmissão se dá pela ocorrência da picada de fêmeas desses mosquitos quando infectados pelo vírus, não havendo transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem mesmo por intermédio de fontes de água ou alimento (Brasil, 2014). Seu agente etiológico é o arbovírus Dengue do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (*international committee on taxonomy of viruses* - ICVT). São conhecidos, até o momento, quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV): DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4 (Brasil, 2016).

Em relação ao quadro clínico da doença, incluem-se formas assintomáticas, sintomas inespecíficos, os quais podem ser diagnosticados como uma gripe ou outras viroses comuns, sendo suas manifestações clássicas: febre alta de início repentino, cefaléia, mialgia, prostração, dor retroorbital, náuseas, vômitos e exantema, e suas formas mais críticas denominadas Dengue com sinais de alarme e Dengue grave, em que ocorre um agravamento geral do quadro, com aparecimento de manifestações hemorrágicas graves, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e colapso circulatório, podendo evoluir ao óbito (Brasil, 2016).

Apesar de muitos estudos já desenvolvidos, ainda não há conclusões a respeito das reais causas que determinam o progresso das formas severas da doença. Estudos indicam

que a gravidade da doença pode estar relacionada com as características individuais dos pacientes, tais como idade, geralmente mais grave para crianças e idosos, pois esses podem apresentar menor capacidade de reagir ao extravasamento capilar, exibindo maior risco de choque da dengue; presença de enfermidades crônicas (asma brônquica, *diabetes mellitus*, anemia falciforme, entre outras) e virulência da cepa infectante (Rocha, 2011; Clyde et al., 2006; Brasil, 2014). Outros estudos apontam que o maior risco de desenvolvimento das formas graves acontece em casos de infecção secundária heterotípica, onde a resposta imunológica transcorre de forma exacerbada, levando a manifestações hemorrágicas e colapso circulatório, no entanto há relatos também de dengue grave para casos de infecção primária (Halstead, 1993).

No Brasil, em uma pesquisa recente, foram estimados os gastos nos setores públicos e privados com a Dengue, atingindo valores de US\$ 468 milhões, apenas no período de 2012 a 2013 (Martelli et al., 2015). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO do inglês *World Health Organization*), estudos indicam estimativas de 50 a 100 milhões de casos de Dengue no mundo por ano (WHO, 2012). Porém, estudos mais recentes, baseados em dados coletados nos últimos 40 anos (1960 a 2012), apresentaram estimativas de 390 milhões de casos anuais, incluindo cerca de 96 milhões de casos não confirmados da doença (Bhatt et al., 2013).

Portanto, considerando os impactos sociais e econômicos que a dengue acarreta, mais estudos acerca desta doença são necessários, incluindo seu agente etiológico e seus aspectos epidemiológicos, buscando o conhecimento e melhoria nas ações de prevenção e estratégia de controle da dengue nas regiões acometidas.

1.2. Aspectos Gerais do Vírus da Dengue

Os DENVs compreendem uma partícula esférica de 40-50 nm em diâmetro, com um envelope de lipopolissacarídeo. O genoma de RNA de orientação positiva apresenta 11 Kb, o qual produz uma única poliproteína que é processada e codifica três proteínas estruturais (envelope ó E, pré-membrana ó prM e capsídeo ó C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Além das sequências que codificam a poliproteína, o genoma viral possui sequências não traduzidas reguladoras nas extremidades 5' e 3' e que estão envolvidas, respectivamente, no processo de tradução e replicação do vírus (Alvarez, Lodeiro et al., 2005; Yu, Nomaguchi et al., 2008).

A maior proteína estrutural é a glicoproteína do envelope com 500 aminoácidos, peso molecular de aproximadamente 53 Kilodaltons (kDa), que apresenta três domínios antigênicos com propriedade de ligação a receptores, hemaglutinação de eritrócitos e de indução de anticorpos neutralizantes e protetores (Halstead, 2008). Possui importante papel na entrada do vírus na célula hospedeira e é o maior alvo da resposta imune humoral (Mason, Pincus et al., 1991).

A segunda proteína estrutural é produzida em forma imatura, prM, sendo uma glicoproteína com 26 kDa. A prM desempenha um importante papel no dobramento correto da proteína E, impedindo seu rearranjo devido à presença de ácidos. As proteínas prM e a glicoproteína E estão inseridas no envelope do vírus através de domínios transmembranosos (Chambers et al., 1990; Lindenbach & Rice, 2001).

A proteína do Capsídeo é uma pequena proteína bastante alcalina, com aproximadamente 11 kDa, que juntamente com o genoma viral constitui o nucleocapsídeo.

É uma importante proteína na resolução da organização do vírus, onde mutações que afetam sua formação reduzem a montagem viral (Samsa et al., 2012).

A proteína NS1 é uma glicoproteína com 46 kDa, que desempenha um papel importante na replicação viral, podendo ser encontrada no interior do retículo endoplasmático (RE) ou de forma livre (solúvel) no meio extracelular (Samsa et al., 2012; Lindenbach & Rice, 2001).

A proteína NS2A é uma proteína integral de membrana com 22 kDa, cuja principal função é participar da replicação do RNA. A NS2A apresenta 5 (cinco) hélices transmembranas, onde a região N-terminal encontra-se no lúmen do RE e a região C-terminal encontra-se no citoplasma (Xie et al., 2013).

A proteína NS2B é uma proteína associada à membrana com 14 kDa, que age como cofator essencial da protease NS3, recrutando-a para a membrana do RE. Acredita-se que a NS2B contém duas hélices transmembranas na região N-terminal seguida por um domínio citoplasmático hidrofílico e uma região C-terminal associada à membrana (Huang et al., 2011).

A proteína NS3, com 69 kDa, apresenta muitas funções, desempenhando atividades como helicase (promovendo a abertura da hélice de DNA), RNA trifosfatase (RTPase - promove a clivagem da ligação 5' terminal - fosfoanidrido de moléculas de m-RNA) e Nucleotídeo Trifosfatase (NTPase) (Chambers et al., 1990). O terço N-terminal da NS3 associado ao cofator NS2B possui atividade de serina protease e está envolvida no processamento da poliproteína viral, sendo denominada NS2B-NS3pro (Falgout, Pethel et al., 1991; Wengler, Czaya et al., 1991; Chambers et al., 1993; Assenberg et al., 2009).

A proteína NS4A é uma proteína integral de membrana com 16 kDa, enquanto que a proteína NS4B apresenta 30 kDa. Ambas podem ser encontradas em associação com a NS3

e com o RNA viral, formando focos citoplasmáticos distintos, que são, possivelmente, sítios de replicação de RNA (Miller et al., 2007).

