

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**"Estratégia molecular da alta performance
para sorotipagem do vírus da dengue em
ovos de mosquitos: prospecção da
transmissão transovariana do vírus em
Aedes aegypti"**

Tiago Souza Salles

**Rio de Janeiro – RJ
2018**

Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em *Aedes aegypti*

Tiago Souza Salles

Tese de doutorado apresentado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica do programa de pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química.

Orientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Co-orientador: Davis Fernandes Ferreira

Co-orientadora: Márcia Regina Soares da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – RJ

Outubro de 2018

Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em *Aedes aegypti*

Tiago Souza Salles

Tese de doutorado apresentado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica do programa de pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química.

Aprovado em _____
Comissão Examinadora:

Dra. Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso (Orientadora) - IQ/UFRJ

Dra. Bianca Cruz Neves – IQ/UFRJ

Dra. Norma Suely De Oliveira Santos – IMPPG/UFRJ

Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro – IMPPG/UFRJ

Dr. Rafael Maciel de Freitas - Fiocruz

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Salles, Tiago

Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em *Aedes aegypti* / Tiago Souza Salles. -- Rio de Janeiro, 2018.

135 f.

Orientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso.

Coorientador: Davis Fernandes Ferreira.

Coorientadora: Márcia Regina Soares da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2018.

1. dengue. 2. epidemiologia. 3. *Aedes aegypti*. 4. diagnóstico. 5. transmissão vertical. I. Ferreira Moreira Carvalho Cardoso, Mônica, orient. II. Fernandes Ferreira, Davis, coorient. III. Regina Soares da Silva, Márcia, coorient. IV. Título.

Dedico este trabalho...

À minha mãe Edna, uma guerreira humilde que, em sua simplicidade, sempre me apoiou. Uma mulher que admiro, respeito e que amo não somente por ter me concebido, mas por ter me ensinado como viver de forma digna e íntegra.

À Patrícia, a minha esposa, por ter me dado força, incentivo e apoio na realização do doutorado.

Aos amigos especiais, Victor, Evelyn e Thayane, que fizeram parte de minha vida no período desta pós-graduação. Amigos, companheiros e todos mais que por algum motivo marcaram e de uma forma ou outra e me ensinaram que nada é imutável e que a vida é um constante aprendizado entre erros e acertos o importante é sempre tentar fazer o nosso melhor.

Agradecimentos

A Deus, por sempre nos dar condições de concretizar nossos sonhos, à minha orientadora Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso por toda ajuda, apoio, incentivo, e paciência com a minha desorganização, e meus companheiros de Laboratório, que gentilmente me apoiaram e me ajudaram em todas as dificuldades.

Aos componentes da banca, Dra. Bianca Cruz Neves, Dra. Norma Suely De Oliveira Santos, Dr. José Nelson dos Santos Silva Couceiro, Dr. Rafael Maciel de Freitas, por terem me prestigiado com a sua presença.

Ao CEDERJ, por ser inovador e por possibilitar minha formação por meio da modalidade semipresencial com a garantia de um ensino de excelência e qualidade.

Por fim, agradeço a todos que acreditaram em mim.

Resumo

SALLES, Tiago Souza. Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Atualmente, a dengue é a arbovirose que acomete mais de um terço da população mundial em países tropicais e subtropicais, sendo responsável por cerca de 100 milhões de casos anuais. De 2011 a 2017 nas Américas foram confirmados mais de 9 milhões de casos de dengue. A dengue é uma doença causada por um vírus da família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, que inclui 4 diferentes sorotipos (DENV-1-4), transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*. Devido a ausência de vacinas e de agentes antivirais eficazes que possam prevenir e controlar a infecção da dengue, a estratégia de controle do vetor tem sido a melhor medida na profilaxia da doença. A detecção rápida do vírus dentro do mosquito, em uma área, sinaliza a necessidade imediata de combate ao vetor nesta região. Outro fato importante é que o reservatório natural do vírus da dengue ainda não foi identificado. A comprovação da transmissão transovariana no mosquito justificaria a existência de grandes epidemias, sem tráfego de pessoas infectadas, uma vez que os mosquitos já nasceriam infectados. O objetivo deste trabalho foi verificar a transmissão transovariana do vírus da dengue no mosquito *Aedes aegypti*, tanto em ovos coletados no campo como em ovos de mosquitos infectados com o DENV-3 no laboratório. Também foi verificada a capacidade do vírus isolado de mosquito coletado no campo de infectar novas células hospedeiras. Inicialmente foram desenhados primers de oligonucleotídeos específicos para sorotipagem do vírus da dengue, baseando-se nos relatos da literatura. Além disso, foi confeccionado um par de primers que abrange todos os sorotipos do vírus. Foram também desenhados novos primers de oligonucleotídeos diferentes dos descritos na literatura. Para validação dos primers foram preparadas amostras virais dos sorotipos padrões DENV-1-4, o mRNA foi extraído e confeccionado o cDNA para usar na reação de PCR convencional. Para quantificação absoluta foram construídos a partir de clonagem em pGEM-T easy, plasmídeos contendo o fragmento alvo dos DENV-1-4 a ser utilizado como padrão. Para quantificação dos sorotipos de DENV-1-4 foi estabelecido uma curva padrão utilizando os plasmídeos virais como template no ensaio de PCR quantitativo por SYBR Green, as taxas de eficiência dos primers foram avaliadas, foi correlacionado o valor de CT (CycleThreshold) com o número de cópias de RNA viral para quantificação (curva padrão). Os primers foram validados por PCR convencional e o PCR quantitativo. Com as construções dos plasmídeos virais em pGEM-T easy, foi possível produzir quatro curvas padrões e correlacionar os valores de CTs com o número de cópias de vírus. Os testes de eficiência dos primers para quantificação dos sorotipos na reação qPCR foram acima de 90% quando utilizados os novos conjuntos de *primers*, ou seja, mais eficiente do que os *primers* descritos na literatura. Nos ensaios de RT-PCR foram detectados o DENV-4, em 3 dos 4 grupos de ovos da geração F2 cepa *Aedes-RIO*. Este fragmento foi amplificado, clonado e vetor pGem-T easy, que foi transformado

em células de bactéria e encaminhado para o sequenciamento. Com a sequência obtida foi feita uma análise utilizando o programa Blastn, e o fragmento sequenciado apresentou alta similaridade com o DENV-4 no NCBI, confirmando a presença do DENV-4. Além da cepa Aedes-RIO proveniente do campo, foram testados ovos de outras localidades da cidade do Rio de Janeiro, como: bairro da Urca, Paquetá, Vila Kennedy, Bangu, Ilha do Fundão e do Município de Volta Redonda. Onde foram detectados por técnica de RT-PCR a presença do DENV-1 nos ovos da Urca, Vila Kennedy, Ilha do Fundão e Volta Redonda. A presença de DENV-2 na localidade da Urca, Vila Kennedy e Volta Redonda. No cDNA das fêmeas infectadas em laboratório foi identificado um fragmento de 146pb correspondente a identificação de uma região comum a todos os sorotipos do DENV. Esse fragmento genômico do vírus isolado do mosquito foi amplificado, purificado e sequenciado. A sequência obtida foi utilizada como sequência molde na busca de sequências depositadas no NCBI utilizando o programa Blastn. O fragmento sequenciado apresentou alta similaridade com o DENV-3, confirmando o sucesso da infecção do mosquito em laboratório. Em seguida, foi feito o RT-PCR dos ovos das fêmeas alimentadas com o vírus em laboratório e confirmado a presença DENV-3. A descoberta do vírus da dengue em ovos postos, por mosquito, justificaria a ocorrência de grandes epidemias de dengue observadas, após períodos de chuvas, em locais aonde não existia a doença. Esta descoberta também abre a possibilidade de identificação de vírus a partir de ovos, inovando o monitoramento de controle epidemiológico da dengue.

Palavras-chaves: dengue, epidemiologia, *Aedes aegypti*, diagnóstico e transmissão vertical

Abstract

SALLES, Tiago Souza. Estratégia molecular da alta performance para sorotipagem do vírus da dengue em ovos de mosquitos: prospecção da transmissão transovariana do vírus em *Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Currently, dengue is arboviruses that affect more than a third of the world population in tropical and subtropical countries, accounting for about 100 million cases annually. From 2011 to 2017 in the Americas more than 9 million cases of dengue have been confirmed. Dengue is a disease caused by a virus of the Flaviviridae family, of the genus Flavivirus, which includes 4 different serotypes (DENV-1-4), transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. Due to the absence of effective vaccines and antiviral agents that can prevent and control dengue infection, the vector control strategy has been the best measure in the prophylaxis of the disease. The rapid detection of the virus within the mosquito in an area signals the immediate need to combat the virus in this region. Another important fact is that the natural reservoir of the dengue virus has not yet been identified. Evidence of the mosquito transovarian transmission would justify the existence of major epidemics, without traffic of infected persons, since the mosquitoes would already be infected. The objective of this work was to verify the transovarian transmission of the dengue virus in the *Aedes aegypti* mosquito, both in the eggs collected in the field and in eggs of mosquitoes infected with DENV-3 in the laboratory. The ability of the isolated mosquito virus collected in the field to infect new host cells was also checked. Initially, specific oligonucleotide primers were designed for serotyping of the dengue virus, based on reports in the literature. In addition, a pair of primers covering all serotypes of the virus was made. New oligonucleotide primers other than those described in the literature were also designed. For validation of the primers, viral samples of the standard serotypes DENV-1-4 were prepared, the mRNA was extracted, and the cDNA prepared for use in the conventional PCR reaction. For absolute quantification were constructed from cloning into pGEM-T easy, plasmids containing the target fragment of DENV-1-4 to be used as standard. For quantification of the DENV-1-4 serotypes a standard curve was established using the plasmids as a template in the quantitative PCR assay by SYBR Green, the efficiency rates of the primers were evaluated, the CT value (CycleThreshold) was correlated with the number of viral RNA copies for quantification (standard curve). Primers were validated by standard PCR and quantitative PCR. With the constructs of the viral plasmids in pGEM-T easy, it was possible to produce four standard curves and to correlate the CT values with the number of virus copies. The efficiency tests of the primers for serotypes quantification in the qPCR reaction were above 90% when using the new primer sets, that is, more efficient than the primers described in the literature. In the RT-PCR assays DENV-4 was detected in 3 of the 4 egg groups of the *Aedes-RIO* strain F2 generation. This fragment was amplified, cloned and pGem-T easy vector, which was transformed into bacterial cells and routed for sequencing. The sequence obtained was analyzed using the Blastn program, and the sequenced fragment showed high similarity with DENV-4 in NCBI, confirming the DENV-4 presence. In addition to the field *Aedes-RIO* strain eggs

were tested from other locations in the city of Rio de Janeiro, such as Urca, Paquetá, Vila Kennedy, Bangu, Ilha do Fundão and Volta Redonda cities. Where the presence of DENV-1 in the eggs of Urca, Vila Kennedy, Ilha do Fundão and Volta Redonda were detected by RT-PCR technique. The presence of DENV-2 in the locality of Urca, Vila Kennedy and Volta Redonda. In the cDNA of infected females in the laboratory a 146pb fragment corresponding to the identification of a region common to all the serotypes of the DENV was identified. This genomic fragment of virus isolated from the mosquito was amplified, purified and sequenced. The sequence obtained was used as template sequence in the search for sequences deposited in the NCBI using the Blastn program. The sequenced fragment showed high similarity with DENV-3, confirming the success of mosquito infection in the laboratory. Then, RT-PCR of the eggs of the females fed with the virus was done in the laboratory and the presence of DENV-3 was confirmed. The discovery of the dengue virus in laying eggs, by mosquito, would justify the occurrence of large epidemics of dengue observed after periods of rainfall in places where the disease did not exist. This discovery also opens the possibility of virus identification from eggs, innovating the monitoring of epidemiological control of dengue.

Keywords: dengue, epidemiology, *Aedes aegypti*, diagnosis and vertical transmission

Lista de Figuras

Figura 1	Distribuição global das principais flaviviroses em 2018	18
Figura 2	O Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 3	Transmissão do Vírus da Dengue	21
Figura 4	Intensidade global da presença de dengue em 2014	24
Figura 5	Taxa de mortalidade da dengue de 1990 a 2018.	28
Figure 6	Taxa de incidência de dengue de 1980 a 2017.	31
Figura 7	Incidência de dengue associada aos sorotipos de DENV no Brasil de 2010 a 2016.	35
Figura 8	Comparação entre o total de casos prováveis e amostras sorotipadas.	37
Figura 9	Total de amostras sorotipadas (%) em diversas regiões do Brasil de 2010 a 2016.	40
Figura 10	Erupção cutânea pelo Vírus da Dengue.	41
Figura 11	Classificação clínica da dengue de 2009.	43
Figura 12	Representação esquemática da estrutura do Vírus da Dengue maduro.	44
Figura 13	Esquema das etapas do processo de fusão de Flavivírus	45
Figura 14	Representação esquemática da organização do genoma e do processamento da poliproteína dos Flavivírus.	47
Figura 15	Topologia da membrana e clivagem das proteínas estruturais e da NS1 dos Flavivírus.	48
Figura 16	Estrutura do ectodomínio da proteína e dos Flavivírus e seus diferentes estados oligoméricos.	51
Figura 17	O ciclo replicativo dos Flavivírus	56
Figura 18	Diagnóstico da dengue.	61
Figura 19	Dicas de prevenção e controle	70
Figura 20	Alinhamento de sequências nucleotídicas múltiplas dos DENVs.	78
Figura 21	PCR dos modelos positivos DENV1-4.	81
Figura 22	curva de calibração qPCR.	83
Figura 23	Os perfis de amplificação e as curvas de dissociação do cDNA de DENV1-4 utilizando o ensaio de PCR SYBR Green.	91
Figura 24	PCR dos mosquitos e ovos infectados por alimentação	93
Figura 25	Resultado da busca de sequência viral no NCBI utilizando a ferramenta BLASTn a partir da sequência de nucleotídeo do obtida no sequenciamento	94
Figura 26	PCR dos mosquitos e ovos cepa <i>Aedes</i> -RIO	97
Figura 27	Ensaio de PCR Nested convencional com ovos cepa <i>Aedes</i> -RIO	98
Figura 28	Resultado da busca de sequências utilizando como molde o produto de PCR amplificado e sequenciado dos ovos cepa <i>Aedes</i> -Rio.	99
Figura 29	Ensaio de PCR nested convencional com ovos Urca e Paquetá	101
Figura 30	Ensaio de PCR nested convencional ovos Bangú e Vila Kennedy	103
Figura 31	Ensaio de PCR Nested convencional de amostra ovos Urca e Paquetá.	105

Figura 32	Ensaio de PCR nested convencional de ovos Ilha do Fundão (CT).	107
Figura 33	Isolamento dos ovos PQT e E4	114
Figura 34	Microscopia eletrônica de transmissão	115

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Característica dos primers dos vírus da Dengue.	78
Tabela 2A:	Desempenho para o ensaio SYBR Green utilizando vírus da dengue 1-4 e primers sorotipo-específicos.	83
Tabela 2B:	Desempenho para o ensaio SYBR Green utilizando fragmento sintético em plasmídeo do DENV-1-4 e primers sorotipo-específicos.	83
Tabela 3:	Coeficiente angular e valores de eficiência do PCR para o ensaio de SYBR green usando os primers específicos nas amostras de cDNA e Plasmídeo dos DENV1-4.	85
Tabela 4:	Desempenho da especificidade dos conjuntos de primers para detecção de sorotipos específicos de DENV no ensaio qPCR SYBR Green.	89
Quadro 1:	Informação das amostras de mosquitos.	107
Tabela 5:	Detecção dos DENV1-4 por qPCR nas amostras.	108
Tabela 6:	Análise do PCR e qPCR para DENVs.	110

ABREVIATÓES E SIGLAS

2K – proteína não estrutural 2K

5'RTPase - 5'-RNA trifosfatase

AAS – ácido acetilsalicílico

a.C. – antes de Cristo

APCs – células apresentadoras de antígeno

ATP – trifosfato de adenosina

ATPase - adenosina trifosfatase

C – proteína capsídica

cDNA – DNA complementar

cryoEM - crio-microscopia eletrônica

C-terminal – carboxi terminal

DENV - Vírus da Dengue

DENV-1 - Vírus da Dengue tipo 1

DENV-2 - Vírus da Dengue tipo 2

DENV-3- Vírus da Dengue tipo 3

DENV-4 - Vírus da Dengue tipo 4

DF ou dengue – dengue febre clássica

DHF – febre hemorrágica da dengue

DNA – ácido desoxirribonucléico

dsRNA – dupla fita de RNA

DSS – síndrome de choque da dengue

E – proteína de envelope

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GSK – Glaxo Smith Kline

HIV1 – Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

IEC – Instituto Evandro Chagas

IIP - índice de infestação predial

IL-8 – Interleucina tipo 8

Jak1 - Quinase Janus 1

JE - Encefalite Japonesa

JEV - Vírus da Encefalite Japonesa

kDa – quiloDalton

KUNV - virus Kunjin

Lacen – Laboratório Central

LIRAA – levantamento de infestação rápido de *Aedes aegypti*

M – proteína de Membrana

mRNA - RNA mensageiro

MTase - metiltransferase

NC – nucleocapsídeo

NS – proteína não estrutural

NS1 – proteína não estrutural 1

NS2A – proteína não estrutural 2

NS2A α – proteína não estrutural 2A alfa

NS2B – proteína não estrutural 2B

NS2B/NS3 – serino-protease viral

NS3 – proteína não estrutural 3

NS4A – proteína não estrutural 4A

NS4B – proteína não estrutural 4B

NS5 – proteína não estrutural 5

N-terminal – amino termina

NTPase – nucleosídeo trifosfatase

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – sequência aberta para leitura

PDVI - Pediatric Dengue Vaccine Initiative

pr – fragmento liberado após clivagem de prM

prM – proteína precursora da proteína de membrana M

RE – retículo endoplasmático

REL – retículo endoplasmático Liso

RER – retículo endoplasmático rugoso

RNA – ácido ribonucléico

RpRd - RNA polimerase dependente de RNA

SAM - S-adenosil-metionina

SESDEC - Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil

SLE - encefalite de St. Louis

SLEV – Vírus da Encefalite de St. Louis

STAT1 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

TBE - encefalite transmitida por carrapato

TBEV - Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato

TyrK2 – tirosina quinase 2

VP - pacotes de vesículas

WNE - encefalite do Oeste do Nilo

WNV - Vírus do Oeste do Nilo

YF - febre amarela

YFV - Vírus da Febre Amarela

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	18
2. Transmissão de dengue	20
3. Transmissão transovarina do Vírus da Dengue.....	21
4. Epidemiologia do Vírus da Dengue	24
5. Histórico da dengue nas Américas	27
6. Histórico da dengue no Brasil	32
6.1 Sorotipos circulantes no Brasil no século 21	36
7. Patologia e Manifestação Clínica da Doença.....	40
8. Estrutura da partícula viral	44
9. O genoma e as proteínas virais.....	46
9.1. As Proteínas estruturais	49
9.1.1. A Proteína Capsídica.....	49
9.1.2. A glicoproteína de Membrana (M).....	49
9.1.3. A Glicoproteína de Envelope	50
9.2. As Proteínas Não Estruturais	52
9.2.1 A Proteína NS1.....	52
9.2.2. As Proteínas NS2A e NS2B	52
9.2.3. A Proteína NS3.....	53
9.2.4. As Proteínas NS4A e NS4B	54
9.2.5. A Proteína NS5.....	54
10. Replicação Viral	55
11. Diagnóstico da dengue.....	59
12. Drogas, vacinas antivirais e prevenção.....	61
12.1 Drogas antivirais contra proteínas estruturais	61
12.2 Drogas antivirais contra proteínas não estruturais.....	63
12.3 Vacinas antivirais	64
12.4 Prevenção e controle da dengue	68
13. Objetivos.....	71
13.1 Objetivo geral:	71
13.2 Objetivos específicos:.....	71
14. Material e métodos	72
15. Resultados.....	77
15.1. Normalização do Nested PCR Convencional.....	77
15.2. Quantificação e sensibilidade analítica de SYBR Green usando DNA plasmidial como modelo	82
15.3. Padronização de qPCR usando cDNA viral a partir de DENV e SYBR Green	85
15.4 Especificidade do qPCR contra outros vírus	87
15.5 Análise dos mosquitos infectados por alimentação e dos ovos dos mosquitos infectados por alimentação	92
15.6 Análise dos mosquitos e ovos de mosquitos Aedes aegypti coletados no campo	95
15.7 Análise dos mosquitos e ovos tanto infectados por alimentação quanto os coletados no campo por qPCR.	109
15.8 Isolamento do vírus do ovos.....	113
15.9 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão dos ovos.....	114
16. Discussão	117
17. Conclusão	124
Referências Bibliográficas.....	125

1. Introdução Geral

Nas últimas décadas, epidemias globais do Vírus da Dengue (DENV) tem sido responsáveis por altas taxas da doença e de mortalidade, em parte devido à diminuição nos esforços do controle do mosquito, mais de 50.000.000 de casos do DENV ocorrem anualmente (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). O agente etiológico da doença é o DENV (Holmes e Twiddy, 2003), que pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Esta família consiste de três gêneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Flavivirus*. Este último grupo representa o maior dos três gêneros e contém mais de 70 vírus diferentes (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Estes vírus também fazem parte do grupo dos arbovírus, todos os setenta são arbovírus. Este termo é oriundo da expressão: *arthropod-borne viruses* definido pela World Health Organization (WHO), que são vírus transmitidos por artrópodes, em sua maioria, insetos, que contém vários tipos de importantes patógenos que infectam humanos e animais em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1), como o Vírus da Encefalite Japonês (JEV), o Vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV), o Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato (TBEV), o Vírus do Oeste Nilo (WNV), o Vírus da Dengue (DENV).