A proteína NS5 com peso molecular de 105 kDa é altamente conservada, desempenhando função como RNA polimerase dependente de RNA e é encontrada no citoplasma (Chambers et al., 1990).

1.3. Imunopatologia

Após a picada do mosquito do gênero *Aedes* infectado por DENV em humanos, o período de incubação da infecção, que geralmente varia de 4 a 6 dias, pode ser modificado pelas proteínas da glândula salivar do inseto. Na pele, o vírus infecta células dendríticas imaturas através de receptor ICAM3 não específico, descrito como sendo parte dos receptores de lecitina tipo C, específicos de manose. Há também evidência de abundante replicação de DENV em células hepáticas parenquimais e em macrófagos nos linfonodos, fígado e baço, bem como em monócitos sanguíneos periferais (Kliks et al., 1988). Autópsias realizadas em indivíduos que apresentaram Dengue com sinais de alarme e Dengue grave demonstraram também a presença de DENV em células do pulmão, timo e cérebro (Martina et al., 2009).

Dados laboratoriais associados com a Dengue incluem neutropenia seguido por linfocitose, frequentemente com a presença de linfócitos atípicos. Os níveis de enzimas hepáticas no soro podem ser elevados, porém a elevação é usualmente branda. É comum a trombocitopenia. Em alguns pacientes a alanina e a aspartato aminotransferases podem atingir níveis de 500-1000 unidades/L. Em uma epidemia de DENV-4, 54% dos pacientes confirmados para dengue tiveram essas enzimas com níveis elevados e 34% tiveram menos de 100.000 plaquetas/mm³ (Dietz et al., 1996). Modificações hemostáticas nas formas

graves da doença envolvem três fatores: mudanças vasculares, trombocitopenia e desordens na coagulação. Todos os pacientes com dengue hemorrágica têm fragilidade vascular aumentada e podem ter coagulogramas anormais, indicando coagulação intravascular disseminada, o que é também evidenciado por um tempo parcial de tromplastina prolongado, decréscimo no nível de fibrinogênio e aumento no nível de produtos de degradação do fibrinogênio (WHO, 1996). Os diferentes achados laboratoriais, associados às diferentes manifestações clínicas da dengue, têm sido relacionados a variações genéticas dos tipos virais (Franco et al., 2011), as características genéticas e sociais dos hospedeiros humanos (Blanton et al., 2008) e à imunopatologia decorrente de infecções secundárias por diferentes sorotipos dos vírus (Halstead, 1993).

O início da resposta imune específica celular e humoral ocorre com a apresentação dos antígenos virais pelas células dendríticas infectadas que maturam e migram para o linfonodo regional (Navarro-Sanchez et al., 2003). A infecção por um sorotipo de dengue produz imunidade contra esse tipo e não há proteção cruzada com os outros sorotipos (Gubler, 1998).

As funções biológicas da resposta humoral protetora contra os vírus da dengue são determinadas *in vitro* e consistem na neutralização da replicação viral, citólise mediada por complemento e citotoxicidade celular mediada por anticorpo. Entretanto, após a exposição previa a um dos sorotipos da dengue, quando ocorre a infecção por um novo sorotipo, as imunoglobulinas IgG pré-formadas e recém-formadas seriam adsorvidas ao novo tipo viral, porém sem neutralizá-lo, formando imunocomplexos que ativariam os produtos de clivagem do sistema complemento C3a e C5a, aumentando a permeabilidade capilar e modulando uma resposta inflamatória exagerada (Gibbons & Vaughn, 2002). Macrófagos e monócitos participam do processo de exacerbação da resposta imune dependente de

anticorpos, *in vitro* e *in vivo* (Kliks et al., 1988). Esse fenômeno é descrito pela teoria do aumento da resposta imune dependente de anticorpo, cuja sigla ADE vem do termo original em inglês "antibody dependent enhancement" (Costa et al., 2014), assim, a co-circulação dos quatro DENV em uma população pode aumentar o fenômeno de ADE.

Todos os flavivirus possuem epítopos comuns na proteína do envelope que resulta em reação cruzada nos testes sorológicos (Gubler, 1998). Tanto os anticorpos neutralizantes, como os anticorpos heterólogos envolvidos na resposta ADE anti-dengue produzidos, geralmente são direcionados contra as proteínas estruturais E e prM e contra a proteína não estrutural NS1 (Rothman, 2004). A proteína NS1 é secretada pelas células infectadas por DENV e os níveis presentes no soro estão relacionados com a Dengue com sinais de alarme e Dengue grave (Kurosu et al., 2007).

A proteína NS3 também é imunogênica e tem sido associada ao desencadeamento da resposta imune celular citotóxica (Lobigs et al., 1994). Assim como na resposta humoral, células T CD8+ de memória, produzidas a partir da exposição a um sorotipo específico de DENV, reconhecem antígenos de outros sorotipos de DENV, e mesmo de outros flavivirus (Kurane et al., 1991). A resposta celular anti-dengue também pode estar relacionada com a imunopatologia da dengue presente na Dengue com sinais de alarme através da inibição de mediadores antivirais (INF- γ) e do estímulo de citocinas pró-inflamatórias como a IL10 e TNF-1 α (Rothman, 2004; Martina et al., 2009).

Como exemplo da imunopatologia do dengue decorrente de infecção secundária, estudos realizados em Cuba demonstraram que os DENV produzem diferentes síndromes condicionadas à idade e características imunológicas da população, associadas às diferenças genéticas dos vírus. Assim, durante as infecções iniciais de dengue, a maioria das crianças

apresenta sintomas subclínicos e indiferenciados comuns a outras viroses. Durante as infecções secundárias, a patofisiologia da doença é modificada devido a infecções sequenciais, nas quais o DENV1 é seguido por DENV2 ou DENV3, ou quando as infecções são seguidas de DENV3 e DENV2 (Guzman et al., 1990, 2000; Alvarez et al., 2006), podendo resultar em permeabilidade vascular aguda presente nas formas graves.

Devido às características patofisiológicas das doenças causadas pelos DENV, sua relação com as características genéticas e imunológicas da população humana e também aos diferentes genótipos virais, o conhecimento das variantes genéticas dos sorotipos virais circulantes em uma região tem importantes implicações para a introdução de vacinas na análise das interações biológicas entre o vírus vacinal, os vírus em circulação e as doenças produzidas na população humana. O mesmo pode ser levado em consideração para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológicos, os quais devem incluir amostras de vírus idênticas ou similares aos vírus circulantes.

1.4. Epidemiologia

A dengue é endêmica no Sudeste da Ásia, onde a Dengue com sinais de alarme e a Dengue grave, desde 1950, causaram muitas mortes, principalmente na população infantil. No continente americano, desde o século XIX são descritas epidemias de dengue nas regiões do Caribe e dos Estados Unidos com vários surtos entre 1920 e 1950, onde o primeiro sorotipo foi isolado em Trinidad em 1953 (Solomon & Mallewa, 2001).

Com o advento da globalização e o aumento das viagens aéreas, houve elevações drásticas nos índices de incidência, distribuição e severidade clínica da doença, devido à circulação endêmica de múltiplos sorotipos (DENV- 1, 2, 3 e 4) em uma mesma localidade, particularmente nas Américas do Sul e Central (Gibbons & Vaughn, 2002).

Segundo levantamento epidemiológico realizado no período de 1981 a 2002, o Brasil foi acometido por aproximadamente 70% dos casos de dengue notificados nas Américas (Siqueira et al., 2005). De acordo com esse estudo, entre os anos de 1981 e 1993, a epidemia se deu em áreas específicas, sendo que em 1981 foram reportados DENV-1 e DENV-4 no Estado de Roraima (norte do país). Em 1986, houve a entrada do DENV-1 no estado do Rio de Janeiro, onde, em 1990, houve a entrada de DENV-2, sendo confirmados casos de Dengue com sinais de alarme. No período de 1994 a 2002, o vírus circulou de forma endêmica e epidêmica, com importante dispersão do *Ae. aegypti* no Estado do Rio de Janeiro, resultando em 534.000 casos registrados em 1998 e aproximadamente 794.000 casos em 2002.

No estado de São Paulo, o início da transmissão de dengue ocorreu em 1987, com a identificação de DENV-1, onde foram registrados 46 casos. Em 1997, notificou-se a introdução de DENV-2 e em 2002, DENV-3, com circulação simultânea dos três sorotipos (Centro de vigilância Epidemiológica de SP, 2010). De acordo com o Instituto Adolfo Lutz, em 2011, o sorotipo DENV-4 foi notificado em São José do Rio Preto (SP). O sequenciamento e a análise filogenética do vírus demonstraram que o DENV-4 isolado é análogo às cepas de DENV-4 circulantes na América.

A característica epidemiológica da dengue, especialmente no Estado de São Paulo, em relação à concentração de casos em centros urbanos vem sendo alterada com aumento da incidência em municípios de pequeno e médio porte. Em 2007, municípios com população menor que 100.000 habitantes notificaram 52% dos casos, enquanto que 16% das notificações ocorreram em municípios com população entre 100.000 e 500.000 habitantes (Brasil, 2007).

O monitoramento da circulação dos vírus da dengue no Estado de São Paulo é realizado pelas unidades do Instituto Adolfo Lutz, o qual faz parte dos Laboratórios Centrais do Estado (LACEN). De acordo com o centro de vigilância epidemiológica do Estado de São Paulo, a confirmação da doença é feita pelo critério laboratorial (sorologia e/ou isolamento viral, excepcionalmente, por PCR e/ou Imuno-histoquímica), até que a incidência atinja 150 casos/100.000 habitantes em cidades com população entre 150.000-249.999 habitantes. Após essa incidência, utiliza-se o critério clínico-epidemiológico, onde os casos com sintomas compatíveis com dengue são notificados como tal, sem a confirmação laboratorial. Nesse caso, só são analisados laboratorialmente os casos de Dengue com sinais de alarme e Dengue grave (Centro de vigilância Epidemiológica de SP, 2010).

Nesse panorama epidemiológico está a cidade de Marília, localizada no oeste paulista, distante 450 km da capital, com a população estimada em 233.639 habitantes, segundo dados do IBGE (2016), apresentando um grande fluxo populacional devido às atividades econômicas e sociais da cidade.

Os surtos de dengue iniciaram em Marília no ano de 1996 e desde então, apenas nos anos de 2004 e 2006 não houve casos registrados da doença (Centro de vigilância Epidemiológica de SP, INFORME TÉCNICO, 2006). As maiores epidemias da cidade ocorreram nos anos de 2000 (468 casos; 230 casos/100.000 habitantes), 2007 (1110 casos; 550 casos/100.000 habitantes), 2010 (945 casos, 500 casos/100.000 habitantes), 2014 (1613 casos, 700 casos/100000) e 2015 (10202 casos, 4370 casos/100.000 habitantes). Desde 2000, ocorre a circulação de mais de um sorotipo viral e até o ano de 2007, as maiores epidemias foram seguidas da introdução de novos sorotipos de vírus. Em 2007, a cidade apresentou os primeiros casos de Dengue grave, porém não houve informações sobre a

entrada de novos sorotipos virais. No ano de 2015, o Estado de São Paulo foi acometido pela maior epidemia de dengue da América Latina e na cidade de Marília, foi a pior epidemia ocorrida até hoje, com 4370 casos/100.000 habitantes (Centro de vigilância Epidemiológica de SP, INFORME TÉCNICO, 2016).

Conforme descrito, a circulação dos vírus da dengue no Brasil e no Estado de São Paulo ocorre há mais de 30 anos, com aumento no número de casos e da gravidade dos mesmos, a cada epidemia, nos locais acometidos. Dentre os fatores associados à maior ocorrência de casos graves de dengue, destacam-se: infecção secundária por vírus com sorotipo diferente ao da primeira infecção, características genéticas dos vírus e imunidade da população acometida (Simmons, Farrar et al. 2012).

Assim, a evolução dos vírus da dengue e as doenças a eles associadas ocorre regionalmente dependendo das características genéticas e do fluxo migratório da população humana e de mosquitos. Sendo o Brasil um país de dimensões continentais, seria muito importante para a saúde pública, o estudo da dinâmica de transmissão da dengue em locais onde ocorrem epidemias frequentes e que apresentam grande fluxo populacional devido as suas atividades sociais e econômicas, como a cidade de Marília, São Paulo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a ocorrência da dengue e caracterizar a situação epidemiológica da população da cidade de Marília - São Paulo, no ano de 2015.