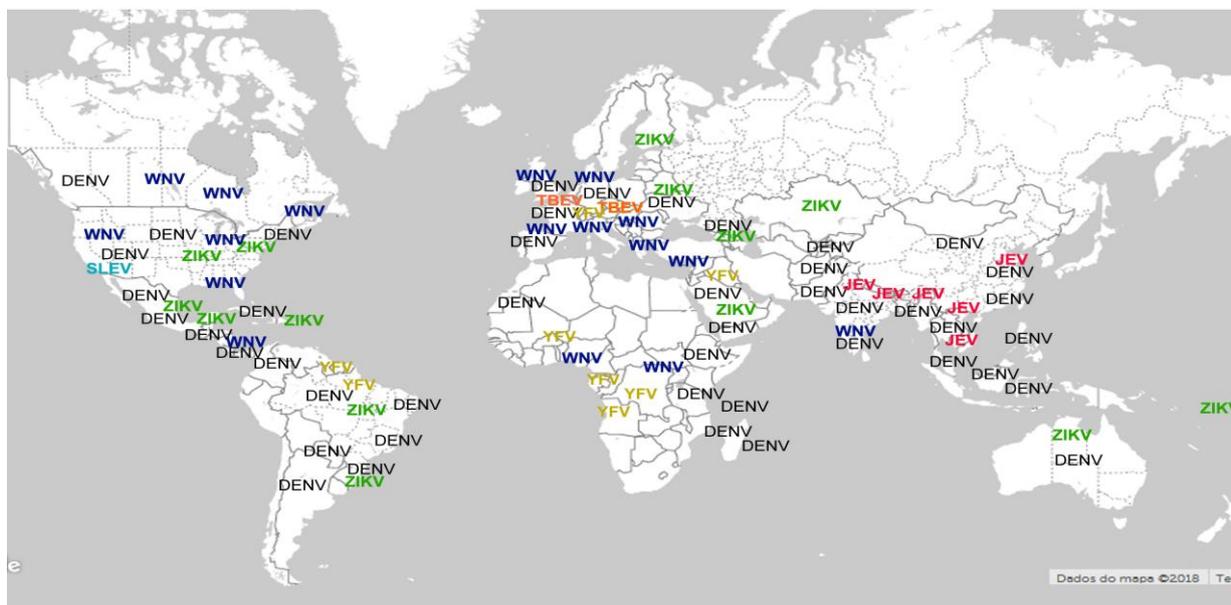


Figura 1 – Distribuição global das principais flaviviroses em 2018.

Dengue (DENV), o Vírus Zika e o Vírus da Febre Amarela (YFV) JEV, Vírus da Encefalite Japonês; SLEV, Vírus da Encefalite de St. Louis; TBEV, Vírus da Encefalite Causada por Carrapato; WNV, Vírus do Oeste do Nilo; YFV, Vírus da Febre Amarela; DENV, Dengue e Vírus Zika. Elaboração própria a partir do site <http://www.healthmap.org>, em 04 setembro 2018.

Atualmente, a dengue é a arbovirose mais comum que atinge o homem, uma estimativa recente indica que 390 milhões de pessoas são infectadas pelo DENV ao ano, das quais 96 milhões apresentam manifestação clínica (Bhatt *et al.*, 2013). Outro estudo revela uma estimativa de que são 3,9 bilhões de pessoas, em 128 países, correm o risco de serem infectadas pelo DENV (Brady *et al.*, 2012). Esta enfermidade abrange principalmente os países tropicais e subtropicais, sendo bastante estudada por ser uma infecção sistêmica e dinâmica, possuindo um amplo espectro clínico que inclui manifestações clínicas graves e não graves (Holmes e Twiddy, 2003; WHO, 2009). Além de causar grandes prejuízos econômicos e humanos para as regiões de maior incidência da doença (Guzman *et al.*, 2015).

Apesar do ônus da doença, as consequências econômicas da dengue não são bem avaliadas. No entanto, há uma estimativa de anos de vida ajustados por incapacidade, mostrando que a dengue está na mesma ordem de grandeza ou até maior que a maioria das principais doenças infecciosas, como as infecções do trato respiratório superior e a infecção pelo vírus da hepatite B (Murray *et al.*, 2012). Estimativas recentes de custos diretos e indiretos resultantes das infecções por DENV são consideráveis, com média anual de gastos de US\$ 2,2 bilhões nas Américas, entre os anos de 2000 a 2007, US\$ 1,2 bilhões no Sudeste Asiático por ano, no período de 2001 a 2010 e US\$ 76 milhões na África por ano, de 2001 a 2010 (Shepard *et al.*, 2011, 2014) Um estudo recente estima que o custo global anual com a infecção da dengue é de US\$ 8,9 bilhões (Shepard *et al.*, 2016).

Existem quatro sorotipos de Vírus da Dengue conhecidos como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Holmes e Twiddy, 2003). Estes sorotipos podem induzir à uma escala completa de manifestações clínicas, onde a infecção pode evoluir em fases: febril, crítica com quadros de Febre Hemorrágica conhecida como Dengue Hemorrágica (DHF) e como a Síndrome de Choque da Dengue (DSS) (Whitehead *et al.*, 2007; Gould and Solomon, 2008). Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou nova classificação de casos de dengue, sendo estes, atualmente, classificados como dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Porém, o Brasil só passou a adotar a nova classificação de casos de dengue criada pela OMS em 2014. Por essa razão, não é possível a comparação direta dos casos graves

que ocorreram no ano de 2013, tendo em vista que se utilizava a classificação antiga (WHO, 2009, FIO-CRUZ, 2017; Salles *et al.*, 2018).

2. Transmissão de dengue

A dengue é uma infecção viral sistêmica transmitida aos humanos por mosquitos, sendo os mosquitos do gênero *Aedes* um de seus principais vetores, particularmente o *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) (Halstead, 2007, 2008), (Figura 2), este vetor também transmite outros vírus de grande importância médica, como o Vírus da Febre Amarela, o Vírus da Zika e o Vírus da Chikungunya (Wang *et al.*, 2000, Tchankouo-Nguetchou *et al.*, 2010). O mosquito *Ae. aegypti* está altamente adaptado aos locais de moradia humana, vive em constante associação, se alimenta de seres humanos e põe seus ovos nos ambientes peri e domiciliar, pois suas larvas são, geralmente, encontradas em recipientes ou reservatórios artificiais de água gerados pelo homem, como: pneus descartados, baldes, vasos de plantas, garrafas e caixas d'água abertas, entre outros (Holmes e Twiddy, 2003, Guzman *et al.*, 2016).



Figura 2 – O mosquito *Aedes aegypti*.

Imagem do mosquito *Aedes aegypti* no momento da picada quando ocorre a transmissão do Vírus da Dengue. Modificado de Halstead, 2007.

Além do *A. aegypti*, outras espécies de mosquito estão envolvidas no ciclo de transmissão silvestre, no qual mosquitos de origem florestal transmitem

o vírus para primatas não humanos, que sofrem infecção assintomática. Na Ásia foram encontrados vírus associados principalmente a macacos *Presbytis* sp. e mosquitos do gênero *Ochlerotatus*, que agem como o vetor principal nesta região (Gubler, 1998; Rodhain, 1991; Peiris *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000). O *Aedes albopictus* é a espécie que transmite o vírus em torno de regiões domésticas, na África, enquanto existem vários vetores silvestres para os macacos, *Erythrocebus patas*, tais como o *Aedes taylori-furcifer*, *Aedes luteocephalus* e *Aedes opok* (Holmes e Twiddy, 2003). O ciclo de transmissão da dengue é apresentado na Figura 3.

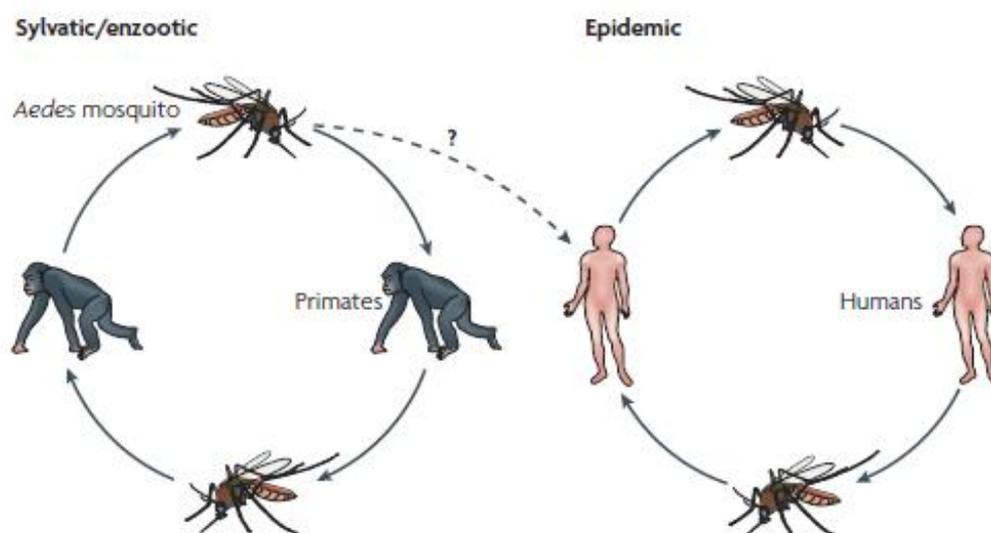


Figura 3 - Transmissão do Vírus da Dengue.

Esquema representativo dos ciclos silvestre e urbano de transmissão do Vírus da dengue. Modificado de Whitehead *et al.*, 2007.

3. Transmissão transovarina do Vírus da Dengue

Em diversos países tropicais onde a dengue é endêmica, a transmissão horizontal varia entre as espécies de *Ae. aegypti* e de *Ae. albopictus*, separadamente, principais vetores da doença, e os seres humanos (Gubler 2002, Adams e Boots 2010). A transmissão horizontal pode ocorrer ao

longo do ano, com surtos esporádicos em intervalo de anos, ou anualmente em um padrão sazonal cíclico (Adams e Boots, 2010). Em áreas endêmicas, onde ocorre a transmissão horizontal, esta não é aparente ao longo do ano. Ou seja, a capacidade do DENV persistir no ambiente, mesmo após longos períodos de poucos ou nenhum caso de dengue documentado em humanos, não está claramente compreendida (Buckner *et al.* 2013).

Um mecanismo que justificaria e que permitiria a permanência do DENV num determinado ambiente durante os períodos interepidêmicos seria a transmissão transovariana ou vertical, a transferência do DENV a partir de uma fêmea de mosquito infectada para sua prole (Adams e Boots 2010). A transmissão vertical do DENV tem sido pouco estudada (Khin & Than, 1983, Hull *et al.*, 1984), acredita-se que a taxa de transmissão transovariana no mosquito seja muito baixa e então, por isso, a persistência do vírus em meio urbano possa não depender desse fenômeno (Zidler *et al.*, 2008). Por outro lado, o reservatório natural do vírus da dengue ainda não foi identificado. Outro fato interessante, é que os ovos de mosquito *Ae aegypti* podem sobreviver por meses na natureza e serem viáveis. Tradicionalmente, ovos, como os de galinha são utilizados para replicação viral (Dumard *et al.*, 2013). Assim, os ovos infectados, verticalmente, podem potencialmente sobreviver por meses na natureza, durante os períodos interepidêmicos. Os mosquitos, provenientes destes ovos, seriam capazes de transmitir o DENV para os seres humanos durante sua alimentação sanguínea (Mourya *et al.*, 2001). O sucesso da transmissão transovariana de um agente patogênico, tal como DENV em função de sua descendência infectada seria uma justificativa para os surtos em locais onde há muito tempo a doença não é detectada. A prospecção da transmissão transovariana, objeto deste trabalho, no mosquito justificaria a ocorrência de grandes epidemias de dengue observadas, após períodos de chuvas, em locais onde não ocorria relatos anteriores da doença. Esta descoberta também abre a possibilidade de detecção de vírus a partir de ovos, possibilitando a previsão de um surto de dengue num determinado local, antes do aparecimento da doença, inovando assim o monitoramento de controle epidemiológico da dengue.

Sabe-se que o *Ae. Aegypti* é capaz de transmitir o DENV verticalmente (ou transovariana), aos seus descendentes após a infecção, seja por

alimentação oral ou por inoculação intratorácica sob condições de laboratório (Lee *et al.*, 1997, Mourya *et al.*, 2001, Joshi e Sharma, 2001, Joshi *et al.*, 2002, Wasinpiyamongkolet *et al.*, 2003).

Além disso, a transmissão transovariana foi relatada na natureza através da detecção do DENV em larvas recolhidas e em machos de mosquitos adultos, ambos capturados no campo (Khin e Than 1983, Chung *et al.*, 2001, Lee e Rohani 2005, Arunachalam *et al.* 2008, Angel e Joshi 2008, Guedes *et al.* 2010, Lau *et al.* 2015). Portanto, a transmissão transovariana tem sido proposta como um mecanismo importante para a manutenção do DENV em populações de vetores durante períodos interepidêmicos (Rhodain e Rosen, 1997). Tendo em mente, que no controle integrado de vetores são usadas estratégias bem estabelecidas para reduzir as populações dos mosquitos vetores e assim, prevenir os surtos de dengue. O conhecimento mais profundo da transmissão transovariana da dengue proporcionaria um sistema de vigilância proativa eficaz, sendo útil para melhorar as estratégias de prevenção e controle da dengue (Thongrunkiat *et al.* 2010).

A vigilância da transmissão transovariana do DENV em formas de mosquitos imaturos do ambiente surgiu como uma ferramenta potencial para a identificação de áreas prováveis de surtos de dengue (Thongrunkiat *et al.* 2010). Sendo, ainda mais importante, o aumento das taxas de transmissão transovariana de DENV, essas infecções forneceria um sinal de alerta de uma possível epidemia de dengue iminente, de modo que, as intervenções de controle pré-epidêmico poderiam ser implementadas para suprimir a transmissão da doença e evitar a propagação da mesma em outras áreas.

4. Epidemiologia do Vírus da Dengue

Não há nenhuma previsão de quando foi a primeira aparição do vírus da dengue em populações humanas, principalmente porque a doença frequentemente aparece de forma assintomática, não sendo, portanto, diagnosticada (Gubler, 1998). O registro mais antigo que se tem sobre a doença é de uma enciclopédia médica chinesa que data de 992 a.C. (Gubler, 1998). Além disso, antes do final do século XVIII, casos de doença com forte semelhança à dengue causaram epidemias intermitentes na Ásia e nas Américas, e a hipótese é que, entre os séculos XIX e XX, o vírus provavelmente se difundiu nos trópicos e subtropicais (Figura 4) (Hayes e Gubler, 1992; Monah, 1994; Holmes e Twiddy, 2003).

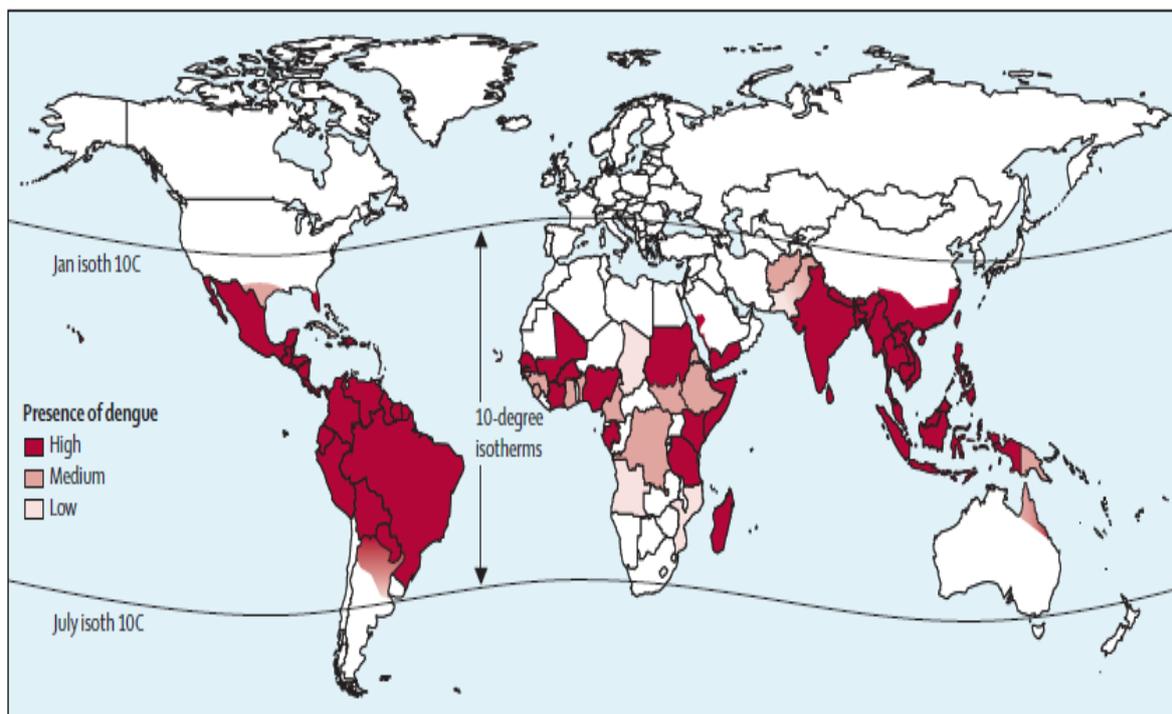


Figura 4 – Intensidade global da presença de dengue em 2014.

O Vírus da Dengue é endêmico na maioria das áreas tropicais e subtropicais do mundo, em vermelho escuro descreve maior presença da dengue até a cor nude referente à menor presença. Os dados de Bhatt e colaboradores (Bhatt *et al.*, 2013), Healthmap (CDC, 2014) e WHO (WHO, 2014), foram integrados para indicar a quantidade relativa de dengue global de acordo com as melhores estimativas. Modificado de Guzman *et al.*, 2015.

Logo após a segunda Guerra Mundial, uma doença similar ao quadro de dengue (DF) foi novamente detectada em áreas do sudeste da Ásia, onde

houve um impacto mais pronunciado em crianças (Gubler, 1998; Holmes e Twiddy, 2003). Mas, o primeiro surto bem documentado da dengue aconteceu em Manila, nos anos de 1953 e 1954, seguido por um surto maior em Bangkok, em 1958 (Holmes e Twiddy, 2003). Depois disso, o quadro de DHF e DSS ficaram endêmicos em todos os países do sudeste Asiático, com aumentos dramáticos nos números de casos, tornando-se um modelo de doenças emergentes. Ao mesmo tempo, a distribuição geográfica de DHF e DSS expandiu-se consideravelmente, e esta doença foi relatada em mais de 60 países (Holmes e Twiddy, 2003).

Apesar dos estudos antigênicos, há muito tempo, terem demonstrado que o DENV deve ser classificado como um *Flavivírus*, tem sido necessária uma análise filogenética molecular mais detalhada, para se conhecer a história deste vírus (Holmes e Twiddy, 2003). No entanto, a falta de resolução da árvore filogenética dos *Flavivírus* dificulta reconstruir com precisão a origem do DENV. Algumas conclusões podem ser tiradas, como a do macaco ser o animal reservatório natural do DENV, devido a observações nos ciclos de transmissão silvestre na Ásia e na África Ocidental (Rudnick, 1978; Rodhain, 1991; Wolfe *et al.*, 2001).

Os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1-4) são relacionados geneticamente e antigenicamente, cada um dos sorotipos são agrupados em diferentes genótipos. A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos pode resultar em uma série de manifestações clínicas para as quais o momento ou a sequência das infecções pode ser um importante fator, determinante na gravidade e no curso da doença (Gubler, 2014). Sabe-se que a poliproteína do DENV demonstra 30% de divergência entre os quatro sorotipos, existem vários genótipos dentro de cada sorotipo e eles apresentam diferenças de acordo com a sua distribuição geográfica (Rico-Hesse, 2003; Guzman *et al.*, 2016). Alguns dados indicam que as alterações genéticas nos DENVs podem afetar diretamente o potencial de transmissão em mosquitos ou a expressão da doença em humanos infectados (Guzman *et al.*, 2016).

A viagem de pessoas infectadas pelo mundo aliada ao fracasso do controle do mosquito *Ae. aegypti*, em áreas epidêmicas, e a possibilidade iminente de adaptação destes patógenos em outros vetores, aumenta a

população de mosquitos infectados, o que contribui para a dispersão geográfica dos surtos epidêmicos da doença (Gould e Soloman, 2008).