2.2. Objetivos Específicos

- Confirmar por análise molecular o diagnóstico das amostras sorológicas dos pacientes diagnosticados por critério clínico epidemiológico em 2015 na cidade de Marília (SP);
- Analisar os tipos virais presentes e circulantes na população estudada;
- Comparar com banco de dados disponíveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de Plasma Humano

As amostras de plasma humano utilizadas no estudo foram obtidas durante o período de epidemia de dengue ocorrida de fevereiro a março de 2015, abrangendo indivíduos com sintomas agudos de dengue, encaminhados ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Marília, após terem sido atendidos nas unidades do sistema único de saúde e/ou no Hospital das Clínicas de Marília. De cada paciente foi colhida uma amostra de sangue para realização de hemograma para controle de plaquetas e o plasma foi congelado para utilização neste estudo. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília sob o número 069/03, e está registrado na plataforma Brasil com o título: "Investigação epidemiológica da febre da dengue em uma cidade hiperendêmica no oeste paulista". Como durante a epidemia o número de ocorrências atingiu mais de 150 casos/100.000 habitantes, todos os pacientes com sintomas de dengue foram notificados, incluindo-se os casos diagnosticados por critério clínico-epidemiológico.

3.2. Extração de RNA de Plasma Humano, Diagnóstico e Tipagem Molecular dos Vírus da Dengue

Foram analisadas 200 amostras de plasma sanguíneo, as quais foram, primeiramente, submetidas à extração de RNA com a aplicação do *Mini-Kit RNA Purelink da Invitrogen*, segundo instruções do fornecedor. De cada amostra foram utilizados 200 μ l de plasma e após o processo de extração de RNA, 5 μ l do RNA total obtido foi utilizado em Reação de Transcrição Reversa, com o emprego da enzima transcriptase reversa M-MLV

da empresa *Invitrogen* e de 0,5 μ l de *primer* D2 a 100 μ M, de acordo com as instruções do fabricante. Para obtenção do diagnóstico molecular e tipagem dos vírus da dengue, o DNA complementar (cDNA) obtido foi utilizado em Reação em Cadeia de Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), conforme a metodologia apresentada por Lanciotti et al., 1992 (Lanciotti, Calisher et al., 1992). A técnica baseia-se na amplificação de um fragmento de 511 pb correspondente à junção do gene que codifica a proteína do Capsídeo viral e do gene responsável pela codificação da proteína Pré-membrana (C/prM) (Figura 1).



Figura 1 ó Posições genômicas das proteínas estruturais e não estruturais do vírus da Dengue (adaptado de https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi_dengue)

Todo o procedimento foi realizado com o emprego da enzima *Taq DNA polimerase Platinum*, da *Invitrogen*, e dos *primers* D1 e D2. As reações foram feitas em um volume final de 25 μ l, com tampão de enzima presente no kit comercial na concentração de 1X, 200 μ M de dNTPs, 1 unidade de enzima, 1 μ l de cada um dos oligonucleotídeos a 10 μ M e 2 μ l do cDNA produzido. As condições da reação foram 1 ciclo por 3 minutos a 94°C; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 ciclo por 1 minuto a 55°C; 1 ciclo por 1 minuto a 72°C e, por fim, 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram diluídos com 49 μ l de água e 1 μ l foi utilizado na técnica de *Nested PCR multiplex*, utilizando os *primers* D1 e TS1, TS2, TS3 e DEN4 (Quadro1), para amplificar fragmentos de 482 pb, 119 pb, 290 pb e 389 bp, que correspondem,

respectivamente, aos DENV1, 2, 3 e 4. As reações foram feitas em um volume final de 25 μ L, com tampão de enzima presente no kit comercial na concentração de 1X, 200 μ M de dNTPs, 1 unidade de enzima e 1 μ L de cada um dos oligonucleotídeos a 10 μ M. O procedimento foi realizado com as seguintes condições: 1 ciclo por 3 minutos a 94°C; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 ciclo por 30 segundos a 55°C; 1 ciclo por 30 segundos a 72°C e, por fim, 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

Os produtos finais da PCR e da *Nested*-PCR foram corados com *Gelred* (10 μ g/mL) da *Biotion* e analisados por eletroforese em gel de agarose com concentração de 1%. Depois foram fotografados em sistema de análise de imagem da Kodak. Os *amplicons* positivos foram sequenciados pelo método de Sanger, utilizando o *Big Dye Terminator versão 3.1* (ABI de Foster City, CA) e *primer* D1, conforme as especificações do fabricante. As reações de sequenciamento foram enviadas para análise pelo Centro de sequenciamento do Instituto de Química da USP - SP. A especificidade das sequências obtidas foi investigada por estudo comparativo pelo programa *Blast* no site do *GenBank* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Quadro 1 ó Oligonucleotídeos (*primers*) utilizados neste estudo (adaptado de Lanciotti *et al.*, 1992)

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Região Genômica</i>	<i>Sorotipo</i>
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACC-3'	C/prM	Todos
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	C/prM	Todos
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	C/prM	DENV1
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	C/prM	DENV2
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	C/prM	DENV3
Den4	5'-TGTTGTCTTAAACAAGAGAGG-3'	C/prM	DENV4

4. RESULTADOS

Das 200 amostras de plasma de pacientes analisadas, 80 amostras (40%) foram positivas e 120 (60%) foram negativas para DENV por RT-PCR (figura 2). De acordo com Lanciotti et al., 1992, o tamanho do fragmento esperado para o vírus da Dengue é de 511 pb, o qual corresponde a junção de parte da proteína do Capsídeo viral e parte da proteína Pré-membrana (C/prM), com a utilização dos *primers* D1 e D2. A figura 2 corresponde aos produtos finais da PCR, que foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, onde a imagem foi obtida após exposição à luz ultravioleta e fotografada pelo sistema de análise de imagem da Kodak. As linhas numeradas de 1 a 10 correspondem às amostras de plasma de diferentes pacientes.

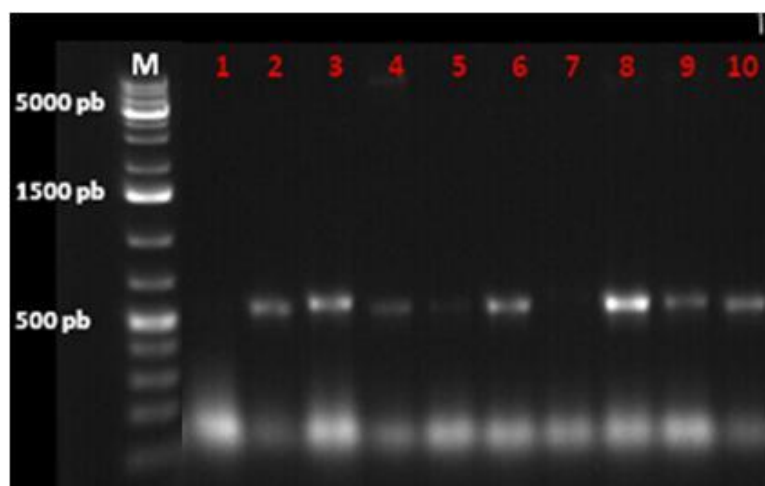


Figura 2 - Diagnóstico molecular do vírus da Dengue: linhas 2 a 6 e 8 a 10: amostras positivas e linhas 1 e 7: amostras negativas. M: Marcador de peso molecular.

A sorotipagem das amostras por *Nested-PCR* revelou que o sorotipo presente nas amostras estudadas corresponde apenas ao sorotipo 1 - DENV1 (482 pb) (figura 3). Posteriormente, tal resultado foi confirmado pelo sequenciamento do fragmento C/prM.

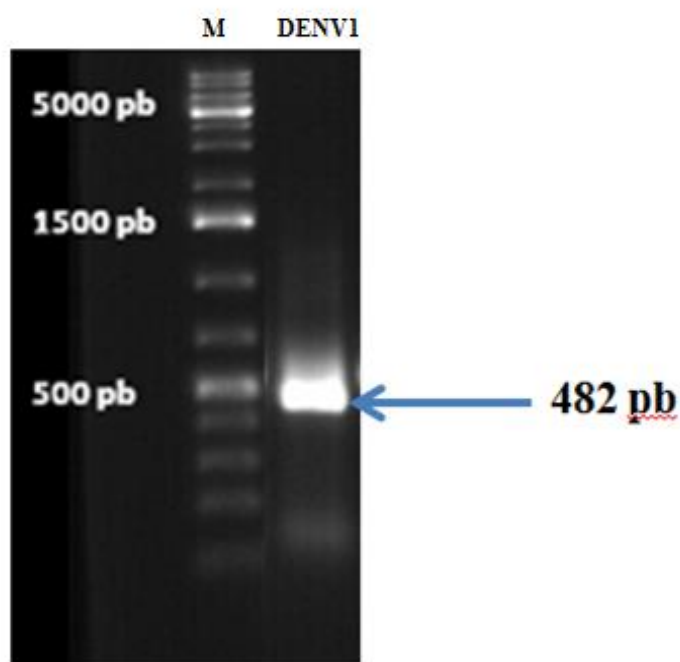


Figura 3 - Identificação do Sorotipo de DENV por *nested-PCR*. Gel de agarose a 1% contendo produto de *Nested-PCR* corado com Gelred, realizado a partir do produto de PCR referente ao fragmento C/prM, para tipagem dos vírus da dengue. M: Marcador de peso molecular; DENV1: Sorotipo 1 (482 pb).

Após estudo comparativo com as sequências disponíveis no GenBank, todos os fragmentos de PCR estudados apresentaram maior homologia com a sequência de DENV1 isolado na cidade de São José do Rio Preto, no ano de 2013. As sequências dos fragmentos de PCR correspondentes ao DENV1, de maior relevância, estão representadas na Figura 4.

Figura 4 - Sequências dos fragmentos de PCR obtidas com os oligonucleotídeos correspondentes à proteína prM dos vírus da Dengue.

Amostra 1F A01_001

```

5' TGACGAGAGCGCGCGCGCGGACAACATGAGTGCAACACTCCATACTCATGCTGGAGAAAAAATGACTTAAAGAAAACGGTTAACAGTAGTTGAAAAAGAAG
|-----|
0
3 ACTGCTCTCGCGCGCGCGCGCTTTGATACTCACGTTGTGAGGTATGAGTACAGACCTCTTTTTTTAACTGAATTTCTTTGCCAAATGTCATCAACTTTTTCTTC
|-----|
0
5 GGAATTTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGTTTCAAAAAGGGGATCTCAAGCATGTTGAACATAATAACAGGAGGAAAAAG
|-----|
0
3 CCTTAAACCGATCTACCTCGAGTAAGTTCTTCTACCTCGCTAGTTTCACGATGCCCAAAGTTTTTCCCTAGAGTTCGTACAACCTGTATTATTTGCTCCTCTTTC
|-----|
0
5 ATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCCTTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGGCCACATATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTAC
|-----|
0
3 TAGGCACTGGTACGAGGAGTACGACGACGGGTGTCGGGACCGGAAGGTAACATGATGTGCTCCCCCTCTCGGTGTATACTATCAGTCGTTTCGTCCTTCTCTTCAGTG
|-----|
0
5 TCTTGTTTAAGACCTCTGTAGGTGTCACATGTGCACCTCTCATCGTATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACTAATGCCCCGGATCACTGAGGCG
|-----|
0
3 AGAACAAATCTGAGAGCATCCACAGTTGTACACGTGAGAGTAGCGATACTAAACCCCTCAATACACTCCTGTGTACTGGATGATTACGGGGGCTAGTGACTCCGC
|-----|
0
5 GAACGTGAAAACAGAGGAAAAAACAACAA
|-----|
0
3 CTTGCACTTTTGTCTCCCTTTTTTTTGT
|-----|
0

```

Amostra 2F B01_003

```

5' GGGACAGACGAGGGACGGAGACGGGGAAATGCGAAGACTTGACTGTTGGTGCAAAGGACCCATGAAATGGGTATGGCTTTCATAGCATTTCTAAGATTTCTAGCCATA
|-----|
0
3 CCCTGTCTGCTCCCTGCTCTGCCCTTACGCTTCTGAACCTGACAAACACGTTTCTCGGTACTTTAAACCAATACCGAAAGATATCGTAAAGATTTCTAAGATCGGTAT
|-----|
0
5 CCCCCAACAGCAGGAATTTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGTTTCAAAAAGGAGATCTCAAGCATGTTGAACACAATAAA
|-----|
0
3 GGGGGTGTGTCCTTAAACCGATCTACCTCGAGTAAGTTCTTCTACCTCGCTAGTTTCAOGATGOCCCAAAGTTTTTCTCTAGAGTTCGTACAACCTGTGTATTATT
|-----|
0
5 CAGGAGGAAAAGATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCCTTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGGCCACATATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAA
|-----|
0
3 GTCTCCTTTTCTAGGCACTGGTACGAGGAGTACGACGACGGGTGTCGGGACCGGAAGGTAACATGATGTGCTCCCCCTCTCGGTGTATACTATCAGTCGTTCTGCTCTT
|-----|
0
5 GAGGAAAGTCACTCTTGTTTAAGACCTCTGTAGGTGTCACATGTGCACTCTCATCGCTATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGG
|-----|
0
3 CTCTTTTCAAGTGAACAATAATCTGAGAGCATCCACAGTTGTACACGTGAGAGTAGCGATACTAAACCCCTCAATACACTCCTGTGTTACTGGATGTTACGGGGGCC
|-----|
0
5 ATCACTGAGGCGGAACCTGGAGACATGACTGTTTGGTGCAA
|-----|
0
3 TAGTGACTCCGCTTGGACCTCTGTACTGACAAACACGTTT
|-----|
0