Um ou mais sorotipos de DENV infectam cerca de 3,9 bilhões de pessoas que vivem em países tropicais e subtropicais, principalmente nas grandes cidades (Guzman *et al.*, 2016). A partir da década de cinquenta, a infecção provocada pela dengue, bem como pela DHF e pela DSS, tem aumentado significativamente, e as taxas de incidência anual podem atingir uma escala de 100 milhões pessoas infectadas, 2 milhões de casos graves da doença, apresentando cerca de 30 mil mortes (Weaver *et al.*, 2004; Halstead, 2007; Gould e Soloman, 2008; Guzman *et al.*, 2016).

Existem fortes indícios de que a dengue era originalmente um vírus de macaco e que a transmissão entre espécies humanas ocorreu de forma independente para todos os quatro sorotipos (Holmes e Twiddy, 2003). Cepas silvestres de DENV-3 não foram identificadas na Malásia, mas a presença de anticorpos contra este sorotipo em macacos, na região, sugere que o ciclo silvestre também possa ter existido para este vírus (Rudnick, 1984).

O estudo genético de cepas da dengue silvestres indica que os quatro sorotipos da dengue evoluíram de um ancestral comum em populações de primatas e que, cerca de 500 anos atrás, todos os vírus surgiram separadamente em um ciclo de transmissão humana urbana (Halstead, 2007).

Embora, a dengue tenha alcançado sua distribuição nos trópicos, nos séculos XVIII e XIX, o fenômeno da globalização, durante os séculos XX e XXI, possibilitou a disseminação mais rápida e a introdução de múltiplos sorotipos virais em áreas mais propícias, tornando as regiões mais tropicais hiperendêmicas (que é, com múltiplos sorotipos virais co-circulantes). Essa rápida disseminação começou com uma pandemia de dengue no sudeste Asiático, na década de 1950, no período após a segunda Guerra Mundial, associado ao crescimento econômico e urbano da região (Gould e Soloman, 2008; Guzman *et al.*, 2016). A epidemia foi acelerada drasticamente, nos anos 1970 e 1980, com um surto endêmico de dengue, em Bangkok, com casos graves em 1970, o aparecimento da DHF e da DSS pela primeira vez na América do Sul e Central em 1981 (Gould e Soloman, 2008; Halstead, 2008).

O surto de 1977 em Cuba, com o sorotipo DENV-1, deixou uma grande parte da população afetada. Com base em resultados de inquéritos

sorológicos, mais de 44% da população foi infectada, mas, em sua maioria, apenas doenças leves foram relatadas, com os casos mais graves sendo de DHF. Uma ocorrência semelhante surgiu três anos mais tarde, quando o DENV-3 foi exposto em Havana. Os indivíduos com idades até 55 anos, que anteriormente tinham sido infectados com o DENV-1 em 1977, foram observados com infecções de quadros mais graves de DHF ou DSS (Gould e Solomon, 2008; Halstead, 2008).

Quatro anos depois, em 1981, um genótipo asiático do DENV-2 chegou ao país, levando milhares de casos evidentes de dengue, juntamente com um número de casos elevado DHF/DSS, estimado em 10.000 (Halstead, 2007; 2008).

Durante a epidemia DENV-2 em Cuba, a dengue hemorrágica teve um aumento no índice de casos registrados em adultos e crianças, levando a óbito em alguns casos. Depois de um longo período de tentativas sem sucesso do controle do mosquito, a transmissão da dengue, em 1997, do genótipo DENV-2 asiático foi reintroduzida em Santiago (Halstead, 2007, 2008).

5. Histórico da dengue nas Américas

A trajetória dos surtos de dengue, nas Américas, foi caracterizada por Brathwaite Dick *et al.*, (2012), que descreveram um histórico de surto de 1600 a 2010, que foi categorizado em quatro fases: introdução da dengue nas Américas (1600-1946), plano continental para a erradicação do *Ae. Aegypti*, marcado pela erradicação bem-sucedida do mosquito em 18 países continentais (1947-1970, reinfestação do *Ae. Aegypti*, causada pelo fracasso do programa de erradicação do mosquito (1971-1999), e aumento da dispersão de *Ae. aegypti* e circulação do DENV, caracterizada por um aumento acentuado no número de surtos (2000-2010) (San Martins *et al.*, 2010; Brathwaite Dick *et al.*, 2012).

Nas Américas, novos surtos de dengue ocorreram durante o período 2011-2017, foram, coincidentemente, observados após o grande movimento de pessoas causado por quatro eventos esportivos globais: os Jogos Pan-Americanos de 2011 em Guadalajara (México), a Copa das Confederações de

2013, a Copa do Mundo de 2014 e as Olimpíadas de 2016, todas no Brasil. Os eventos de surtos de dengue foram refletidos na taxa de mortalidade da doença (Figura 5).

Dengue Mortality Rate for Countries and Territories of the Americas, 1990 - 2017

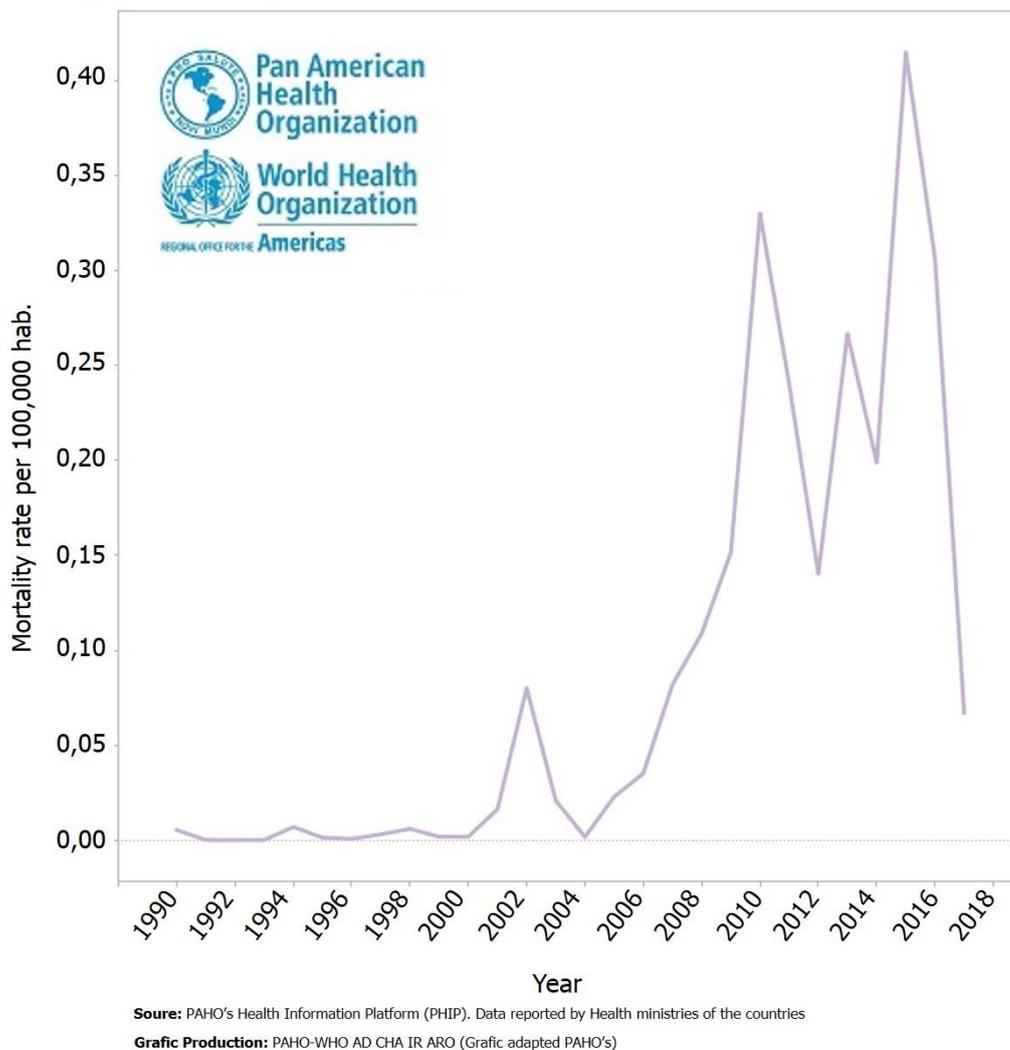


Figura 5– Taxa de mortalidade da dengue de 1990 a 2018.

O eixo X descreve o período a cada dois anos de anos, de 1990 a 2018. No eixo Y descreve a taxa de mortalidade por 100 mil habitantes. Fonte: PAHO's Plataforma del nformação da Saúde (PHIP), Dados reportados pelos Ministérios da Saúde dos Países. Modificado de PAHO, 2018 (Acesso 27 de fevereiro 2018).

Considerando os dados da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, 2018a), foram notificados 1.073.978 casos de dengue, 19.450 casos graves de dengue e 758 óbitos nas Américas, no final de 2011, com incidência média de 113 casos de dengue / 100.000 habitantes. Apesar do aumento histórico no número de casos de dengue relatado em 2011, o número de

casos, graves de dengue e de mortes foram reduzidos em aproximadamente 45% em comparação com o ano de 2010. No entanto, a taxa de casos fatais (TCF) manteve o mesmo valor (0,07%). A sub-região do Cone Sul registrou um total de 796.548 casos, contribuindo com 71% do total de casos. Surpreendentemente, o Brasil contribuiu com 95% do total de casos nessa região (756.720 casos notificados) (PAHO, 2018b).

Na semana epidemiológica (SE) final de 2012, foram registrados 1.162.998 casos em todo o continente, com uma incidência média de 120,7 casos / 100.000 habitantes. Os dados excederam o número total de casos notificados em 2011, com um grande aumento, aproximadamente 60%, no número total de casos graves (32.408) e um ligeiro aumento (aproximadamente 7%) no número total de mortes (807) em comparação até o ano de 2011. A sub-região do Cone Sul registrou um total de 639.348 casos, contribuindo com 54% do total de casos. O Brasil novamente contribuiu com 93% do total de casos nessa região (594.593 casos relatados) (PAHO, 2018b).

No final de 2013, houve um aumento significativo no número total de casos de dengue, registrando-se 2.384.234 casos de dengue e 1.403 óbitos. A incidência média de dengue foi de 245 casos / 100.000 habitantes. No entanto, é importante ressaltar que, embora tenha havido um aumento no número de casos de dengue, o número total de casos graves (37.692) e o de TCF permaneceram próximos aos valores observados em 2012. A sub-região do Cone Sul relatou um total de 1.627.453. casos, contribuindo com 68% do total de casos. De novo, o Brasil contribuiu com o maior número de casos nessa região, 1.473.645 casos, contribuindo com 90% do total de casos (PAHO, 2018b).

Em 2014, houve queda no total de casos de dengue para 1.171.029, 15.744 casos graves de dengue e 803 mortes foram relatadas. A incidência média de dengue foi de 194 casos / 100.000 habitantes. Apesar do aumento histórico no número de casos relatados desta doença, uma redução, de aproximadamente 50%, no número de casos , graves e de mortes foi relatada em 2014 em comparação com o ano de 2013. No entanto, o TCF manteve o mesmo valor (0,06%) (PAHO, 2018b).

Em 2015, houve aumento no número total de casos de dengue, registrando-se numero 2.430.178 casos de dengue com 1354 óbitos em todo o

continente, com uma incidência média de 245 casos / 100.000 habitantes. Os dados registrados superaram o total de casos relatados em 2014. No entanto, é importante ressaltar que, apesar do aumento no número de casos, o número total de casos graves (12.824) e o de TCF (0,05%) permaneceram bem abaixo dos valores observados durante o ano de 2014. Além disso, Brasil, Colômbia e México relataram a co-circulação simultânea de todos os quatro sorotipos do DENV. A sub-região do Cone Sul registrou um total de 1.054.188 casos, contribuindo com 87% do total de casos no continente, seguida da sub-região andina e da sub-região América do Norte e Central, contribuindo com 6% do total casos. O Brasil contribuiu com 85% do total de casos no continente (896.059 casos notificados) (PAHO, 2018b).

Em 2016, houve queda no número de casos de dengue, registrando-se 2.168.146 de casos, sendo 4.366 casos graves e 903 óbitos, para um TCF de 0,04%. A incidência média de dengue foi de 219 casos / 100.000 habitantes (PAHO, 2018b). A sub-região do Cone Sul relatou um total de 1.651.575 casos, e o Brasil contribuiu com 91% do total de casos (1.502.933 casos relatados) (Salles *et al.*, 2018)

Em 2017, apesar da queda histórica no número de casos da doença, foram relatados 577.697 casos, 4.366 casos graves e 903 óbitos, sendo a TCF mantida em 0,05%. A incidência média de dengue foi de 58,02 casos / 100.000 habitantes. Brasil, Colômbia e Guatemala relataram a co-circulação simultânea de todos os quatro sorotipos do DENV (PAHO, 2018b). A sub-região do Cone Sul relatou um total de 254.453 casos, contribuindo com 43% do total de casos, e o Brasil contribuiu com 99% do total de casos notificados (252.054 casos). O Brasil também relatou a cocirculação de outros arbovírus, como CHIKV, ZIKV e YFV (Salles *et al.*, 2018) É importante ressaltar que, no período 2011-2017, houve um aumento significativo (aproximadamente 30%) no número de casos de dengue, totalizando 10.851.043 em comparação com o período compreendido entre 2001-2010, que teve um total de 7.641.334 casos de dengue (PAHO, 2018a). Quando comparado com as décadas anteriores de 1980 a 2017, o período dos últimos sete anos contribuiu com 47% do número total de casos. Considerando os dados de dengue da PAHO, as taxas de incidência da doença ao longo das décadas 1980 a 2017 é apresentada na Figura 6 (PAHO, 2018b) e as taxas de mortalidade nas Américas, no mesmo

período, mostram que a mortalidade foi elevada nos últimos dez anos, entre 2007 à 2017 (PAHO, 2018; Salles *et al.*, 2018).

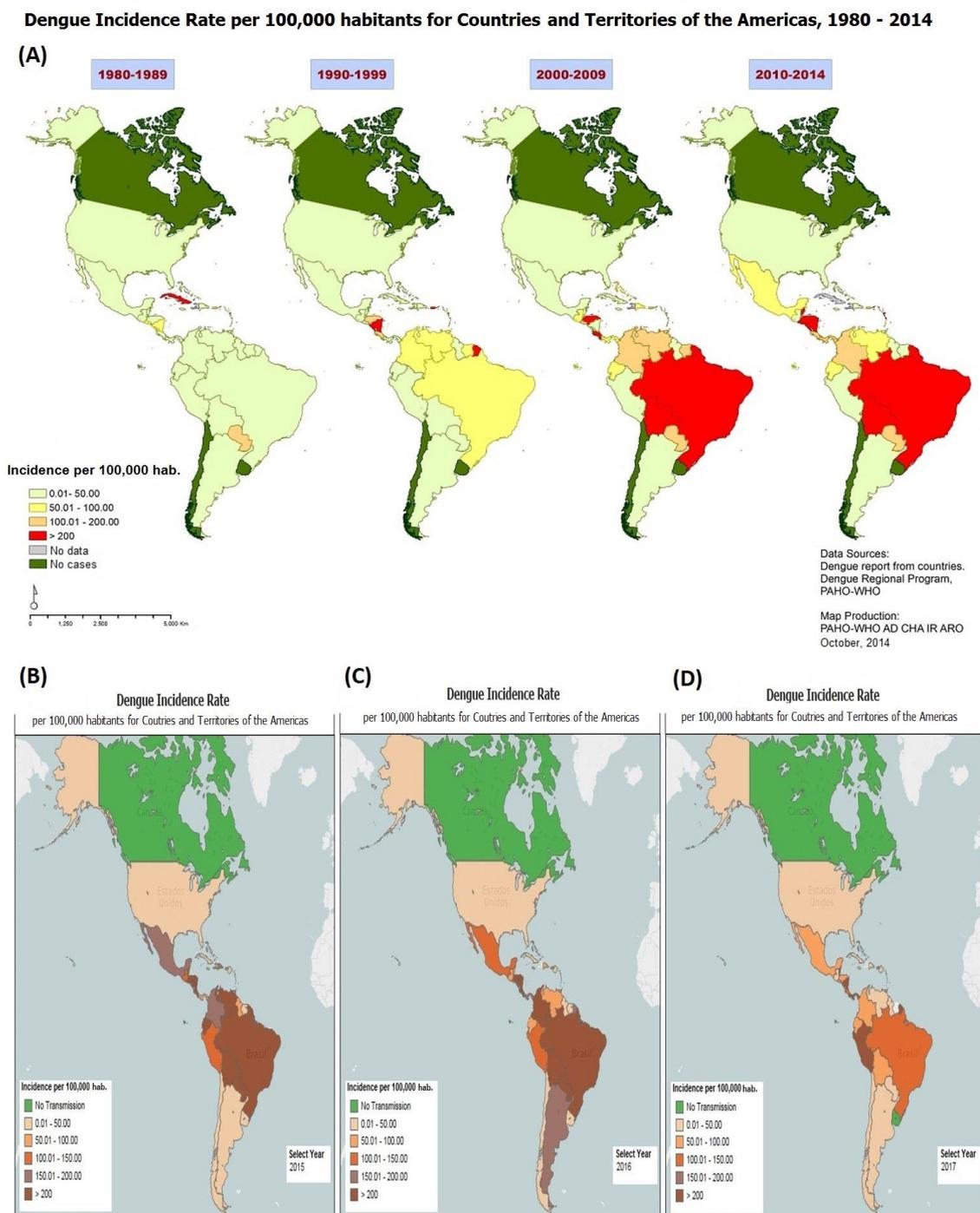


Figure 6: Taxa de incidência de dengue de 1980 a 2017.

Taxa de incidência de dengue: de 1980 a 2014. (A) em 2015 (B) em 2016. (C) em 2017 (D). Modificado de PAHO, 2018 (Acesso 27 fevereiro de 2018).

6. Histórico da dengue no Brasil

A referência mais antiga de dengue no Brasil foi feita durante o período colonial. O primeiro caso foi descrito na cidade de Recife, Brasil, em 1685. Sete anos depois, em Salvador, uma epidemia de dengue levou a 2.000 mortes. O surto de dengue, de 1846, também foi considerado uma epidemia, atingindo vários estados, como o estado do Rio de Janeiro e de São Paulo. Entre 1846 e 1916, São Paulo foi atingido por várias epidemias de dengue (Combate à dengue, 2010).

No início do século XX, Oswaldo Cruz implantou um programa de combate ao mosquito que se prolongou por anos. O grande medo da época estava relacionado às epidemias de febre amarela (Ministério da Saúde, 2010, Combate à dengue, 2010).

O *Ae. aegypti* chegou a ser erradicado no Brasil, na década de 1950, mas retornou na década de 1980, ocorrendo a primeira epidemia de dengue em Roraima. O *Ae. aegypti* persiste no Brasil até os tempos atuais (Ministério da Saúde, 2010). Durante a epidemia de Roraima, os sorotipos DENV-1 e 4 foram isolados. Em 1986, uma epidemia de dengue surgiu no Rio de Janeiro e em algumas áreas urbanas do Nordeste brasileiro, com disseminação do DENV-1 e relatos de mais de 50.000 casos. Em 1990, o DENV-2 foi introduzido no Rio de Janeiro, atingindo outras áreas do Sudeste do Brasil. Em 1998, houve uma pandemia com mais de 500.000 casos no Brasil (Ministério da Saúde, 2010). O vírus se espalhou por todo o país, com o maior número de casos tendo ocorrido no Nordeste. Em 2000, o DENV-3 foi isolado no Rio de Janeiro, e uma nova epidemia de dengue aconteceu entre 2001 e 2003. Vários estados, da região Sul, foram afetados com dengue pela primeira vez, com a maioria dos casos ocorrendo em pessoas com mais de 15 anos de idade. De fato, a doença geralmente afeta adultos jovens, devido ao aumento da exposição destes indivíduos em locais públicos, mas também pode ocorrer em crianças (Ministério da Saúde, 2010, Combate à dengue).

Em 2010, foram registrados 994.158 casos de dengue, seguido por uma baixa, em 2011, com registro de 753.487 de casos (PAHO, 2018). Seguida de uma outra redução, em 2012, com 589.591 casos em todo o Brasil, o Ministério

da Saúde apontou um aumento expressivo do número de casos de dengue, um total de 1.452.489, em 2013 (FIO-CRUZ, 2017), coincidente com a Copa das Confederações de Futebol no Brasil.

Em 2014, foram registrados 589.107 casos prováveis de dengue no país até o 47º SE (16 a 22 de novembro). A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis (312.318 casos, 52,8%) em relação ao total do país, seguida pela região Centro-Oeste (114.814 casos, 19,4%), Nordeste (90.192 casos, 15,3%), Norte (49.534 casos, 8,4%) e Sul (24.222 casos, 4,1%) (SVS, 2014).

Em 2015, ocorreram 1.587.080 casos prováveis de dengue no país, casos notificados, incluindo todas as classificações de sorotipos até o 48º SE (04 de janeiro a 05 dezembro). Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.047.279 casos, 62,0%) em relação ao total do país, seguido pelo Nordeste (327.212 casos, 19,4%), Centro-Oeste (231.105 casos, 13,7%), Sul (51.681 casos, 3,1%) e Norte (31.411 casos, 1,9%). Foram descartados 574.682 casos suspeitos de dengue no período (SVS, 2015).

Em 2016, até 49º SE (de 3 de janeiro a 10 de dezembro), houve 1.500.535 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 727,6 casos / 100 mil habitantes. Nesse mesma SE a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis (858.273 casos, 57,2%) em relação ao total do país, seguido pelo Nordeste (324.815 casos; 6%), Centro-Oeste (205.786 casos, 13,7%), Sul (72.650 casos, 4,8%) e Norte (39.011 casos, 2,6%) (SVS, 2016).

De 2017 até a 50º SE (01 de janeiro a 16 de dezembro), registrou-se um total de 249.056 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 120,9 casos / 100 mil habitantes e outros 240.070 casos suspeitos foram descartados. No mesmo período, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (86.110 casos, 34,6%) em relação ao total do país. As regiões do Centro-Oeste (77.600 casos, 31,2%), Sudeste (58.334 casos, 23,4%), Norte (22.260 casos, 8,9%) e Sul (4.752 casos, 1,9%). A análise da taxa de incidência de casos prováveis de dengue (número de casos por 100.000 habitantes). Segundo o MS, as regiões Centro-Oeste e Nordeste

apresentam as maiores taxas de incidência: 495,5 casos / 100 mil habitantes e 151,3 casos / 100 mil habitantes, respectivamente (SVS, 2017).

Em 2018 até o momento da saída do boletim da 34^o SE (de 31 de dezembro 2017 a 25 de agosto de 2018), registrou-se um total de 198.784 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 95,7 casos / 100 mil habitantes e outros 132.717 casos suspeitos foram descartados (SVS, 2018).

O número de casos de dengue e incidência da doença / 100.000 habitantes em diferentes Unidades da Federação (UF), do Brasil, por regiões, de 2011 a 2016, estão resumidos na Figura 7. O padrão de surtos endemo-epidêmicos de dengue, ocorrendo na frequência de três a cinco anos, foi mantido no Brasil até 2010 (Brathwaite Dick *et al.*, 2012), quando mudou para a cada dois anos (Arquivo adicional 1: Tabela S1 de Salles *et al.*, 2018), provavelmente, por causa do movimento de pessoas para os eventos esportivos mundiais que foram sediados no país (Salles *et al.*, 2018).

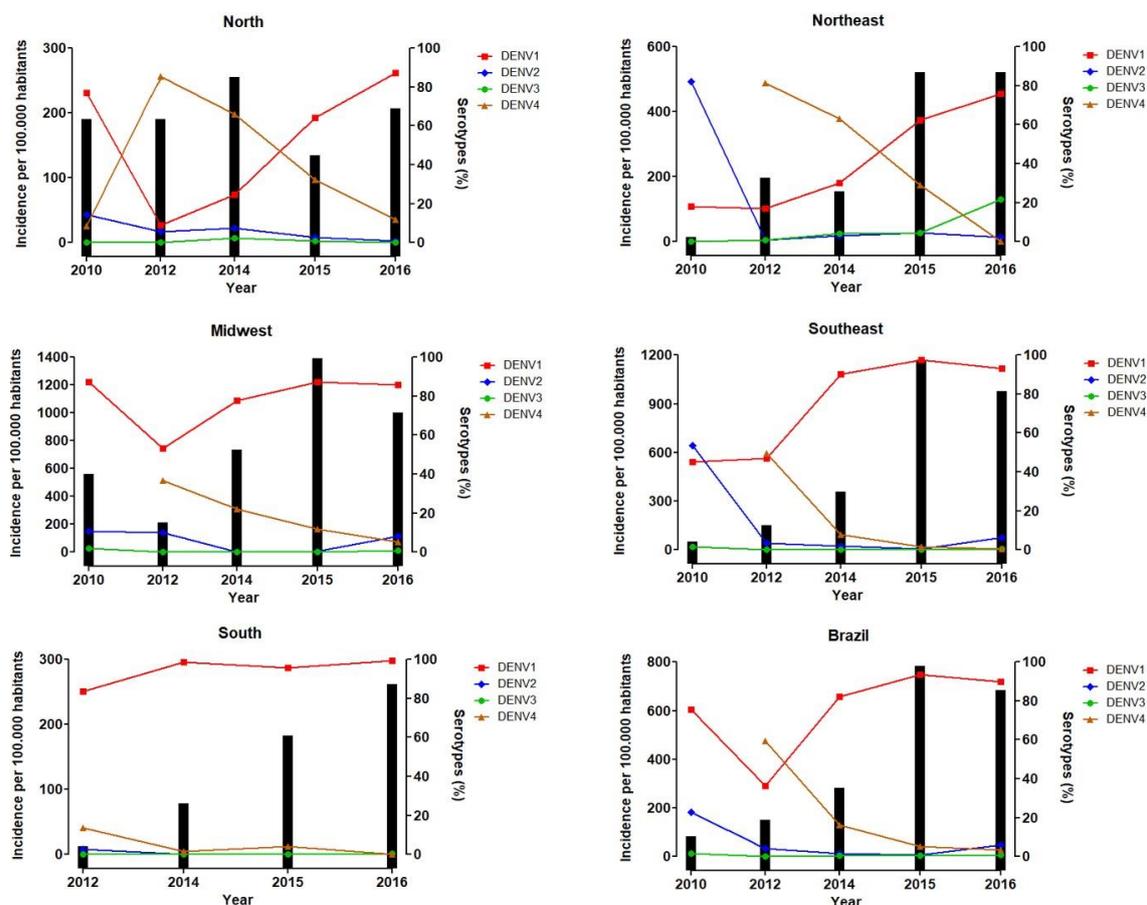


Figura 7 - Incidência de dengue associada aos sorotipos de DENV no Brasil de 2010 a 2016.

No eixo Y esquerdo, incidência de casos de dengue por 100.000 habitantes representada por barras. No eixo Y direito, percentual do sorotipo DENVs representada por linhas, ambos os dados no período de 2010 a 2016. Amostras analisadas pelos LACENs regionais. Os dados foram obtido no site do Ministério da Saúde do Brasil. Dados: até a 9^a semana SE e até a 27^a SE 2016. Modificado de Salles, et al., 2018).

6.1 Sorotipos circulantes no Brasil no século 21

O monitoramento dos casos de dengue é realizado com amostras de sangue suspeitas através do isolamento viral, seguido do ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) (PAHO, 2018b), feito nos Laboratórios de Referência Central Estaduais (LACENs) para a sorotipagem, permitindo a avaliação dos sorotipos circulantes de DENV. Os relatórios de monitoramento demonstraram que o DENV-3 predominou em vários estados brasileiros entre 2002 e 2006. De 2007 a 2009, uma mudança foi observada, e o DENV-2 substituiu o DENV-3 como o sorotipo predominante. Essa mudança levou a epidemias em vários estados, com aumento de casos graves em indivíduos com menos de 15 anos de idade (Ministério da Saúde, 2010). O monitoramento dos sorotipos circulantes, ao longo de 2009, revelou uma nova mudança no sorotipo predominante, com recirculação significativa de DENV-1, este tornou-se o sorotipo predominante em Roraima, no Mato Grosso do Sul e no Piauí a partir de 2008 (Ministério da Saúde, 2010).

A recirculação do DENV-1 alertou para a possibilidade de grande circulação desse sorotipo nos estados brasileiros, já que a população não esteve em contato com este sorotipo, desde a primeira década do século XXI. Com a introdução do DENV-2, já vinha sendo observado um aumento na proporção de formas graves da doença, particularmente em crianças e adolescentes, inclusive com uma maior demanda de internações hospitalares (Ministério da Saúde, 2010).

Em 2010, o monitoramento do DENV no Brasil indicou a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Figura 7). No entanto, notadamente, comparado com os outros sorotipos, o DENV-1 teve a maior incidência no Brasil, exceto na região Nordeste (que tinha menos de 200 casos / 100.000 habitantes) (Figura 7). Este sorotipo provavelmente afetou diretamente a situação epidemiológica com ocorrência de epidemias nas diferentes UFs (Ministério da Saúde, 2010).

A recirculação do DENV-1 foi uma situação potencialmente perigosa, pois poderia levar a um grande surto de doença nas UFs brasileira, já que a maior parte da população nunca havia estado em contato com esse sorotipo

antes, anteriormente o DENV-1 só havia aparecido na primeira década do século XXI. Com a circulação do DENV-2, também foi observado um aumento na proporção de casos graves da doença, particularmente em crianças e adolescentes, incluindo uma maior demanda por internações hospitalares (Ministério da Saúde, 2010).

De fato, dados disponíveis de agências de vigilância do governo brasileiro revelaram que um aumento no sorotipo DENV-1 foi relatado em 2010 e nos anos seguintes, com um padrão crescente similar de incidência de dengue (Figura 7).

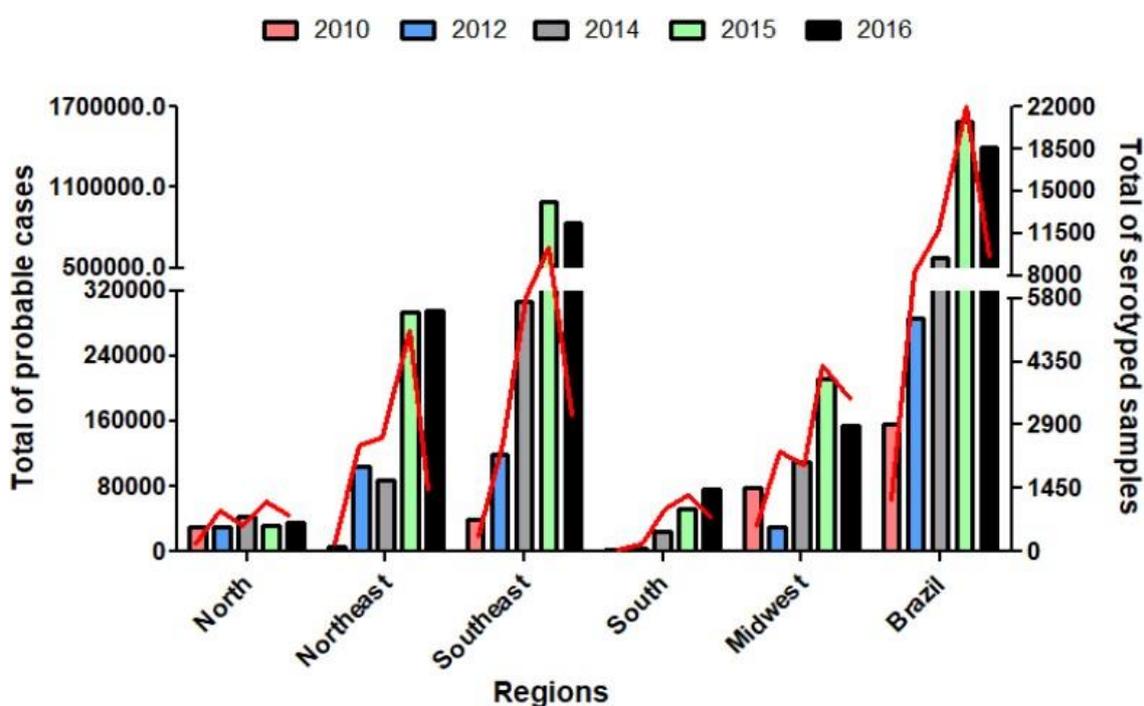


Figura 8 - Comparação entre o total de casos prováveis e amostras sorotipadas.

No eixo Y esquerdo o total de casos prováveis de dengue representados por barras, no eixo Y direito o total de amostras sorotipadas representada por linha, mas diferentes regiões do Brasil. O dados epidemiológicos da dengue disponibilizados pelo Ministério da Saúde do Brasil. Dados: até 9 ° SE de 2010 e até 27 ° SE de 2016. Adaptado de Salles *et al.*, 2018.

Em 30 de julho de 2010, a primeira amostra suspeita do sorotipo DENV-4 foi coletado pelo LACEN de Roraima e a amostra foi encaminhada ao Instituto Evandro Chagas (ECI), conforme protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde. Esse achado foi significativo, pois desde que o DENV-4 foi identificado há 28 anos no Brasil, esse sorotipo não foi mais observado ou

detectado. O ECI confirmou um total de três casos de dengue por DENV-4 em Roraima (O Globo, 03/08/2010), localizados na região Norte (Figura 8). Além disso, durante o surto de DENV-1 em março de 2011, sete pacientes com o sorotipo DENV-4 foram detectados na cidade de Niterói, no Rio de Janeiro, indicando a cocirculação de DENV-1 e 4 no Brasil (Campos *et al.*, 2013). A presença do DENV-4 propiciou o risco não apenas do desenvolvimento de manifestações mais graves, como a DHF, em pessoas previamente infectadas pelo DENV1, 2 ou 3, mas também a possibilidade de aumento de casos nos anos subsequentes. De fato, com exceção da região Sul, todas as outras regiões brasileiras apresentaram um rápido aumento na incidência do sorotipo DENV-4 com uma nova redução a partir de 2014 (Figura 7) (Salles *et al.*, 2018).

Em 2015, uma nova recorrência de DENV-2 foi observada, especialmente na região Nordeste, levando a 1.365 casos de dengue grave e 18.619 casos de dengue clássica no Brasil. Apesar do aumento das infecções pelo sorotipo DENV2 em relação ao mesmo período de 2015, o DENV2 representou 6,4% do total de 2.204.000 casos da doença registrados entre janeiro e junho de 2016. No mesmo período, 318 óbitos relacionados à dengue foram confirmados. Os dados do último Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde apontam que, até o 49º SE de 2016, foram confirmados 826 casos de dengue grave e 8166 casos de dengue (SVS, 2016). No mesmo período de 2015, ocorreram 1680 casos de dengue grave e 21.155 casos de dengue (SVS, 2016; SBMT, 2016).

O boletim de 2016 confirmou 609 mortes por dengue, representando 6,8% do total de casos. Embora o número de mortes por dengue tenha sido menor em 2016 do que em 2015, 972 mortes foram confirmadas. Os dados também destacam que 2016 teve o segundo maior número de casos de dengue no Brasil desde 1990, quando os dados começaram a ser registrados no Brasil, seguidos apenas por 2015 (SBMT, 2016). Notavelmente, como percentual do número total de casos, as mortes de 2015 foram menores (4,3% do total de casos) do que as de 2016. Esse achado, possivelmente, está relacionado ao elevado número de pessoas infectadas com DENV1 que também podem ter sido infectadas pelo DENV2 nos últimos anos (Figura 8), aumentando o número de casos graves. Uma vez infectado por um sorotipo, o

paciente é imune apenas àquele sorotipo específico, entretanto, há um risco maior de apresentar uma manifestação mais grave da doença durante uma segunda infecção por outro sorotipo (SBMT, 2016). Atualmente, todos os quatro sorotipos circulam ao longo do ano no Brasil. Quando a detecção de um sorotipo aumenta em uma determinada região, o efeito é observado no local e pode permanecer limitado a essa região, dependendo da localização geográfica e do movimento da população na área (por exemplo, se muitos indivíduos viajam para a cidade). Além disso, as epidemias acometem regiões que não foram afetadas pelas últimas epidemias de um certo sorotipo, de modo que a população é suscetível em determinada região, mas a população dos municípios ao seu redor não são suscetíveis (Salles *et al.*, 2018).

O monitoramento laboratorial é vital para a avaliação dos sorotipos circulantes, o que fornece aos órgãos do governo brasileiro dados importantes para estabelecer estratégias voltadas ao combate a dengue, por meio do controle de vetores, com o objetivo de minimizar possíveis surtos de doenças.

A figura 8 mostra que o aumento da sorotipagem da dengue é proporcional ao número de casos de dengue notificados em diferentes regiões, embora a porcentagem de sorotipagem ainda seja menor em relação ao total de casos. Um máximo de 7% do total de casos de dengue foi sorotipado de 2010 a 2016; essa porcentagem de sorotipagem insuficiente subestima, claramente, o número real de casos de dengue que ocorre no Brasil (Figura 9) (Salles *et al.*, 2018).

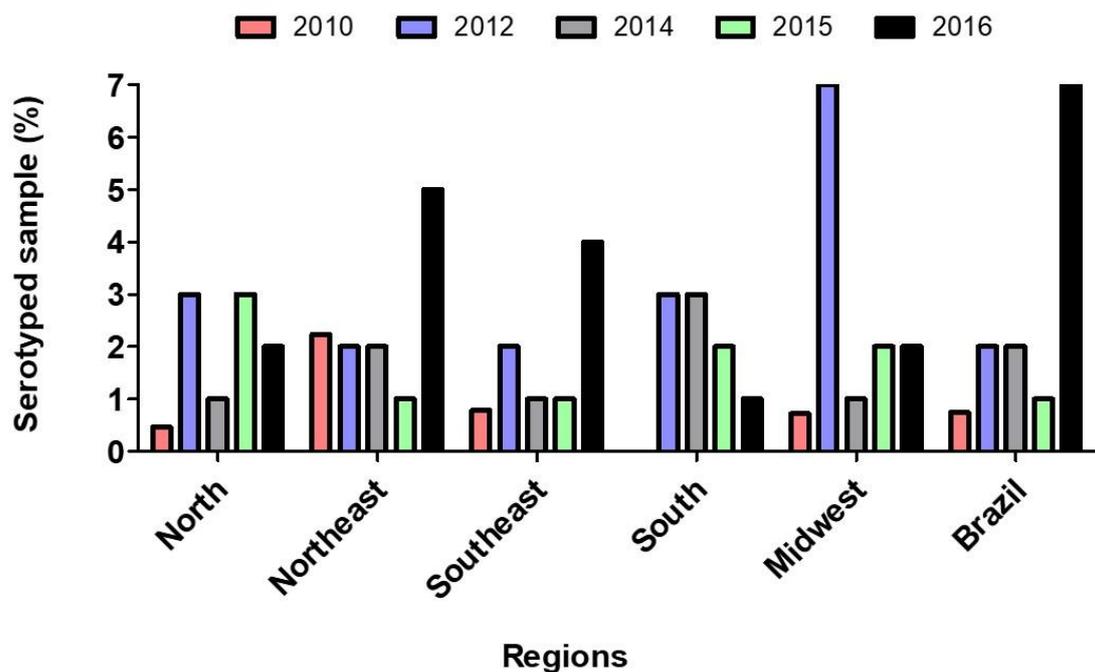


Figura 9 – Total de amostras sorotipadas (%) em diversas regiões do Brasil de 2010 a 2016.

O percentual total de amostras sorotipadas foi calculado em relação ao total de casos prováveis observados em cada região para cada ano, utilizando dados do Ministério da Saúde do Brasil até a 9ª semana de epidemiológica e de 2010 e até 27ª semana de epidemiológica de 2016. Modificado de Salles et al., 2018.

7. Patologia e Manifestação Clínica da Doença

A infecção pelo DENV pode resultar em uma série de manifestações clínicas. A dengue é uma doença dinâmica, apesar de sua curta duração, não ultrapassa o período de mais de uma semana com sintomas característico, em 90% dos casos. Sua manifestação clínica pode variar pouco com o passar dos dias e também pode piorar repentinamente (Guzman *et al.*, 2016). A doença pode evoluir em três fases: a fase febril aguda (observada na maioria dos pacientes) e as fases crítica e de recuperação (convalescência) (WHO, 2009).

A febre ocorre durante a fase aguda e geralmente é a primeira manifestação clínica da doença apresentando intensidade variável. Podendo estar associada com dores de cabeça e vômitos, além de dores no corpo. Em crianças, a febre é freqüentemente a única manifestação clínica ou pode está associada a erupções cutâneas e / ou sintomas digestivos inespecíficos. A

faringe pode ficar avermelhada, mas outros sinais e sintomas do sistema respiratório não são freqüentes ou clinicamente significativos. Dor abdominal leve e diarréia podem aparecer, a diarréia ocorre freqüentemente em doente com idade menor que dois anos e adultos. Em geral, crianças, adolescentes e adultos apresentam uma “síndrome semelhante à gripe” (incluindo mal-estar, dores de cabeça e no corpo) com sintomas digestivos mais proeminentes do que sintomas respiratórios, se ocorrer. Durante a fase febril, a contagem de leucócitos geralmente diminui. Podendo estar presente um quadro de petéquias (pequenas manchas na pele causadas por capilares fragilizados) ou equimoses (grandes pontos hemorrágicos subcutâneos) (Figura 10), com ou sem trombocitopenia. A maioria dos pacientes com dengue se recupera após o período de desaparecimento de febre, no entanto, o estado clínico de alguns pacientes pode piorar quando a febre diminui, nesse caso, o período durante o qual a febre desaparece indica o início da fase crítica (Guzman *et al.*, 2016).



Figura 10 – Erupção cutânea pelo Vírus da Dengue.

Manifestação clínica com uma erupção cutânea de dengue em uma criança da Malásia. Imagem modificada de Gould e Soloman, 2008.