```

Amostra 3F C01_005

```

5' CCGCCAGGCGGCACGCGCAGAGGCCACCAACGAAACTTTGACTGTTGGTGCAAAGGACCCATGAAATGGTGAAGGCTTTCATAGCATTTCTAAGATTTCTAGCCATAAC
|-----|
0
3 GCGGTCGCGCGTGGCTCTCGGGTGGTGTCTTTGAAACTGACAACACGTTTCTCGGTACTTTAAOACTTCCGAAAGTATCGTAAAGATTTCTAAGATCGGTATGG
|-----|
0
5 CCCAACAGCAGGAATTTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGTGCTACGGGTTTCAAAAAGGAGATCTCAAGCATGTTGAACATAATAACA
|-----|
0
3 GGGTGTGTCCTTAAACCGATCTACCTCGAGTAAGTTCTTCTACCTCGCTAGTTTCACGATGCCCAAAGTTTTTCTCTAGAGTTCGTACAACCTGTATTATTTGT
|-----|
0
5 GGAGGAAAAGATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCCTTCCATTTGACTACACGAGGGGGAGGCCACATATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGA
|-----|
0
3 CCTCCTTTTCTAGGCACTGGTACGAGGAGTACGACGACGGGTGTCGGGACCGGAAGGTAACATGATGTGCTCCCCCTCTCGGTGTATACTATCAGTCGTTCTGCTCTTCT
|-----|
0
5 GGAAGTCACTCTTGTTTAAGACCTCTGTAGGTGTCACATGTGCACCTCTCATCGCTATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGGAT
|-----|
0
3 CCTTTCAAGTGAACAATAATCTGAGAGCATCCACAGTTGTACACGTGAGAGTAGCGATACTAAACCCCTCAATACACTCCTGTGTTACTGGATGTTTACGGGGCCTA
|-----|
0
5 CACTGAGGCGGAACCTGAAGACATGACTGTTTGGTGCAA
|-----|
0
3 GTGACTCCGCTTGGACTTCTGTAACGACAAACACGTTT
|-----|
0

```

5. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, a dengue se tornou um dos principais problemas de saúde pública no Brasil, devido aos extensos impactos sociais e econômicos que são causados no país. Pode-se afirmar que se trata de uma doença bastante negligenciada, em razão do grande número de casos que ainda ocorrem no mundo, cerca de 390 milhões de casos por ano, segundo Bhatt et al. (2013), somados à estimativa de 3,9 bilhões de pessoas que estão sujeitas ao risco de infecção por vírus da dengue, em pelo menos 128 países (WHO, 2017). No Brasil, desde 1990, causou mais de 6 mil mortes, onde apenas no ano de 2015, houve 986 mortes, e no ano de 2016, 642 mortes (Brasil, 2017).

Desde 1987, no estado de São Paulo, a dengue exibe um padrão epidemiológico, que é caracterizado por períodos de baixa transmissão intercalados com episódios de epidemias, as quais geralmente estão relacionadas à modificação do sorotipo predominante e/ou à entrada de um novo sorotipo (figura 5). Outros aspectos significativos para a saúde pública consistem no tempo de duração das epidemias das formas graves, as quais podem permanecer por até seis meses durante o período de clima quente e úmido, época mais favorável à proliferação dos vetores, e nas características clínicas e epidemiológicas regionais específicas (Rocha, 2011).

A história da dengue na cidade de Marília é caracterizada por períodos de maior ou menor intensidade, onde, desde 2007, a doença ocorre de forma contínua, apresentando as maiores epidemias nos anos de 2007, 2010, 2014 e 2015 (Tabela 1). Até o presente momento, o ano de 2015 foi marcado pela pior epidemia ocorrida no estado de São Paulo, assim como na cidade de Marília.

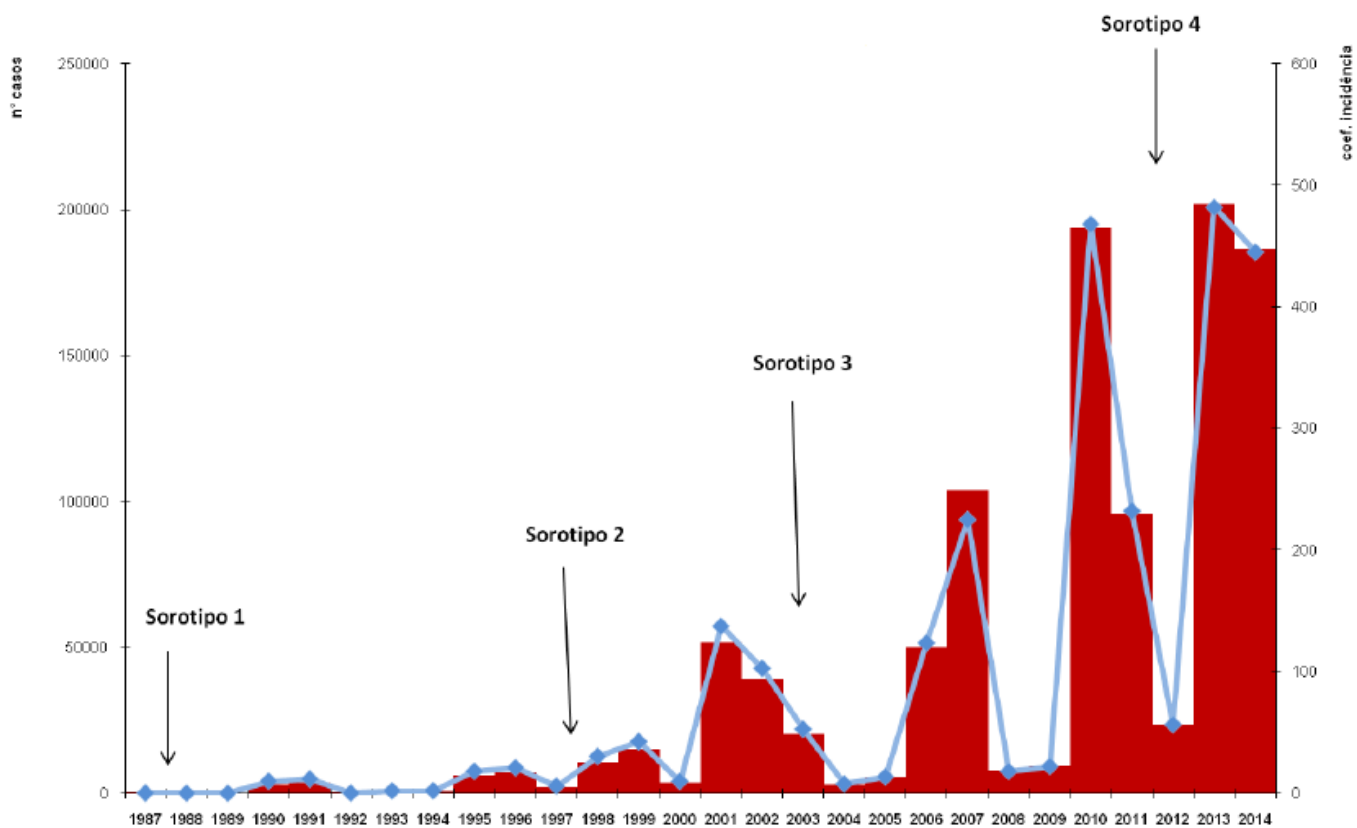


Figura 5 - Representação gráfica da distribuição do número de casos autóctones por ano e principais sorotipos circulantes no Estado de São Paulo. Dados de 1987 a 2014. (Adaptado de: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/materiais-de-comunicacao/dengue/plano_da_dengue_16_10_-_formatacao.pdf)

Neste trabalho, foram realizados o diagnóstico molecular e a sorotipagem molecular de DENV baseados no gene que codifica a junção das proteínas do Capsídeo e da pré-Membrana (C/prM) em amostras de plasma de pacientes atendidos na cidade de Marília (SP) diagnosticados por critério clínico-epidemiológico, no ano de 2015. De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que parte das amostras realmente foi positiva para dengue e que o sorotipo circulante corresponde ao DENV1.

Tabela 1 - Número de casos autóctones de dengue por ano no estado de São Paulo e na cidade de Marília. De 2007 a 2016. (Fonte: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/dengue/dados-estatisticos>)

<i>Ano</i>	<i>Estado de SP</i>	<i>Marília</i>
2007	103.724	1.110
2008	7.364	12
2009	8.996	11
2010	189.330	945
2011	90.021	71
2012	21.967	22
2013	201.498	462
2014	196.879	1.613
2015	657.146	10.202
2016	155.972	230

O critério de diagnóstico clínico-epidemiológico da febre da dengue se faz importante quando há limitações de recursos técnicos e econômicos para a realização de testes específicos para a confirmação da doença. Porém, a elevada frequência de casos com sintomas não específicos e até mesmo infecções assintomáticas; a grande variação da apresentação clínica da doença, a qual está relacionada às características de cada hospedeiro; ao sorotipo do vírus da dengue circulante, entre outros fatores, podem encobrir

a ocorrência de outras doenças infecciosas sazonais, além de subestimar o número real de casos durante uma epidemia (Passos et al., 2008).

Ao fazer o sequenciamento de parte das amostras positivas (figura 4), também foi possível observar a grande variabilidade genética presente na proteína prM, um dos alvos moleculares do sistema imune humano. De acordo com Smith et al. (2016), pesquisas realizadas com anticorpos monoclonais humanos (MAbs) gerados após infecções naturais primárias ou secundárias com DENV, mostraram que grande parte desses anticorpos apresentou a capacidade de reagir com epítomos de diferentes antígenos (reatividade cruzada), ou seja, podendo reagir com diferentes sorotipos. Dentre esses anticorpos monoclonais, destacam-se os anticorpos anti-prM. Ainda nesse estudo, eles observaram que esses anticorpos de reação cruzada não demonstraram propriedades neutralizantes *in vitro* e nem qualquer nível de proteção em modelos animais, quando infectados por DENV. E mais, foi possível observar que os MAbs anti-prM mostraram propriedades significativas no aumento da infecção, tanto na cultura de células, quanto em modelos animais, quando infectados por sorotipos heterólogos. Assim, os anticorpos anti-prM são passíveis de desempenhar um papel chave na patogênese da dengue em seres humanos, podendo ser um componente fundamental no mecanismo ADE, proposto como hipótese no desenvolvimento das formas graves da doença.

No ano de 2015, apesar de estar presente somente um único sorotipo, DENV1, o qual já foi encontrado nos anos anteriores, ainda houve uma epidemia de dengue de grandes proporções na cidade de Marília. Em parte, isso pode ser explicado pela elevada variabilidade genética apresentada pelos vírus com genoma de RNA, a qual pode estar associada à baixa fidelidade da enzima RNA polimerase dependente de RNA, o que

permite a incorporação de mutações na cadeia de RNA que está sendo sintetizada, juntamente com a ausência de um mecanismo de revisão, o que resulta na geração de um grande número de variantes virais (Clyde et al., 2006). Assim, mesmo estando presente um fenótipo que já foi encontrado em epidemias anteriores, a grande variação genética dentro do próprio sorotipo pode afetar a população previamente acometida, elevando as taxas de incidência da doença. Pois, os anticorpos previamente produzidos podem não reconhecer as variantes dos epítomos apresentados, ou se forem capazes de reconhecer, podem não conseguir neutralizá-los.

Isso tudo precisa ser levado em consideração nas discussões acerca das vacinas anti-DENV, visto que algumas delas são quimeras produzidas com a utilização da inserção dos genes que codificam a glicoproteína E e a proteína prM em determinadas cepas de vírus da febre amarela (Calegari, 2015). As vacinas produzidas precisam ser eficientes contra os quatro sorotipos virais, lembrando que uma resposta imune ineficiente pode aumentar os riscos de desenvolver Dengue grave, de acordo com estudos supracitados. Outro ponto importante é considerar as características genéticas dos hospedeiros, buscando entender melhor a relação entre o patógeno e a resposta imune humana, os aspectos epidemiológicos regionais, incluindo idade, sexo e histórico da doença da população acometida e estudos englobando o mosquito, uma vez que a proliferação e a propagação do vetor estão relacionadas com a transmissão da doença.

Nos trabalhos futuros, espera-se que o conhecimento das características genéticas dos DENV circulantes associadas às características epidemiológicas da população acometida por dengue da cidade de Marília-SP, possa contribuir para o melhor manejo de

febre da dengue na cidade, podendo ser utilizada também como modelo para outras cidades.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, D. E., M. F. Lodeiro, et al. (2005). Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J Virol*, 79(11): 6631-6643.
- Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vázquez S, Morier L, Gonzalez D, Castro O, Kouri G, Halstead SB & Guzman MG. (2006). Dengue hemorrhagic fever caused by sequential dengue 163 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 1113-1117.
- Assenberg, R., E. Mastrangelo, et al. (2009). "Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication." *J Virol* 83(24): 12895-12906.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496:504-507. doi: 10.1038/nature12060 PMID: 23563266.
- Blanton RE, Silva LK, Morato VG, Parrado AR, Dias JP, Melo PRS, Reis EAG, Goddard KAB, Nunes MRT, Rodrigues SG, Vasconcelos PFC, Castro JM, Reis MG, Barreto ML & Teixeira MG. (2008). Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur J Human Genet.*, v16, p.762-765.
- BRASIL. (2007). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Balanço Dengue Janeiro a Setembro de 2007. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_dengue_setembro.pdf.
- BRASIL. (2009). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília.
- BRASIL. (2014). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília.
- BRASIL. (2016). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. 1ed. Brasília.