A fase crítica coincide com o vazamento de plasma que pode levar ao choque, que se caracteriza por frieza nos tegumentos, pulso fraco, enchimento capilar tardio, taquicardia, oligúria e hipotensão. O choque é causado pelo baixo volume sanguíneo (hipovolêmia). No início, nem todos os sinais clínicos de choque são observados e, neste cenário, o choque pode ser detectado por

um estreitamento da tensão arterial diferencial ou pressão de pulso (uma diferença de 20 mmHg entre a tensão arterial máxima ou sistólica e tensão arterial mínima ou diastólica). Nesta fase, os pacientes geralmente têm uma face avermelhada, o tronco quente, extremidades frias e úmidas, sudorese, preenchimento venoso lento, agitação, irritabilidade, dor no abdômen superior e médio e diminuição do débito urinário. Além disso, os pacientes podem exibir também sinais de hemóstase prejudicada, incluindo petéquias dispersas na testa e cianose circunferencial e periférica (descoloração da pele, para azul). Hemorragia gastrointestinal ocorre em < 10% dos pacientes e, geralmente, ocorre após período de choque hipotensivo não corrigido. Pacientes em choque também apresentam uma respiração rápida e potencialmente difícil, um pulso fraco com batimento cardíaco acelerado e um quadro de sudorese intenso. Por último, o fígado fica geralmente firme, sensível e podem se alargar entre 4 a 6 cm abaixo da margem costal, o nível do hematócrito é aumentado e plaquetas, que estavam diminuindo progressivamente, atingem sua menor contagem. Os pacientes que se recuperam, a fase crítica, descrita anteriormente, dura normalmente entre 24 e 36 horas, seguida por uma rápida fase de convalescença. Algumas vezes, na fase de convalescença pode ocorrer sérias complicações, como encefalopatia, bradicardia, extorsão ventricular e, raramente, miocardite e encefalite (Guzman *et al.*, 2016).

De acordo com a classificação clínica da OMS após o ano de 2009, um paciente pode ter dengue com ou sem sinais de alerta ou dengue grave (Figura 11), destacando que a gravidade é considerada como um segundo passo da evolução da doença (WHO, 2009). Em outras palavras, a dengue é individualmente única por ser considerada uma doença tanto sistêmica quanto dinâmica (Guzman *et al.*, 2016).

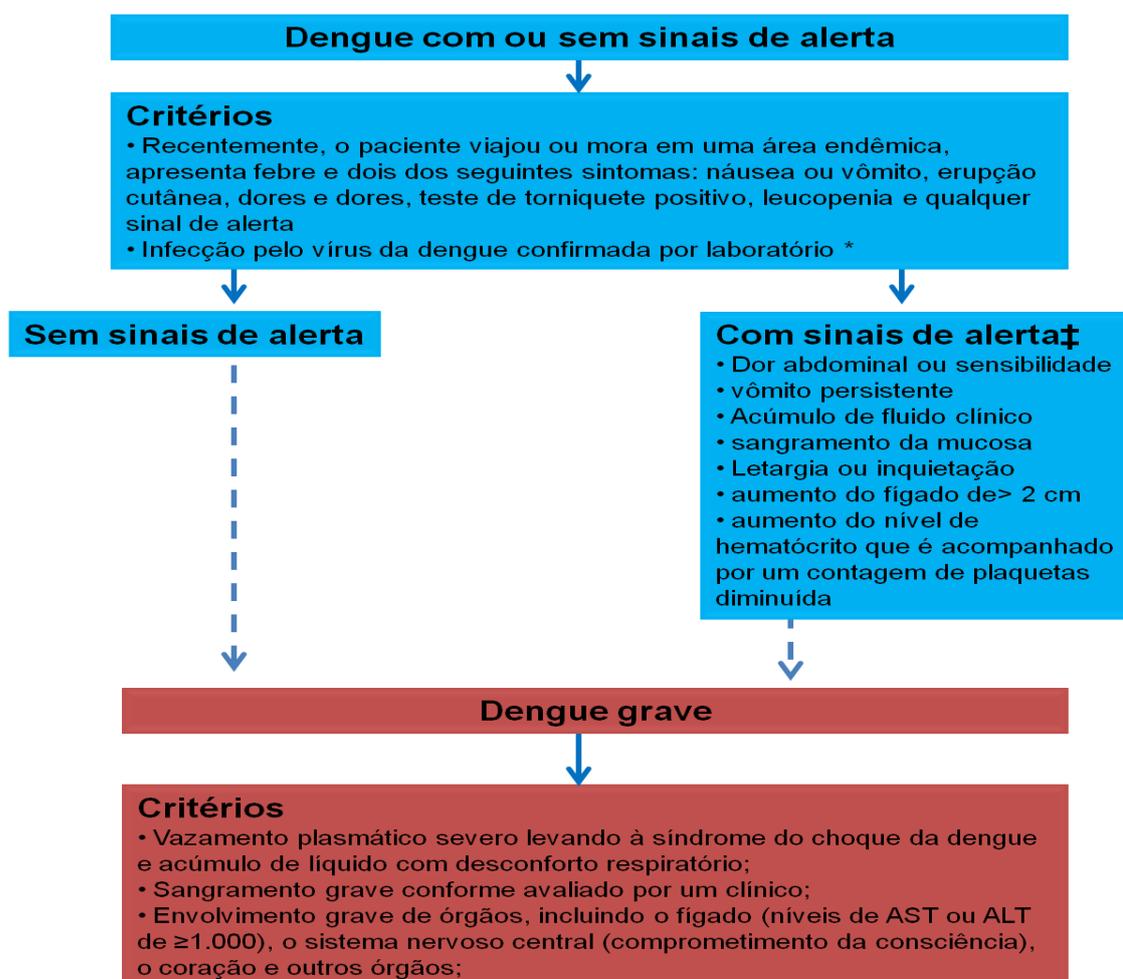


Figura 11 – Classificação clínica da dengue de 2009.

Os critérios para classificação da dengue com ou sem sinais de alerta e para dengue grave. Setas tracejadas indicam que nem todos os pacientes evoluem para o caso de dengue grave. *Importante quando não há sinal de vazamento de plasma. ‡ Requer observação rigorosa e intervenção médica. ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase. Modificado de WHO, 2009 e Guzman *et al.*, 2016.

Até o período de 2009, a OMS prestava atenção nos casos de dengue. Embora, a doença fosse conhecida há mais de 200 anos, somente nos últimos 50 anos, surtos da DHF e DSS foram reconhecidos como diferentes síndromes clínicas. O grau de extravasamento vascular e a manifestação hemorrágica,

geralmente, eram diferenciados nestas síndromes. A apresentação atípica clínica pode incluir doença hemorrágica fulminante com falência de órgãos e encefalopatia (Ministério da Saúde, 2010).

8. Estrutura da partícula viral

O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica, onde se encontram inseridas duas glicoproteínas, a proteína de Envelope (E) e a proteína de Membrana (M). Este envelope circunda o nucleocapsídeo (NC), que consiste de um único filamento do genoma RNA fita simples de senso positivo com várias cópias de uma pequena proteína capsídica (C) de caráter básico (**Figura 12**) (Lindenbach e Rice, 2001).

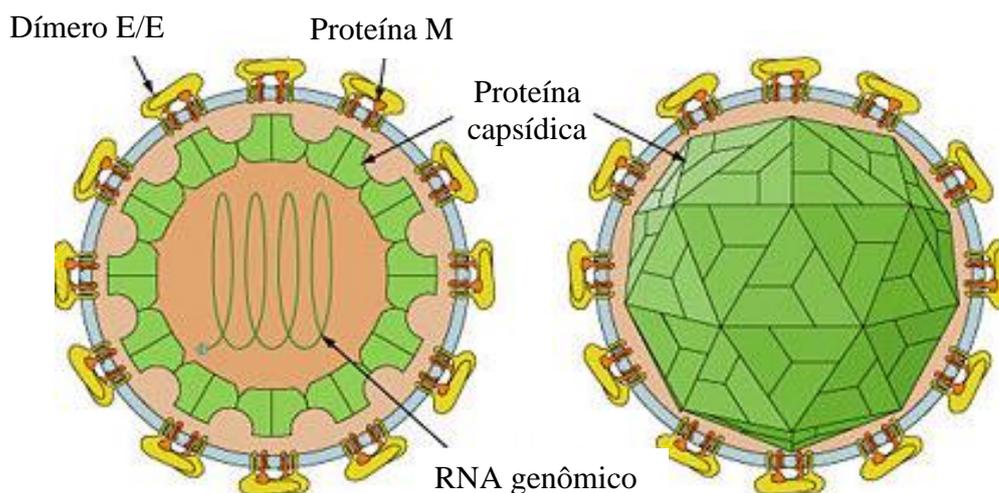


Figura 12 - Representação esquemática da estrutura do Vírus da Dengue maduro.

O DENV é um vírus esférico e envelopado, apresentando um diâmetro de aproximadamente 50 nm. Os domínios compostos por um dímero da glicoproteína, dispostos paralelamente ao envelope está mostrado na cor amarela. A proteína M está mostrada na cor laranja, e o capsídeo protéico e o RNA fita simples senso positivo estão mostrados na cor verde. Modificado de Slonczewski e Foster, 2009.

Acredita-se que a entrada deste vírus na célula hospedeira ocorra por um mecanismo de endocitose mediada por um receptor celular ainda desconhecido. Dentro da célula hospedeira, o baixo pH da via endocítica induz o rearranjo da proteína E, facilitando a fusão do envelope viral com a

membrana endossomal (Figura 13), processo que permite a liberação do NC no citosol. Todo este evento favorece a desmontagem do NC, e o genoma viral é liberado no citoplasma (Lindenbach e Rice, 2001, Guzman, *et al.*, 2016).

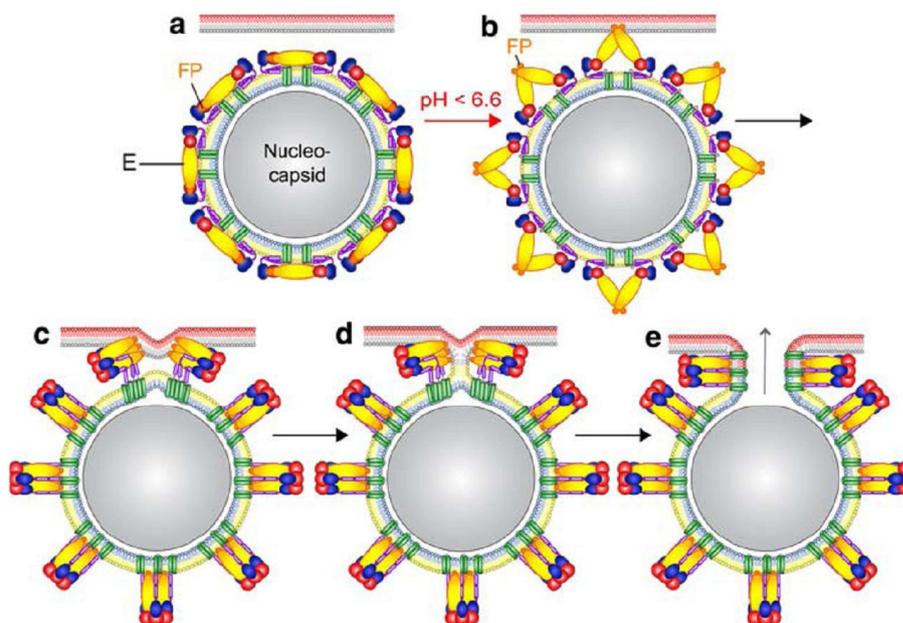


Figura 13 – Esquema das etapas do processo de fusão de Flavivírus.

Desenho esquemático da configuração da proteína E sobre a superfície dos vírions, em um pH neutro, no estado de pré-fusão (a) dissociação dos dímeros da proteína E em monômeros induzida pelo baixo pH, havendo projeção dos monômeros com exposição e interação dos peptídeos de fusão com a membrana alvo (b) formação do trímero (c) formação do intermediário de hemi-fusão com mistura dos folhetos externos (d) formação do estágio final de pós-fusão e abertura do poro de fusão (e). Proteína E na cor amarela; membrana viral: folheto externo em amarelo, folheto interno em azul; membrana alvo: folheto externo em preto, folheto interno em vermelho. Modificado de Stiasny, *et al.*, 2009.

A estrutura viral é muito dinâmica, visto que, mudanças conformacionais nas partículas virais são necessárias para que o vírus entre e infecte a célula hospedeira. As glicoproteínas de muitos vírus envelopados com potencial de fusão de membrana são sintetizadas como precursores inativos que requerem uma clivagem proteolítica. Nesse caso, a clivagem da proteína precursora gera uma forma metaestável, que sofre uma mudança conformacional em pH ácido, induzindo assim a fusão do envelope lipídico viral com a membrana de uma célula hospedeira. No entanto, a ativação proteolítica da proteína E envolve a

clivagem de outra proteína auxiliar, a proteína pr-M, que protege a proteína E contra mudanças conformacionais precoces, para que não ocorra fusão antes da maturação do vírus (Yu *et al.*, 2008).

9. O genoma e as proteínas virais

Os *Flavivirus* são partículas de aproximadamente 500 Å de diâmetro compostos por um único genoma de RNA fita simples senso positivo, empacotado por um capsídeo protéico e envolvido por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, que apresenta cerca de 180 cópias de dois tipos de glicoproteínas, as proteínas de envelope (E) e de membrana (M) (**Figura 12**) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Whitehead *et al.*, 2007).

O genoma viral, de aproximadamente 10,8 Kb, tem uma codificação de leitura aberta e codifica uma única poliproteína. A porção aminoterminal do genoma codifica as três proteínas estruturais que constituem a partícula viral: capsídica (C), de membrana (M), e de envelope (E), sendo que M é expressa inicialmente na forma de um precursor, prM (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). A porção carboxi-terminal do genoma codifica as oito proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5, todas essenciais para auxiliar na replicação viral (Figura 14) (Lindenbach e Rice, 2001).

O genoma viral apresenta três papéis distintos dentro do ciclo viral, atua como o RNA mensageiro (mRNA) para tradução de todas as proteínas virais, como modelo durante a replicação do RNA e como material genético empacotado dentro de novas partículas virais. As proteínas virais são produzidas como uma única cadeia longa de poliproteína simples com mais de 3.000 aminoácidos, posteriormente clivada por uma combinação de proteases do hospedeiro e viral (NS2B e NS3) (Figura 15) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Whitehead *et al.*, 2007).

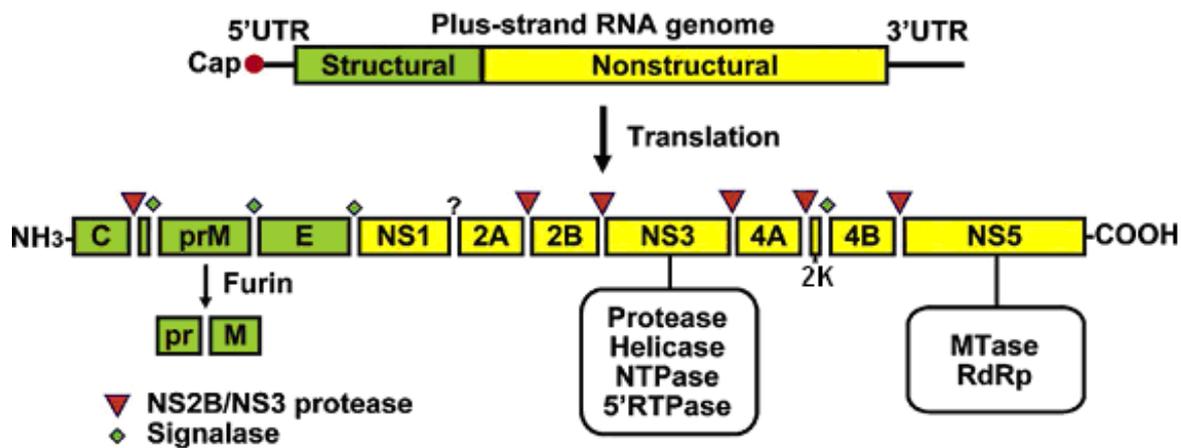


Figura 14 – Representação esquemática da organização do genoma e do processamento da poliproteína dos Flavivírus.

Genoma RNA de fita simples sentido positivo contém região aberta de leitura (ORF) que codifica proteínas estruturais – Capsídica (C), precursor de Membrana (prM) e Envelope (E) – e não-estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5. ORF é rodeado por regiões não traduzidas. Os sítios de clivagem da poliproteína pela NS2B-NS3 viral e pelas enzimas sinalase e furina do hospedeiro estão indicados. As atividades enzimáticas de NS3 e NS5 também estão mostradas. Modificado de Sampath e Padmanabhan, 2009.

As proteínas estruturais são codificadas na porção N-terminal da poliproteína, seguidas pelas proteínas não estruturais (NS), no restante da sequência, que codifica uma serino protease, uma RNA helicase e uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd), cujas sequências são encontradas em locais semelhantes dentro de todas as poliproteínas dos três gêneros do *Flavivírus*. As atividades de helicases foram demonstradas ou previstas para vários vírus de RNA de fita positiva, apresentando um papel preciso durante a replicação do RNA (Lindenbach e Rice, 2001; Munoz-jordan *et al.*, 2005; Guzman *et al.*, 2016).

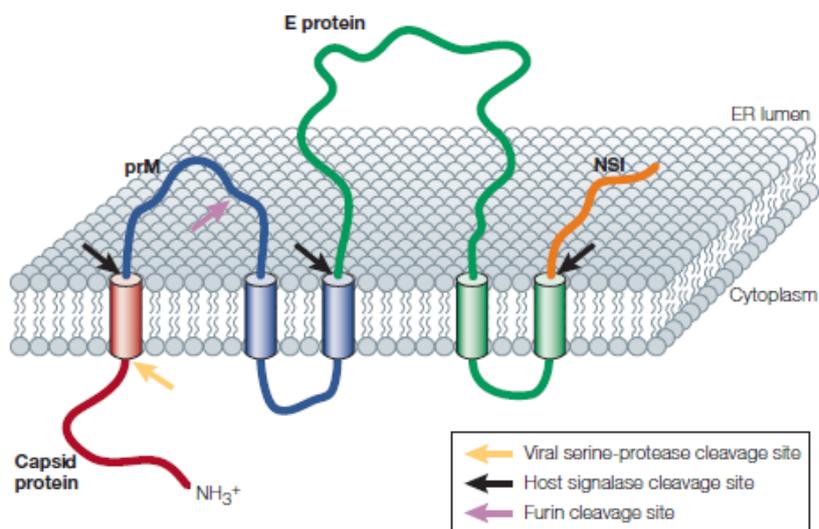


Figura 15 - Topologia da membrana e clivagem das proteínas estruturais e da NS1 dos *Flavivírus*.

A orientação prevista das proteínas estruturais através da membrana do retículo endoplasmático. As α -hélices transmembranares são indicadas pelos cilindros coloridos, as setas indicam os sítios de clivagem pós-traducionais e os sítios de clivagem de enzimas específicas são indicados por setas de cores diferentes. A seta amarela indica o sítio de clivagem da serino-protease viral, a seta preta indica o sítio de clivagem da sinalase do hospedeiro e a seta roxa indica o sítio de clivagem da furina. Na cor verde está representada a proteína de envelope (E), em laranja, a proteína NS1, em azul, o precursor da proteína de membrana (prM), e, em vermelho, a proteína capsídica (C). Modificado de Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

Durante a tradução da poliproteína, as proteínas estruturais são translocadas e ancoradas no retículo endoplasmático (RE) por várias sequências sinais de domínio âncora de membrana. As proteínas NS são liberadas e direcionadas para o local de replicação nos pacotes de vesículas derivadas do RE para iniciar a transcrição. A proteína NS1 é inicialmente expressa em associação com o RE, o monômero é modificado pela adição de moléculas de carboidratos ricos em manose, resultando em associação de membrana (Guzman *et al.*, 2016). A proteína do capsídeo contém uma sequência sinal hidrofóbica em seu C-terminal, que transloca a prM (precursora de M) dentro do lúmen do RE de seu local de síntese para a superfície do RE. A proteína prM tem dois domínios de abrangência transmembranares que contém um ponto de transferência de sequência em uma sequência sinal.

Como consequência, a proteína E também é translocada para o lúmen do RE (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Após a clivagem proteolítica satisfatória, a proteína C e o RNA viral se localizam no citoplasma, entretanto, a proteína capsídica ainda permanece associada com a membrana do RE. Depois de alguns minutos da tradução, as proteínas E e prM formam heterodímeros estáveis sendo incorporadas na membrana RE, com o nucleocapsídeo recém-formado, à medida que ele se insere dentro do lúmen do RE para formar uma partícula imatura (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Guzman *et al.*, 2016).

9.1. As Proteínas estruturais

9.1.1. A Proteína Capsídica

A proteína capsídica (**C**) 11 KDa, consiste em aproximadamente 120 aminoácidos e sua principal função é empacotar e proteger o genoma viral, formando o nucleocapsídeo. Esta proteína apresenta muitos resíduos carregados e é composta por uma sequência interna hidrofóbica que medeia a associação com a membrana. A proteína C nascente também contém uma âncora C-terminal que serve como um peptídeo sinal para translocar a prM para RE. Este domínio hidrofóbico é clivado pela serino-protease viral para gerar a proteína C madura (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Solanki *et al.*, 2017).