- BRASIL. (2017). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/obitos-ate-2016.pdf>
- Calegari, L. P. (2015). Análise do uso de nanotubos de carbono como veículos para aprimorar a transfecção de um candidato vacinal de DNA contra o vírus da dengue. (Magister Scientiae dissertation, Universidade de Federal de Viçosa).
- Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo. (2006). Informe Técnico. Disponível em: http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/dengue/dense_1susp06.htm?attach=true
- Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo. (2010). Programa de Vigilância e Controle da Dengue. Disponível em: http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/dengue/programa10_estadual_dengue.pdf
- Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo. (2016). Informe Técnico. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/dengue/dengue15_se.htm
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews in Microbiology*, 44(1), 649-688.
- Chambers, T. J., A. Nestorowicz, et al. (1993). "Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication." *J Virol* 67(11): 6797-6807.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ & Marks RM. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*. Vol. 3. Nº 8.
- Clyde, K.; Kyle, J; Harris, E. (2006). Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*, v.80 (23), p: 11418-11431.

- Costa, Vivian V. et al. (2014). Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Medical microbiology and immunology*, v. 203, n. 4, p. 231-250.
- Dietz V, Gubler DF, Ortiz S, Duno G, Casta-Velez A, Sather GE, Gomez I and Vergne E. (1996). The 1986 dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiologic and clinical observations. *Health Sci J.*, v.15, p.201-210.
- Falgout, B., M. Pethel, et al. (1991). "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins." *J Virol* 65(5): 2467-2475.
- Franco L, Palacios G, Martinez JA, Vazquez A, Savji N, Ory F, Sanchez-Seco MP, Mart,n D, Lipkin WL, Tenorio A. (2011). First Report of Sylvatic DENV-2-Associated Dengue Hemorrhagic Fever in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.5(8), p.e1251.
- Gibbons, R.V. & Vaughn, D.W. (2002). "Dengue: an escalating problem." *Brith Med J.* v.328, p.1563-1566.
- Gubler DJ. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol.*, v.11(3), p.480-496.
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. (1990). "Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study." *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.42, 1p. 796184.
- Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, Delgado I & Halstead SB. (2000). Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am. J. Epidemiol.*, v.152, p.7936799.
- Halstead, S. B. (1993). Pathophysiology and pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. New Delhi: Prasert Thongcharoen, 1-250.
- Halstead, S. B. (2008). Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53: 273-291.
- Henchal EA & Putnak JR. (1990). The Dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews* v.3(4), p. 376-396.
- Huang, Q., Chen, A. S., Li, Q., & Kang, C. (2011). Expression, purification, and initial structural characterization of nonstructural protein 2B, an integral membrane protein

- of Dengue-2 virus, in detergent micelles. *Protein expression and purification*, 80(2), 169-175.
- Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A. & Burke DS. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.38, p.411-419.
- Kurane I, Brinton MA, Samson AL, Ennis FA. (1991). Dengue virus-specific, human CD4⁺ CD8⁻ cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol.*, v.65(4), p.1823-8.
- Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.362(4), p.1051-6.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*; 30:545-51.
- Lin S, Zou G, Hsieh SC, Qing M, Tsai WY, Shi PY & Wang WK. (2011). The Helical Domains of the Stem Region of Dengue Virus Envelope. *JOURNAL OF VIROLOGY*, May 2011, p. 5159-65171.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2001). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. *Fields virology*, 1, 991-1041.
- Lobigs M, Arthur CE, Müllbacher A, Blanden RV. (1994). The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology*, v.202(1), p.195-201.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.*, v.22(4), p.564-81.
- Martinelli, C. M. T., Siqueira, J.B. Junior, et al. (2015). Economic Impact of Dengue: Multicenter Study across Four Brazilian Regions. *PloS Negl Trop Dis.* 9(9): e0004042. doi:10.1371/journal.
- Mason, P. W., S. Pincus, et al. (1991). Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology* 180(1): 294-305.

- Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S., & Bartenschlager, R. (2007). The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8873-8882.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ & Rossmann MG. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Rev. Microbiol.* V.3, p.13622.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Shwartz O, Fieschi F, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F & Desprès P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO reports*, v.4(7), p.723-728.
- Passos, S. R. L., Bedoya, S. J., et al. (2008). Clinical and laboratory signs as dengue markers during an outbreak in Rio de Janeiro. *Infection*, 36(6), 570.
- Rocha, R. D. C. (2011). Epidemiologia da dengue na cidade de Rio Branco-Acre, Brasil, no período de 2000 a 2007. (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Epidemiologia).
- Rothman AL. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.*, v.113(7), p.946-51.
- Samsa, M. M., Mondotte, J. A., Caramelo, J. J., & Gamarnik, A. V. (2012). Uncoupling cis-Acting RNA elements from coding sequences revealed a requirement of the N-terminal region of dengue virus capsid protein in virus particle formation. *Journal of virology*, 86(2), 1046-1058.
- Simmons, C. P., J. J. Farrar, et al. (2012). Dengue. *N Engl J Med* 366(15): 1423-1432.
- Siqueira, JB, Martelli, CMT., Coelho, GE, Simplício, ACR & Hatch, DL. (2005). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981-2002. *Em Infect Dis.*, v.11(1), p.48-53.
- Smith, S. A., Nivarthi, U. K., de Alwis, R., Kose, N., Sapparapu, G., Bombardi, R., ... & de Silva, A. M. (2016). Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single Immunodominant Antigenic Site. *Journal of virology*, 90(2), 780-789.
- Solomon, T. & Mallewa, M. (2001). Dengue and other emerging flaviviruses. *J Infect.*, v.42, p.104-115.

- Wengler, G., G. Czaya, et al. (1991). In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol* 72 (Pt 4): 851-858.
- WHO. (1996). Dengue hemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. (2012). Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. (2017). Dengue and severe dengue. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z., & Shi, P. Y. (2013). Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *Journal of virology*, 87(8), 4609-4622.
- Yu, L., M. Nomaguchi, et al. (2008). Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. *Virology*, 374(1): 170-185.