9.1.2. A glicoproteína de Membrana (M)

A glicoproteína prM 26 KDa, apresenta aproximadamente 165 aminoácidos, sendo precursora da proteína M (~ 75 aminoácidos). Ela pode funcionar como uma chaperona que auxilia o enovelamento e a montagem da proteína E. prM é processada por uma protease celular, sendo translocada para dentro lúmen do RE pelo domínio hidrofóbico C-terminal da proteína C. A clivagem C-prM pela sinalase no sítio N-terminal gera um sinal que produz uma proteína C madura. No entanto, prM se associa com E em seu sítio C-terminal, formando um heterodímero (Lindenbach e Rice, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Sampath e Padmanabhan, 2009; Solanki *et al.*, 2017).

A região N-terminal da prM contém de 1 a 3 sítios de N-glicosilação e 6 resíduos de cisteína conservados e ligados por pontes de dissulfetos. A proteína prM auxilia como uma chaperona na conformação adequada da proteína E. O domínio C-terminal da proteína prM age sobre a proteína E como um sinal para que seja retida pelo RE, podendo auxiliar em sua heterodimerização (E-prM). Uma das principais funções da prM é proteger a proteína E para que não sofra mudança conformacional, precocemente, para a forma fusogênica, durante o trânsito através da via secretória, devido ao pH levemente baixo (Lindenbach e Rice, 2001). A clivagem da prM em fragmentos pr e M ocorre na via secretória pela protease furina presente na rede transgolgi. Esta mudança pós-traducional caracteriza a formação de uma partícula infecciosa madura (Lindenbach e Rice, 2001; Mairiang et al., 2013; Solanki et al., 2017).

9.1.3. A Glicoproteína de Envelope

A glicoproteína de envelope (E) tem aproximadamente 495 aminoácidos e contém um sítio de fusão à célula, representado por um fragmento hidrofóbico de 9 a 11 resíduos, o peptídeo de fusão. A proteína E é a principal proteína presente na superfície do envelope dos vírus da família *Flavivírus*, apresentando duas funções principais: atua no reconhecimento celular, através ligação do vírus ao receptor celular, e é fundamental para o processo de fusão que ocorre entre a membrana celular e o envelope viral, através da exposição do peptídeo de fusão (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A proteína E contém 12 resíduos de cisteína, conservados na forma de ligações dissulfeto. Em muitos vírus, a proteína E é encontrada na forma N-glicosilada. Como foi mencionado anteriormente, a estabilização apropriada do enovelamento correto da proteína E e sua secreção, em pH baixo, depende diretamente da coexistência com a prM (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

A proteína de envelope E é uma glicoproteína que fica paralela ao envelope viral e contém apenas duas α -hélices. Sua forma nativa (Figura 16) dobra-se em uma conformação alongada rica em folhas- β formando uma estrutura em fitas- β paralela, que se estende paralelamente ao envelope viral. Cada subunidade da proteína E é composta por três domínios. O domínio I

constitui um cilindro de folhas- β ; o domínio II apresenta projeções alongadas sobre a superfície do vírus, além de regiões transmembranares da subunidade homodimérica; e o domínio III apresenta uma conformação que o assemelha a uma imunoglobulina. O peptídeo de fusão, que medeia a inserção na membrana da célula alvo, está localizado na ponta do domínio II, na periferia da região transmembranar, enquanto o domínio III parece estar envolvido na ligação ao receptor e é um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes (Lindenbach e Rice, 2001).

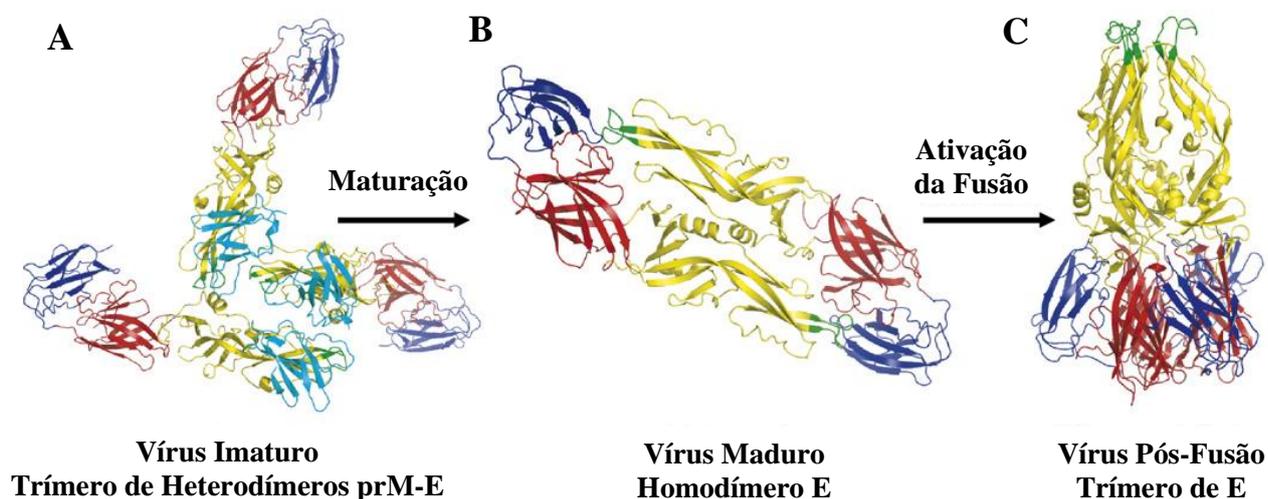


Figura 16 – Estrutura do ectodomínio da proteína E dos Flavivírus e seus diferentes estados oligoméricos.

Estado oligomérico da proteína E na partícula imatura (A), na partícula madura (B) e na conformação fusogênica (C). Na partícula imatura, a proteína E forma um trímero de heterodímeros prM-E, que deve se dissociar e formar homodímeros de proteína E durante a maturação. Em seguida, ocorre uma reorganização para formar homotrímeros de proteína E anterior ao processo de fusão e entrada do vírus na célula. Em um monômero da proteína E, os domínios I, II e III estão coloridos em vermelho, amarelo e azul, respectivamente, e o peptídeo de fusão está mostrado em verde. A proteína prM, colorida em ciano, só é encontrada nos vírus imaturos e está mostrada em seu papel como uma estrutura protetora do peptídeo de fusão. Extraído de Perera *et al.*, 2008.

9.2. As Proteínas Não Estruturais

9.2.1 A Proteína NS1

A glicoproteína NS1 tem aproximadamente 46 kDa e é translocada para dentro do RE durante a síntese da proteína E, sendo clivada pela peptidase sinal do hospedeiro, uma enzima desconhecida que reside no RE do hospedeiro e cliva as junções NS1/ NS2A (Lindenbach e Rice, 2001).

Embora seu papel na replicação do RNA ainda esteja incerto, sabe-se que NS1 apresenta sítios de replicação do RNA, e uma mutação nos sítios de N-glicosilação que pode levar a uma deficiência dramática na replicação do RNA e na produção de vírus. Da mesma forma, a função da NS1 em compartimentos extracelulares ainda não está clara. No entanto, durante a infecção, uma forte resposta imune humoral é feita contra esta proteína, onde os anticorpos contra a molécula apresentada na superfície celular podem direcionar a lise mediada pelo sistema complemento das células infectadas pelos vírus (Lindenbach e Rice, 2001; Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017).

9.2.2. As Proteínas NS2A e NS2B

A proteína NS2A é relativamente pequena, com aproximadamente 22 kDa, além de ser uma proteína hidrofóbica. Sua região N-terminal é gerada a partir da clivagem entre as proteínas NS1-NS2A por uma enzima ainda desconhecida, que reside no RE do hospedeiro (Lindenbach e Rice, 2001; Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017).

Clivagens citosólicas na junção entre NS2A-NS2B pela serino-protease NS2B/NS3, esta protease pode decompor um sítio da NS2A para gerar uma forma C-terminal menor chamada de NS2A α . Mutação no local da clivagem NS2A a NS2A α em YFV apresentou evidências de que esta proteína está envolvida na montagem do vírus e uma mutação na NS2A bloqueia a produção

vírus. Entretanto, este bloqueio pode ser suprimido por uma segunda mutação na superfície do domínio NS3 helicase. Da mesma forma, uma mutação na proteína NS2A em KUNV (Vírus Kunjin) também impediu a montagem do vírus (Lindenbach e Rice, 2001).

NS2B também é uma proteína pequena, com aproximadamente 14 kDa, sendo uma proteína integral de membrana (Clum *et al.*, 1997; Sampath e Padnanabhan, 2009) A NS2B forma um complexo estável com a NS3 e atua como um co-fator para a serino-protease NS2B/NS3. A atividade do co-fator se encontra em um peptídeo central que intercala dentro do domínio da serino-protease, semelhante ao co-fator NS4A do vírus hepatite C. Uma mutação de resíduos conservados da NS2B pode ter efeitos dramáticos sobre a autoclivagem proteolítica na junção entre NS2B/NS3 (Lindenbach e Rice, 2001; Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017).

9.2.3. A Proteína NS3

A proteína NS3 é uma proteína relativamente grande, com aproximadamente 70 kDa, com diversas atividades necessárias ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA viral, atuando como uma proteína multifuncional, uma protease de serina no N-terminal que é de 170 aminoácidos e uma Helicase no C-terminal ou uma RNA trifosfatase de 440 aminoácidos (Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017). O terceiro domínio N-terminal da proteína catalisa o complexo serina-protease NS2B/NS3. Além disso, a clivagem das junções NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5, o C-terminal da proteína capsídica madura e NS4A também é gerada pela ação da protease NS2B/NS3, podendo até mesmo clivar sítios internos dentro de NS2A e NS3 (Lindenbach e Rice, 2001).

A região C-terminal da NS3 codifica uma região homóloga a um dos grupos de RNA-helicase e à proteína nucleosídeo trifosfatase (NTPase), responsáveis por estimular a atividade replicativa do RNA. De fato, mutação em sítios ativos da helicase confirma um papel fundamental para esta enzima na replicação dos *Flavivírus*. A estrutura ativa da helicase parece estar envolvida na atividade de reconhecimento da proteína pelo RNA específico do vírus (Lindenbach e Rice, 2001).

9.2.4. As Proteínas NS4A e NS4B

As proteínas NS4A e NS4B são pequenas, com aproximadamente 16 kDa e 27 kDa respectivamente, sendo proteínas hidrofóbicas. Sugere-se um papel da NS4A na replicação do RNA, ideia suportada pela presença desta proteína no complexo de replicação (Lindenbach e Rice, 2001).

A clivagem da junção 2K/NS4B pela peptidase sinal (ou sinalase) requer a clivagem da serino-protease NS2B/NS3. Estudos mostram que a expressão e a regulação da clivagem NS4A-2K-NS4B são necessárias para a indução dos rearranjos na membrana pela NS4B (Lindenbach e Rice, 2001). A NS4A e NS4B também podem bloquear a sinalização IFN tipo beta e tipo gama (Mairiang *et al.*, 2013; Guzman *et al.*, 2016; Solanki *et al.*, 2017). NS4B tem o mais forte efeito antagônico, o que requer o processamento adequado da poliproteína NS4A-NS4B pela NS2B-NS3 serino-protease ou expressão de NS4B com um peptídeo sinal N-terminal ficará prejudicada (Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017). A NS4B pode se associar com a membrana independentemente do peptídeo sinal 2K e parece ser uma proteína de membrana (Lindenbach e Rice, 2001).

9.2.5. A Proteína NS5

A proteína NS5 é uma molécula grande altamente conservada, apresentando aproximadamente 103 kDa. Assim como a proteína NS3, NS5 é uma proteína multifuncional com atividade metiltransferase (MTase) e de RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). A região N-terminal da NS5 apresenta homologia com a proteína MTase dependente de S-Adenosil-Metionina (SAM), sugerindo que esta proteína esteja envolvida na modificação do *Cap-5'*. Posteriormente, foi mostrado que o domínio N-terminal da NS5 de DENV2 poderia transferir grupos metílicos da SAM para a molécula de RNA (Lindenbach e Rice, 2001; Mairiang *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2017).

A proteína NS5 contém homologia significativa pela RpRd de outros vírus de RNA positivo (Lindenbach e Rice, 2001) e, por isso, é usada para análise filogenética dos *Flavivírus*.

Algumas novas funções para NS5 de *Flavivírus*, além da replicação do RNA, surgiram: a NS5 de DENV2 é capaz de induzir a transcrição e a secreção de interleucina 8 (IL-8), podendo aumentar a propagação da doença principalmente através do recrutamento de células inflamatória para o local da infecção. Além disso, NS5 de TBEV bloqueia a sinalização dos interferons α/β e do interferon γ pela ligação a seus receptores, além de inibir a fosforilação das quinase Janus (Jak1) e TyrK2, ativando, portanto, o ligante transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1) (Lindenbach e Rice, 2001).

10. Replicação Viral

As células hospedeiras para infecção dos *Flavivírus* incluem os monócitos, os macrófagos e as células dendrítica (Marianneau *et al.*, 1999; Tassaneetrithep *et al.*, 2003; Barba-Spaeth *et al.*, 2005; Lozach *et al.*, 2005; Krishnan *et al.*, 2007). A adesão do vírus à superfície da célula e sua entrada na célula hospedeira ocorrem por endocitose mediada pela ligação da proteína E a um receptor (Figura 17), ainda não determinado, que se localiza na superfície da membrana voltado para matriz extracelular (Sampath e Padmanabhan, 2009).

O baixo pH do compartimento endossomal ativa uma mudança tridimensional irreversível da proteína E *in vivo*, que resulta no processo de fusão do vírus com a membrana do endossomo. Este evento é disparado pela reorganização estrutural da proteína E, que conduz a liberação do nucleocapsídeo para dentro do citoplasma da célula, onde a proteína capsídica e o RNA se dissociam, e a replicação do genoma e a montagem das partículas acontecem (Figuras 15 e 16) (Sampath e Padmanabhan, 2009).

Com a infecção, a replicase dos *Flavivírus* se associa com a membrana, cuja replicação envolve as pequenas proteínas não estruturais hidrofóbicas, o RNA viral e supostos fatores da célula hospedeira. O início da replicação se dá com a síntese de uma fita senso negativo do RNA genômico, que então servirá

como molde para a síntese do RNA. Esta fita menor de RNA é encontrada após três horas de infecção (Lindenbach e Rice, 2001).

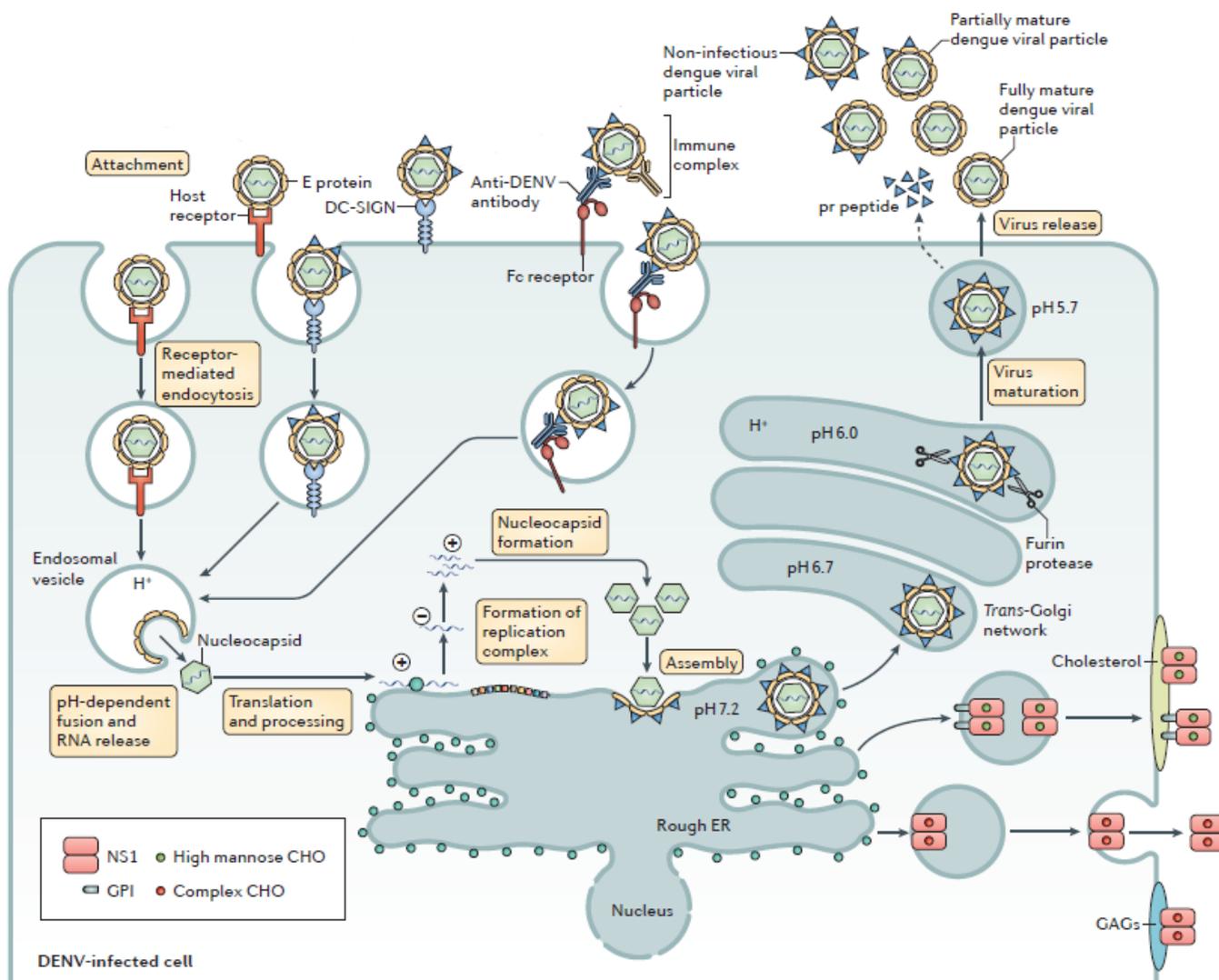


Figura 17 – O ciclo replicativo dos Flavivírus.

Os virions se ligam a moléculas e receptores da célula hospedeira e são internalizados por endocitose. No pH endossomal, a glicoproteína E medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, permitindo a desmontagem do virion e a liberação do RNA no citoplasma. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. As proteínas não-estruturais, então, replicam o genoma viral. A montagem do virion ocorre na membrana do RE. A proteína capsídica e o RNA viral são envelopados pelas glicoproteínas E e prM inseridas na membrana para formar partículas imaturas, que então são transportadas através da via secretória. Na rede trans-Golgi, prM é clivada pela furina. Virions maduros são agora liberados por exocitose. Os sinais + e - indicam RNA de senso positivo e senso negativo, respectivamente. C – capsídeo; DC-SIGN – células dendríticas específicas ICAM3-agarrada a não-integrina; UTR – região não traduzida. Adaptado de Guzman *et al.*, 2016.

A tradução do RNA gera uma poliproteína que é cotraducionalmente e postraducionalmente processada pela serino-protease NS2B/NS3, codificada pelo vírus, e pelas proteases da célula hospedeira, incluindo a sinalase e a furina. Este processamento produz as três proteínas estruturais e as oito proteínas não estruturais, na ordem: C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5, respectivamente (Rice *et al.*, 1985; Sampath e Padmanabhan, 2009). As proteínas NS são liberadas e direcionadas para o local de replicação nos pacotes de vesículas derivadas do RE para iniciar a transcrição. A NS1 é inicialmente expressa em associação com o RE, o monômero é modificado pela adição de moléculas de carboidratos ricos em manose (CHO), resultando na associação de membrana. A NS1 pode adquirir o glicosilfosfatidilinositol (GPI), tornando a NS1 ligada a membrana quanto a NS1 ancorada a GPI são traficadas pela membrana até a superfície celular através de uma via desconhecida, onde se associam com lipídeos como o colesterol. Algumas NS1 associadas a superfície celular podem ser previamente secretadas se ligada diretamente aos glicosaminoglicanos (GAG) da superfície celular ou serem secretadas pela célula hospedeiras (Guzman *et al.*, 2016)

A replicação do RNA viral acontece no RE rugoso (RER) e nas membranas derivadas do aparato de Golgi, chamadas de pacotes vesiculares (VP) (Chu e Westaway, 1992; Mackenzie, 2005). As proteínas não estruturais e o RNA dupla fita formado (dsRNA) permanecem concentrados nas VP, constituindo o local de síntese do RNA viral (Sampath e Padmanabhan, 2009). Vários estudos têm descrito alterações ultra-estruturais nas membranas das células infectadas, normalmente na região perinuclear. Em geral, os primeiros eventos a acontecer são a proliferação das membranas do RE, seguido pelo aparecimento de estruturas de membranas lisas. Estas estruturas são pequenos grupos de 70 a 200 nm de vesículas ou pacotes de vesículas (VP), contendo um material elétron-denso dentro do lúmen do RE liso (REL) (Lindenbach e Rice, 2001).

O RNA viral recém-sintetizado segue para dentro do espaço intermembranar da bicamada lipídica e a montagem das partículas de viarsí acontece no lúmen do RER. O primeiro passo no processo de montagem do vírus é o revestimento do RNA, recém-sintetizado, pela proteína C, formando o nucleocapsídeo (Lindenbach e Rice, 2001).

As partículas imaturas geradas no lúmen do RER, que posteriormente são translocadas para a rede transgolgi (MacKenzie e Westaway, 2001; Sampath e Padmanabhan, 2009), contêm as proteínas E e prM, envelope e nucleocapsídeo, no entanto, são incapazes de promover a fusão na célula hospedeira e, portanto, não realizam uma infecção (Figura 16) (Lindenbach e Rice, 2001).

As proteínas E e prM permanecem associadas ao RE através das sequências transmembranares da porção C-terminal. A proteína C é a grande base de interação com o genoma viral no citoplasma, atuando como precursora para formação do NC, que adquire o envelope recém processado no lúmen do RE. Recentes estudos sugerem que a base da montagem do NC, provavelmente, ocorra através de dímeros da proteína C. Porém, este mecanismo ainda não está bem elucidado (Lindenbach e Rice, 2001).

Na fase de montagem dos vírus, ocorre modificação nas proteínas E e prM com remoção e adição de terminais glicanos, evento muito semelhante ao utilizado para síntese das glicoproteínas celulares. Subsequentemente, a clivagem da prM em M acontece na rede transgolgi, resultando agora em partículas maduras. Estudos demonstram que a clivagem de prM em sítios específicos é realizada pela enzima furina, dando origem à proteína M. Este mecanismo ocorre juntamente com o rearranjo conformacional da proteína E, que deixa de interagir com a proteína prM (heterodímero E-prM) para formar um homodímero E-E (Figura 15). Este processo de maturação é fundamental para tornar a partícula infecciosa, que, posteriormente, deixa a célula hospedeira através de exocitose (Figura 16) (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008; Sampath e Padmanabhan, 2009; Li *et al.*, 2008 Lindenbach e Rice, 2001).

Partículas subvirais também podem ser produzidas no RE, representadas pela presença das glicoproteínas de membrana na ausência do NC, o que também as torna não infecciosas. Da mesma forma, as partículas subvirais maduras são liberadas das células hospedeiras por exocitose (Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

11. Diagnóstico da dengue

A dengue, é considerada uma doença tropical negligenciada, foi reconhecida como um grande problema de saúde pública em junho de 1999, sendo formalmente incluída no portfólio de doenças do Programa Especial das Nações Unidas para o Desenvolvimento / Treinamento do Banco Mundial / Organização Mundial da Saúde para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais, o Conselho Conjunto de Coordenação [WHO, 1999; Shu e Huang, 2004).

A OMS recomenda o uso de métodos sorológicos para o diagnóstico de DENVs para fornecer confirmação laboratorial e o uso de técnicas genômicas para o teste confirmatório necessário para detectar diretamente o vírus (WHO, 2009; Salles *et al.*, 2018).

A viremia por DENV é detectável 24 a 48 horas antes do início da febre e continua por até aproximadamente 5 a 6 dias. Durante esse período, o vírus é infeccioso, seu RNA específico e a proteína NS1 podem ser detectados no sangue, no soro e no plasma de pacientes e também nos tecidos dos pacientes, em casos fatais (Guzman *et al.*, 2014).

Métodos virológicos, moleculares e sorológicos são usados para confirmar a infecção por DENV para a vigilância epidemiológica e diagnóstico clínico. A detecção de anticorpos anti-DENV IgM é o teste mais utilizado na prática de rotina (Tang e Ooi, 2012). Os títulos de IgM anti-DENV, em soros de pacientes, na fase aguda da doença são medidos para confirmar a infecção por sorologia, enquanto pacientes em fase de convalescência são identificados através da soroconversão de IgM em IgG através da comparação de títulos de anticorpos, em soros de pacientes, em estado agudo e convalescente pareados (Guzman *et al.*, 2006 e 2014). Para os pacientes que são suspeitos de ter a doença dengue, um diagnóstico presuntivo pode ser feito pela detecção de anticorpos anti-IgM em amostras coletadas no 6º dia, após o aparecimento de sintomas agudos. Kits comerciais para detecção de IgM ou IgG em ensaio imunoenzimático (ELISA) e formatos de teste rápido menos sensíveis estão disponíveis (Vazquez *et al.*, 2007; Hunsperger *et al.*, Guzman *et al.*, 2016;).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) de transcriptase reversa (RT-PCR), RT-PCR em tempo real ou RT-PCR quantitativo (RT-qPCR), isolamento de DENV em linhagens de células de mosquitos e pela inoculação em mosquito facilitam a confirmação e identificação do agente virológico. Embora, o isolamento e a identificação do vírus sejam altamente específicos, eles têm uma sensibilidade relativamente baixa e consomem muitos recursos financeiros e tempo. Em contraste, a detecção de RNA do DENV fornece um método rápido, sensível e específico para a confirmação diagnóstica virológica da doença.

A detecção da proteína NS1 fornece uma janela de oportunidade para um diagnóstico etiológico precoce. A sensibilidade e especificidade da detecção do DENV por NS1 dependem do sorotipo infeccioso, do momento da coleta, da qualidade da amostra e da paridade da infecção pelo DENV (infecção primária versus secundária), bem como do formato do teste (Guzman *et al.*, 2010; Hunsperger *et al.*, 2014).

A introdução e extensão de dois novos arbovírus em países endêmicos para dengue, na região Americana, o Vírus Chikungunya (*alfavírus*), detectado, no final de 2013, na ilha caribenha de St. Martin, e do Vírus Zika detectado, em maio de 2015, no Brasil, impôs novos desafios para o diagnóstico da dengue e de arbovírus em geral. O diagnóstico de qualquer um desses vírus é baseado na detecção do RNA e / ou IgM. No entanto, a duração da viremia é diferente nas diferentes infecções, observa-se também reação cruzada entre os vírus DENV e Zika, por serem da mesma família, e kits comerciais adequados para sorologia são necessárias para o Vírus Chikungunya e Zika.

Para enfrentar esta emergência de testes diagnósticos eficazes para diferentes arbovírus, a rede de arbovírus dos Laboratório Nacionais da região das Américas (Relda; antiga Rede de Laboratório de Dengue das Américas), conduzida pela OPAS, recomendou um novo algoritmo de diagnóstico para os vírus da dengue, da zika e da chikungunya. Na primeira etapa, o RNA viral de destes vírus são detectados, por técnica de PCR quantitativo, em amostras de pacientes na fase aguda. Se disponível, a sorologia para IgM em amostras de soro coletadas de indivíduos com a suspeita clínica de infecção por DENV ou ZIKV deve ser testada pela técnica de ELISA captura IgM. Se for positivo para

ambos os vírus, uma infecção secundária por *Flavivírus* deve ser considerada (PAHO, 2016; Guzman *et al.*, 2016).

Considerando esta nova situação epidemiológica, espera-se que as diretrizes de diagnóstico para o DENV e outros *Flavivírus* mudem com novos algoritmos, de acordo com a situação epidemiológica, mais sensíveis, kits comerciais mais específicos e melhor validados para sorologia.

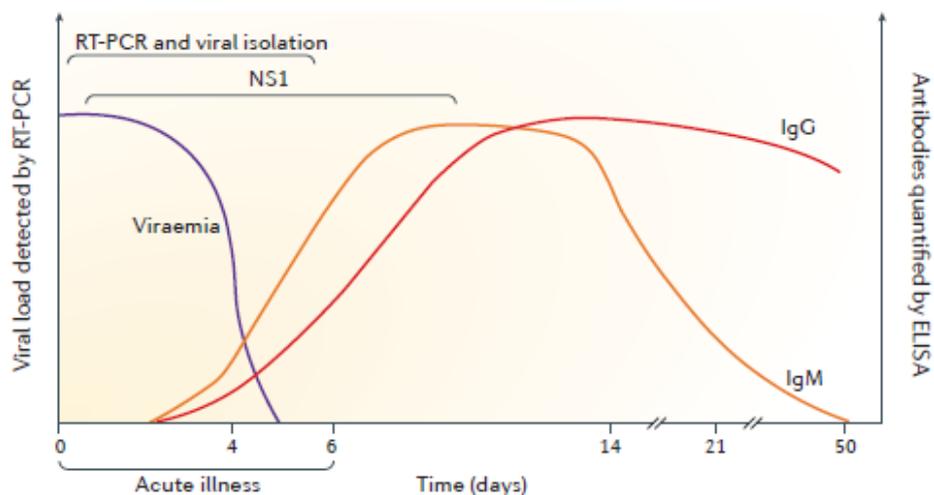


Figura 18 – Diagnóstico da dengue.

Viremia, antígeno não estrutural 1 (NS1) e anticorpos variam com o passar do tempo. Diferentes testes diagnósticos serão apropriados, dependendo do estágio da infecção. ELISA, ensaio imunoenzimático; RT, transcrição reversa. Modificado da WHO 2009.

12. Drogas, vacinas antivirais e prevenção

12.1 Drogas antivirais contra proteínas estruturais

Não existe tratamento medicamentoso específico para controlar a infecção promovida pelo DENV. O tratamento é apenas sintomático, sendo usados medicamentos antitérmicos que devem ser recomendados em prescrição médica. É importante destacar que a pessoa com dengue não pode tomar remédios a base de ácido acetil salicílico, como AAS, Melhoral, Doril, Sonrisal, Alka-Seltzer, Engov, Cibalena, Doloxene e Buferin. Por apresentar um efeito anticoagulante, estes medicamentos podem favorecer o aparecimento de hemorragias relacionadas à patogênese. Com o agravamento do quadro, o

paciente deve ser atendido numa Unidade de Terapia Intensiva (Combate à Dengue, 2010).

As proteínas virais C, prM e E sofrem várias mudanças conformacionais durante o seu processamento, tanto na entrada e na montagem, quanto na saída das partículas virais em seu curso de maturação. Tais mudanças oferecem alvos potenciais para inibição do vírus por uma variedade de drogas.

A proteína C, que interage com o RNA do genoma viral e forma o NC, apresenta uma região mínima funcional necessária para a montagem das partículas virais. Esta proteína também contém uma sequência interna hidrofóbica que medeia a interação com a membrana. A conformação tridimensional nativa da proteína C é de dímero, no qual cada monômero contém quatro α -hélices. O N- e o C-terminal contêm resíduos carregados, sendo que a região C-terminal parece estar envolvida na associação com o RNA. O desenvolvimento de um sistema de montagem *in vitro* foi muito útil para identificar tais combinações que bloqueiam a dimerização das proteínas do capsídeo ou a interação RNA-capsídeo, que poderiam levar à identificação de inibidores que impeçam a montagem e a conseqüente proliferação viral (Sampath e Padmanabhan, 2009).

As proteínas E, M e a precursora glicosilada da proteína M, a prM, são processadas a partir de uma poliproteína no RE pela sinalase do hospedeiro, através de clivagens em sítios entre C-prM em seu N-terminal e sítios entre prM-E em seu C-terminal. A associação entre prM e E produz partículas virais imaturas e a clivagem da prM em M, através da serino-protease celular, furina, na rede transgolgi, resulta na mudança conformacional irreversível da proteína E. Acredita-se que a produção inicial de uma partícula imatura seja necessária uma vez que prM atuaria como uma chaperona, protegendo assim a proteína E da fusão precoce (Sampath e Padmanabhan, 2009).

Estas características podem ser vistas como ponto para descoberta de uma droga antiviral baseada nas interações proteína-proteína, que pode ser muito útil para selecionar as transições conformacionais e de maturação das proteínas prM e E. Estudos sobre a dinâmica da proteína E, dos *Flavivírus*, sugerem três regiões dentro desta proteínas que poderiam ser alvos para drogas antivirais. Nestes estudos estruturais, utilizando o detergente n-octil- β -

D-glicopiranosídeo para formação de micelas, foi possível encontrar uma fenda que permitiu a ligação desta molécula à proteína E. Tal espaço poderia ser alvo para um agente antiviral que poderia bloquear as mudanças conformacionais necessárias à formação de uma partícula viral madura e infecciosa, o que poderia controlar a infecção *in vivo*. Desta maneira, a disponibilidade de informações acerca das estruturas imatura e madura está pavimentando evidências para o desenho racional de drogas (Sampath e Padmanabhan, 2009).

12.2 Drogas antivirais contra proteínas não estruturais

Dentro dos 180 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal da proteína NS3, foi identificado um domínio serino-protease similar à tripsina, contendo três resíduos catalíticos: His51, Asp75 e Ser135. Estudos demonstram que mutações sítio-dirigidas em regiões próximas aos três domínios catalíticos de NS3 reduzem drasticamente a atividade da protease. Assim, uma vez que o processamento do poliproteína é um pré-requisito para a montagem do complexo replicase viral, esta protease representa um alvo terapêutico atraente contra a infecção por dengue (Sampath e Padmanabhan, 2009; Chambers *et al.*, 1990; Clum *et al.*, 1997).

A região hidrofóbica da NS2B, provavelmente necessária para a associação à membrana, é um local ideal para clivagem. Um ensaio da protease *in vitro*, utilizando o precursor da protease de DENV2, demonstrou que a inserção cotraducional da NS2B em membrana microsomal pancreática canina é necessária para a clivagem da NS2B-NS3 *in vitro* (Sampath e Padmanabhan, 2009).

A interação da protease com um inibidor resulta numa conformação de ajuste induzido dos sítios ativos, onde NS2B de DENV2 deixa de interagir com seu substrato. Um dos desafios previsto no desenvolvimento de um inibidor do sítio ativo da serina-protease é identificar combinações que bloqueiem especificamente a enzima viral, mas não as serino-proteases do hospedeiro (Sampath e Padmanabhan, 2009).

Mutações de resíduos críticos que anulam a atividade helicase da NS3 evitam a replicação viral. Drogas que visam bloquear a função desta proteína

podem agir de três formas: (1) inibindo a atividade da ATPase, (2) interferindo na hidrólise de ATP, prevenindo a ligação do ácido nucléico; ou (3) bloqueando o deslizamento e dificultando o translocamento da helicase. A helicase é um alvo mais desafiador para o desenvolvimento de drogas comparado a outras proteínas não estruturais, principalmente porque não são completamente entendidos seus mecanismos de ação. Além disso, existe um grande problema em selecionar os compostos que inibem sítios de ligação a ATP, já que estes compostos são facilmente susceptíveis ao hospedeiro por serem citotóxico (Sampath e Padmanabhan, 2009).

NS5 é uma enzima que está sendo muito estudada recentemente. Sua atividade MTase parece ser um alvo bastante interessante para drogas. Mutações em resíduos críticos às atividades de metilação prejudicam a replicação viral, já que esta enzima desempenha um papel essencial no ciclo de replicação viral. A metilação da alça N7 da guanina da porção que codifica NS5 é específica para a sequência de replicação do RNA viral (Dong *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2006). O sítio ativo para a metilação 2'OH foi mapeado para os resíduos K61, D146, K182, E218, entretanto isto não foi determinado para a metilação de N7, embora D146 tenha sido demonstrado ser essencial para esta atividade (Ray *et al.*, 2006; Sampath e Padmanabhan, 2009).

Com base nessas informações estruturais, uma estrutura foi criada, através de seleção assistida, para os inibidores das metilações 2'OH, resultando na identificação de um inibidor moderno. Este é o primeiro passo no desenvolvimento de inibidores da MTase, mas muito trabalho deverá ser feito antes que o composto possa ser desenvolvido como droga terapêutica.

Por fim, a atividade RpRd da NS5, similar a transcriptase reversa do HIV, parece ser um dos alvos mais promissores para produção de drogas antivirais contra este vírus. Os EUA já comercializavam mais de 30 compostos para o tratamento de infecções virais, sendo 15 deles inibidores de polimerase (Sampath e Padmanabhan, 2009).

12.3 Vacinas antivirais

A imunização é definida como a aquisição de proteção imunológica contra uma doença infecciosa, tendo como objetivo aumentar a resistência de

um indivíduo contra infecções. A imunização pode ser feita através de vacina, imunoglobulina ou anticorpos (soro). As vacinas são usadas para induzir a imunidade ativa, e sua administração resulta em uma resposta biológica e na produção de anticorpos específicos (Abbas e Lichtman, 2006).

As vacinas podem ser compostas por microrganismos vivos atenuados em laboratório, que devem ser capazes de se multiplicar no organismo hospedeiro para que possam estimular uma resposta imune eficaz. Esta resposta ao microrganismo atenuado é idêntica à produzida pela infecção natural, pois o sistema imune é incapaz de diferenciar entre uma infecção pelo microrganismo vacinal atenuado ou selvagem. A multiplicação do microrganismo vacinal não costuma ser capaz de causar a doença (Abbas e Lichtman, 2006).

Além das vacinas atenuadas, existem as vacinas inativadas, compostas por microrganismos inativados ou por pequenos fragmentos de partícula viral. Isto significa, que estas últimas vacinas possuem componentes incapazes de se multiplicar em um organismo. Vacinas compostas por antígenos purificados ou por subunidades de microrganismos são capazes de estimular respostas de anticorpos e de células T auxiliares, mas não geram respostas por linfócitos T citotóxicos. Assim, neste caso, a resposta imune à vacina inativada é principalmente humoral, com pouca ou nenhuma imunidade celular (Abbas e Lichtman, 2006).

Existem ainda as vacinas de DNA, composta por um plasmídeo bacteriano formado por um DNA complementar que codifica um antígeno viral (uma proteína de superfície, por exemplo). As vacinas de DNA supostamente funcionam, pois, as células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais são transfectadas *in vivo* com o plasmídeo e expressam peptídeos imunogênicos que favorecem o surgimento de respostas específicas. Estudos mostram que as vacinas de DNA podem provocar fortes respostas imunológicas pelos linfócitos T citolíticos (Abbas e Lichtman, 2006).

Avanços na tecnologia do DNA recombinante tem tornado possível explorar uma nova tecnologia de desenvolvimento de vacinas atenuadas. Clones de cDNA completos permitem construir vírus atenuados infecciosos por mutações ou deleções incorporadas ao genoma viral. É possível criar também quimeras virais, onde o gene das proteínas estruturais, que atuam como

antígenos, pode eventualmente ser trocados por um gene correspondente de outro vírus, pelo qual se pretende construir uma vacina atenuada. Os benefícios da criação de quimeras poderiam acelerar o desenvolvimento de vacinas contra doenças que causam elevadas taxas de mortalidade no mundo (Lai e Monath, 2003).

Uma vacina altamente eficaz para dengue deve ser significativamente livre de reatogenicidade, induzindo um nível de proteção a qualquer um dos DENVs selvagens, após uma infecção natural, além de promover uma proteção vitalícia. Uma fraca resposta imune, que diminui os níveis de proteção ao longo do tempo, não é aceitável devido à grave consequência observada durante as infecções secundárias promovidas pelos diferentes DENV (Whitehead *et al.*, 2007).

A vacina a partir de vírus atenuado ou inativado geralmente induz a produção de menos anticorpos do que a infecção com os vírus do tipo selvagem. Desta maneira, é muito provável que, pelo menos, duas doses da vacina sejam necessárias para induzir níveis de anticorpos suficientes produzidos após a infecção com DENV do tipo selvagem. Assim, estudos sugerem que uma vacina atenuada tetravalente poderia ser administrada em duas doses com o intervalo de 3 a 6 meses, entre as doses, enquanto uma vacina de vírus inativado: de vírus íntegro inativado, de partículas subvirais ou uma vacina de DNA, poderia ser administrada com múltiplas doses para induzir altos níveis de anticorpos para uma imunização duradoura (Whitehead *et al.*, 2007).

Esforços para se desenvolver vacinas contra a dengue concentram-se principalmente em vacinas de: vírus atenuado, de vírus inativado e de subunidades virais. Vale ressaltar o grande sucesso das vacinas de vírus atenuado contra a febre amarela e de vírus inativado contra a encefalite Japonesa (JE) e a encefalite transmitida por carrapato (TBE), que fornecem uma possível orientação para o desenvolvimento promissor da vacina contra dengue. A produção de uma única vacina tetravalente contra os DENVs, para impedir o desenvolvimento de dengue, DHF e DSS em vacinados, e que confira imunidade a longo prazo são os grandes desafios para o desenvolvimento da vacina (Whitehead *et al.*, 2007) até o presente momento.

Após a infecção natural pelo DENV, os indivíduos desenvolvem respostas por anticorpos neutralizantes específicos ao sorotipo infectado. Anticorpos monoclonais têm sido utilizados para mapear os epítomos neutralizantes do vírus da dengue e de outros *Flavivírus*. A maior parte destes anticorpos se liga a uma determinada porção do domínio III da proteína E, o que é extremamente interessante já que este epítomo é bastante conservado dentre os quatro sorotipos do DENV, possivelmente podendo servir como um potencial alvo para o desenvolvimento de uma vacina e, eventualmente, como alvo terapêutico também (Wahala *et al.*, 2010).

A disponibilidade de informações estruturais de uma série de proteínas virais e as ferramentas para análise da eficácia dos inibidores proporcionam novas oportunidades para desenvolvimento de drogas antivirais. Como os membros dos *Flavivírus* compartilham estratégias semelhantes de replicação, existe uma perspectiva de identificar um fármaco que iniba um amplo espectro, apresentando atividade profilática ou terapêutica contra um número de diferentes patógenos (Sampath e Padmanabhan, 2009).

Pesquisas no Brasil foram desenvolvidas na tentativa de encontrar uma vacina eficaz contra a dengue. A Fiocruz, em conjunto com o Ministério da Saúde, fez uma parceria com a farmacêutica belga GlaxoSmithKline (GSK), formando plataformas para pesquisa e desenvolvimento de vacinas contra dengue, a febre amarela (inativada) e a malária. Esta foi a primeira vez que uma instituição como a Fiocruz e um laboratório privado multinacional trabalharam juntos, em fases pré-clínicas, para o desenvolvimento de vacinas relacionadas a doenças de interesse do Brasil e que são importantes do ponto de vista de morbidade e de mortalidade no país (Mascarenhas, 2009; Vieira, 2010). Entretanto, tais estudos ainda não tiveram sucesso.

O Instituto Butantã também apresentou pesquisas em desenvolvimento para a produção de uma vacina contra dengue. Segundo o presidente da fundação, Isaias Raw, a previsão é que, em 2010, o Brasil já teria uma vacina para ser utilizada na rede pública de saúde em crianças e jovens (Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, 2010), o que ainda não ocorreu.

A companhia farmacêutica francesa, Sanofi-Aventis, principal produtora mundial de vacinas, estabeleceu um prazo até 2013 para a comercialização da vacina contra a dengue, cujas pesquisas foram iniciadas há mais de 15 anos. A

vacina representaria uma revolução para prevenir o contágio de uma doença tropical que atinge muitas pessoas no mundo. A divisão de vacinas Sanofi Pasteur da empresa Sanofi, lançou a vacina denominada comercialmente DENGvAXIA®, um derivado quimérico pentavalente contra os quatro sorotipos da dengue e o da febre amarela. A vacina em questão apresenta alguns problemas que colocam em dúvida a sua plena eficácia. Ela é indicada somente para pessoas na faixa etária 9-45 anos, não podendo ser usada em crianças, idosos, grávidas e lactentes, segundo informações contidas em sua bula. Além disso, a vacina apresenta custo elevado e ainda são necessários mais estudos para comprovar sua eficácia e os efeitos adversos (Villar *et al.*, 2017). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) licenciou o Dengvaxia para o Brasil em 2015 (Brasil, 2015). Esta vacina apresenta alguns problemas graves que põem em causa a sua plena eficácia (WHO 2016). Além disso, esta vacina tem um alto custo, e mais estudos são necessários para comprovar sua eficácia (WHO 2016). Em novembro de 2017, o Brasil foi surpreendido por uma divulgação da Anvisa recomendando a não utilização da vacina Dengvaxia no Brasil (ANVISA 2017). Esta recomendação foi baseada na possibilidade de que a vacina Dengvaxia aumentaria o risco de doença grave em pessoas que nunca foram expostas ao DENV antes. Desde então, esta vacina não foi considerada como uma ferramenta potencial de prevenção.

O Ministério da Saúde da Filipinas suspendeu as imunizações de Dengvaxia devido a 14 mortes de crianças que estavam associadas à vacinação (REUTERS 2018). No Brasil, o governo decidiu usar o Dengvaxia para vacinar apenas indivíduos que já são soropositivos (ANVISA 2017).

12.4 Prevenção e controle da dengue

Como ainda não existe tratamento e nem vacina, é extremamente importante tentar evitar e controlar a infecção, realizando sempre o combate ao vetor. Para isso, é importante realizar periodicamente vigilâncias epidemiológicas, e conscientizar a população na tentativa de controlar a reprodução do mosquito vetor, através de medidas como não deixar água acumulada em pneus e vasos de planta, como ilustra a Figura 19 (Consoli e Oliveira, 1994, Dengue.org.br, 2011), pois a variação do acúmulo de água

influencia nos níveis de densidade populacional do *Aedes* em áreas urbanas (Maciel-de-Freitas *et al.*, 2007). A vigilância da criação de mosquitos é fundamental, uma vez que os inseticidas químicos usados para controle são cada vez menos eficientes em função da resistência (Braga e Valle, 2007).

No estado do Rio de Janeiro, em seus municípios realiza-se periodicamente o Levantamento do Índice de Infestação Rápido para o *Ae. aegypti* (LIRAA). Este levantamento é feito, por amostragem nos municípios, os agentes de saúde visitam residências e outros imóveis, onde são colocadas as armadilhas do tipo ovitrampa para coleta dos ovos do mosquito. Os ovos coletados são colocados em água para eclodir e posteriormente identificar a espécie de *Aedes*, a fim de determinar do Índice de Infestação Predial (IIP) médio do município e dos seus estratos (áreas dentro do município), que representa o percentual de imóveis com a presença de criadouros que contenham larvas do mosquito (Secretaria de Saúde do Estado Rio de Janeiro, 2016).

Estudos epidemiológicos voltados para os vetores vêm se tornando uma ferramenta para prevenir ou controlar novas epidemias. A Análise investigativa nos vetores por técnicas que possibilitam identificar a presença de algum arbovírus nos mosquitos coletados na natureza ou em áreas de risco assinaladas pelo LIRAA, podem auxiliar no combate da doença.

Com o objetivo de evitar a ocorrência de óbitos por dengue, prevenir e controlar processos epidêmicos, o Ministério da Saúde elaborou diretrizes para assistência, vigilância epidemiológica, controle vetorial, comunicação e mobilização. Dentro das ações de vigilância encontra-se o monitoramento do(s) sorotipo(s) circulante(s) em pessoas, com o objetivo de verificar o potencial de magnitude de uma possível epidemia. Visto que, a circulação de um novo sorotipo ou a recirculação de um sorotipo na área, após longo período sem a sua ocorrência (com a formação de uma população susceptível), pode ser o alerta para a ocorrência de uma epidemia de grande magnitude. Atualmente, esse monitoramento é feito através das técnicas de biologia molecular, que visam detectar o genoma viral em soro de pacientes apresentando um quadro febril e ainda em fase aguda. Para isso, 10% das amostras de pacientes suspeitos de dengue, atendidos pelas unidades consideradas sentinelas são

encaminhadas aos laboratórios estaduais para avaliação e sorotipagem viral (MS 2016).

Entretanto, a vigilância epidemiológica pode ser mais eficiente se os vírus ou novos sorotipos forem detectados ainda na população de vetores. Os estudos de circulação viral em vetores apontam essa metodologia como uma importante ferramenta para previsão do surgimento e estabelecimento das arboviroses (Jöst *et al.* 2010 e 2011).



Figura 19 – Dicas de prevenção e controle.

A figura tem dicas de como se prevenir e controlar a dengue de maneira fácil e prática. Extraído Dengue.org.br, 2011

13. Objetivos

13.1 Objetivo geral:

Prospectar a transmissão transovariana do vírus da dengue no mosquito *Aedes aegypti* como possível reservatório permanente do vírus.

13.2 Objetivos específicos:

- Confeccionar novos conjuntos de primers para sorotipagem de dengue.
- Estabelecer e validar os protocolos de PCR nested convencional e qPCR com novos conjuntos de primers para sorotipagem.
- Investigar a presença do vírus em ovos de mosquitos coletados em diversas localidades do município do Rio de Janeiro (coleta de campo).
- Infectar mosquitos de laboratório cepa Liverpool com DENV-3 por alimentação artificial.
- Investigar a presença do vírus em fêmeas e ovos de mosquitos infectados por alimentação em laboratório com DENV-3.
- Fazer análise quantitativa de vírus nas amostras de mosquito e ovos coletados no campo e infectados em laboratório.
- Verificar a capacidade do vírus isolado dos ovos de mosquitos coletados, no campo, e infectados em laboratório, de infectar células hospedeiras de mamíferos.

14. Material e métodos

Desenho do Oligonucleotídeo - Foi utilizada uma sequência cDNA representativa no NCBI de cada vírus para o desenho dos primers; especificamente DENV-1 (Havaí), DENV-2 (16681), DENV-3 (H87), DENV-4 (H241), JEV (Sa14-14-2), SLEV (MSI-7), WNV (NY99), YFV (17D) e ZIKV (MR766). Estas seqüências foram alinhadas usando a ferramenta ClustalW no site (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) para confeccionar os primers adequados para detecção dos diferentes sorotipos da DENV. Um segundo alinhamento foi feito utilizando apenas regiões da sequência DENV semelhantes aos descritos por Lanciotti *et al.* (1992) e Li-Jung Chien *et al.* (2006) para desenhar primers gerais e específicos para detecção dos vírus. Com base no alinhamento DENV1-4, foi possível determinar as melhores seqüências de *primers*, seguindo as diretrizes descritas por B. Thornton e C. Basu, 2011.

Preparação de Vírus - Neste trabalho, foram utilizados os 4 sorotipos DENV, assim como ZIKV e YFV. Todos os vírus (MOI = 0,02) foram cultivados em células epiteliais de rim de macaco verde africano (células Vero), que foram inicialmente crescidas em frascos de cultura de plástico de 25 cm², seguidas por passagem num sistema de garrafa roladora de 750 cm² e foram incubadas a 37 °C durante 7 dias ou até à observação dos efeitos citopáticos. Os sobrenadantes de cada sorotipo DENV foram removidos, centrifugados, aliquotados e armazenados a -80 °C. Subsequentemente, os vírus foram titulados pelo método da placa tal como descrito e por Putnak *et al.* (1998) com modificações e foram cultivadas a 37 °C com 5% de CO₂ em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen), suplementado com soro fetal de bovino a 2,5% (Gibco-Invitrogen), 100 unidades / mL de penicilina e 100 µg / Estreptomicina (Putnak *et al.*, 1996). Estas amostras de DENV (1-4) foram utilizadas para como padrões positivos.

Alimentação de mosquitos em laboratório com o DENV_3. A infecção dos mosquitos com o vírus DENV-3 foi feita através de alimentação da cepa de

mosquito Liverpool, em comedouro artificial, utilizando $0,5 \times 10^7$ unidade formadora de placa (PFU)/mL e sangue na proporção de 1:1. Para o mosquito controle, foi feita uma alimentação sem a presença do DENV utilizando o meio de cultura DMEM e sangue na proporção 1:1. No 5º dia após a alimentação, foi colocado papel úmido para que as fêmeas realizassem a oviposição por 24 horas. No 6º dia após a alimentação, as fêmeas foram maceradas para obtenção do RNA viral. Após o desenvolvimento embrionário os ovos foram utilizados para a extração do vírus.

Extração do RNA viral e síntese de cDNA - O RNA total das amostras foram extraído a partir de 200 μ L dos sobrenadantes virais, de grupos de 5 ou 10 mosquitos adulto, de 100 ou 300 ovos de mosquitos, utilizando o método TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para o tratamento com DNase, incubaram-se 8 μ L da amostra de RNA viral, 1 μ L de tampão DNase I (Fermentas, Burling, Canadá) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi então sintetizado a partir do mRNA obtido no passo anterior, utilizando o kit de Transcrição Reverse de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Nested PCR convencional - A sorotipagem DENV por PCR convencional envolve duas reações de amplificação da sequência alvo, semelhante à descrita por Lanciotti et al. (1992). No primeiro passo, adicionou-se uma mistura reacional de 10 μ L contendo 1 μ L de cDNA, 100 nmol dos primers específicos STD e D2 (para detecção geral dos DENVs) e reagentes do kit Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Na segunda reação, utilizou-se a polimerase de alta fidelidade Phusion (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) com tampão HF contendo 1 μ L do produto da reação acima e 50 nmol de um conjunto de primers para detecção dos DENV1-4 (STD1 / rTS1; STD2 / mTS2, STD3 / TS3 e STD4 / rTS4), sucessivamente, num volume de reação de 20 μ L. Após a amplificação, uma alíquota de 10 μ L de cada produto de amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e os sorotipos de

DENV foram determinados pela amplificação do produto de PCR, com tamanho específico tal como apresentado no ANEXO 1(Tabela 1).

Sequenciamento do RNA viral da fêmea alimentada em laboratório com DENV3- O RNA total foi extraído a partir de 3 grupos de 5 fêmeas como descrito no item acima, o cDNA confeccionado e o produto de PCR amplificado com os primers STD e D2 (para detecção geral dos DENVs) e os primers específicos STD3 / TS3 para detecção de DENV3. O produto de PCR foi então purificado e seqüenciado usando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction e o aparelho ABI PRISM DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems, EUA) da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ (OTTO e cols., 2008). A sequência genômica obtida no sequenciamento foi submetida ao programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) - NCBI – NIH para identificação da sequência.

Síntese e extração dos plasmídeos - Os amplicons gerados cDNA controle positivos de DENV e dos ovos com os primers STD e D2 para cada sorotipo DENV, todos com aproximadamente 572 pb, foram clonados utilizando o sistema de vector pGEM-T Easy I (Promega, Fitchburg, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O plasmídeo contendo cada produto amplificado foi transformado na cepa DH5- α de bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) por choque térmico, incubando as células de *E. Coli* com plasmídeos durante 30 min a 4 °C, seguido por um choque térmico a 90 s a 42 °C, permanecendo 10 min a 4 °C. Em seguida, colocou-se a *E. coli* transformada em 800 μ L de caldo Luria-Bertani (LB) (LB Broth Ultrapure, Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA), preparado de acordo com o protocolo do fabricante, e incubado em agitador durante 1 hora a 37 °C a 100 rpm. Após este período de incubação, colocou-se a suspensão bacteriana sobre ágar LB (Ultrapure, Affymetrix Inc., Cleveland, OH, EUA) contendo 100 μ g / mL de ampicilina, de acordo com o protocolo do fabricante. As colônias resultantes foram rastreadas por técnica de PCR de colônias utilizando os primers T7 e SP6. As colônias positivas foram cultivadas em caldo líquido de lisogênese contendo 100 μ g / mL de ampicilina a 37 °C, *overnight*, como descrito por J. Figueira-Mansur *et al.* (2013).

PCR quantitativo (qPCR) – Para a amplificação de qPCR, o cDNA viral de cada sorotipo e os conjuntos de primers foram utilizados separadamente para a identificação dos sorotipos de DENV. Em cada protocolo, utilizou-se o Power SYBR Green Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as condições reacionais e a análise pós-amplificação recomendada pelo fabricante. Utilizaram-se separadamente os primers para os quatro sorotipos (DENV-1 = STD1 / rTS1, DENV-2 = STD2 / mTS2, DENV-3 = STD3 / TS3 e DENV-4 = STD4 / rTS4) em cada poço de uma placa qPCR. As reações tinham volumes finais de 15 µL e continham 5 µL de cDNA em várias diluições, 2,5 µL de cada conjunto de primers, na concentração de 400 nmolar e 7,5 µL de mistura reacional. Uma vez que o SYBR pode intercalar não especificamente em DNA de cadeia dupla durante o processo da técnica de PCR, foi realizada uma análise de curva de dissociação e a determinação da T_m para confirmar a identidade do produto amplificado através do seu perfil de T_m específico (Morrison et al, 1999). As análises das curvas de T_m incluídas no qPCR utilizaram os seguintes passos: uma desnaturação a 94 °C durante 1 m seguida por 78,5°C durante 10 s e uma rampa para 94 °C a uma taxa de 0,1 °C / 10 s com medição contínua de fluorescência.

Análise dos dados (quantificação absoluta) – Após amplificação pelo ensaio qPCR, realizou-se a aquisição de dados a partir de um sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). Uma curva padrão utilizando cDNA obtido a partir de células infectadas (DENV1-4) e outras com sequências de DNA plasmídial clonadas, contendo número de cópias expresso pela fórmula: $\text{Núm. cópias} = \frac{[\text{DNA (g/}\mu\text{L)} \times 6'022 \cdot 10^{23} \text{ (pb/mol)}]}{[\text{lenght (pb)} \times 660 \text{ (g/mol)}]}$ descrito no *Tutorials Applied Biosystems* (http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf), foram correlacionadas com o ciclo limiar (CT). O CT é definido como o ciclo no qual um primeiro aumento estatisticamente significativo em R_n (sinal repórter normalizado) é detectado pela primeira vez. O cDNA alvo ou o número de cópias do plasmídeo clonado de cada sorotipo e o valor CT estão inversamente relacionados (Dhar et al, 2002). As curvas de calibração do número de cópias do material viral obtido a partir de amostras de plasmídeos foram correlacionadas com os valores de CT. Em seguida, estes valores foram

utilizados com as amostras de cDNA de cada sorotipo controles, de ovos coletados no campo, de larvas, de pupas e de adultos, correspondente, para quantificar o material genético, relacionando assim o número de cópias de DENV1-4 presente nos cDNA . Para as análises estatísticas, os valores CT foram exportados para uma planilha do Microsoft Excel. Foram utilizadas análises de regressão dos valores de CT das amostras de cDNA ou diluições em série de plasmídeo clonado para determinar as eficiências de amplificação e a sensibilidade do método (Hounget *al*, 2001).

Coleta dos ovos do campo - Os ovos coletados no município do Rio de Janeiro, Cepa Aedes-RIO, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LFCAV) do IOC/FIOCRUZ.

Microscopia eletrônica de transmissão - Ovos foram separados e macerados e feito a primeira fixação feita com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (contendo cloreto de cálcio à 5 mM) durante 2h na temperatura ambiente ou 24 horas a 4°C. Após a fixação as amostras foram lavadas três vezes durante uma hora com solução tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,2) e sacarose 0,4% durante 1 hora. Na segunda fixação, os ovos foram tratadas com ácido ósmico 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, a amostra foi desidratada em sucessivos banhos de etanol nas concentrações de 50%, 70%, 80%, 90% e duas vezes de 100%. As amostras foram então embebidas em resina EPON (EPON 812 polybed), contendo DDSA (anidrido dodecenil succínico), MNA (anidrido metil náico) e um catalisador (DMP – 30 2,4,6 tridimetila) e submetidas a corte ultrafino. Conforme descrito por Reynolds (1963), os cortes são contrastados com acetato de uranila durante 30 minutos e citrato de chumbo durante 1 (um) minuto. Então, o material é então examinado ao microscópio eletrônico de transmissão.

15. Resultados

15.1. Normalização do Nested PCR Convencional

Inicialmente, estabelecemos novos protocolos para detecção dos sorotipos de DENV, utilizando novos conjuntos de *primers*, enzima polimerase de menor custo, quando possível, em diferentes técnicas de PCR.

Para padronizar a técnica de PCR do tipo Nested, os *primers* utilizados para detecção dos DENVs foram desenhados como descrito em Material e Métodos. A junção dos genes C-prM de cada sorotipo DENV foi selecionada porque apresenta pontos de consenso genômico, dentro de uma região de baixa similaridade (Lanciotti *et al*, 1992; Li-Jung Chien *et al*, 2006). O alinhamento dos Flavivírus, ZIKV, JEV, WNV, SLEV, YFV com os DENVs foi realizado para verificar o desenho dos *primers*, assegurando que apenas o material genético de DENV-1-4 e nenhum outro Flavivírus seriam amplificados (dados não apresentados).

Para a região conservada dos DENVs, um par de *primers* foi confeccionado para identificar uma região que era comum a todos os DENVs a serem utilizados na primeira reação do PCR Nested convencional. Quatro pares de primers específicos foram desenhados, dentro da região comum a todas as sequências DENV-1-4, para a detecção de material genômico viral específico. Na Figura 20, está apresentado o alinhamento de sequências parciais de sorotipos DENV, com os primers senso e antisenso destacados, estes últimos são idênticos ao usados por Li-Jung Chien *et al*. (2006) para identificar regiões comuns e específicas de DENV 1-4. A Tabela 1, mostra os conjuntos de primers utilizados e a previsão da massa molecular de cada produto de PCR amplificado de cada sorotipo da DENV.

Tabela 1: Característica dos primers dos vírus da Dengue

Nome do Primer e região do gene	Sequência PRIMERS	Específico	Set de primers	Tamanho (pb)
C-prM				
DF	TTTATTTAGAGAGCAGATCTCTG	DENV-all (F)	STD-D2	572
DR *	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	DENV-all (R)		
D1F	ACGGGTCGACCGTCTTTCAA	DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225
D1R *	CCCGTAACACTTTGATCGCT	DENV-1 (R)		
D2F	GCGAAAAACACGCCTTTCAA	DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140
D2R*	CGCCACAAGGGCCATGAACAGTTT	DENV-2(R)		
D3F	ACGGGAAACCGTCTATCAA	DENV-3 (F)	STD3-TS3	302
D3R*	TAACATCATCATGAGACAGAGC	DENV-3 (R)		
D4F	GTGGTTAGACCACCTTTCAA	DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282
D4R *	TTCTCCCGTTCAGGATGTTC	DENV-4 (R)		
3'NC				
DF*	TTGAGTAAACYRTGCTGCCTGTAGCTC	DENV-all (F)	DC-CDC	146
DR*	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCT	DENV-all (R)		
Gene NS5				
FLAVF*	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA	Flavivírus	mFU1-CFD2	235
FLAVR*	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	Flavivírus		

- A posição do genoma é baseado no vírus da dengue tipo 3.
- Primers desenvolvido pelo Lanciotti et. Al e Li-Jung Chien et. Al (3, 7).
- Primers desenvolvido nesse estudo.

Para determinação do título viral, alíquotas contendo 200 µL de cada sorotipo DENV foram submetidas à extração de RNA viral, a partir do qual o cDNA foi sintetizado e utilizado para o ensaio de PCR Nested convencional utilizando os primers da Tabela 1, como descrito em Material e Métodos. A Figura 21 mostra que cada par específico de primers para detecção dos sorotipos de DENV amplificou um único produto de PCR, com massa molecular esperada (Tabela 1), correspondente ao cDNA de cada sorotipo viral, demonstrando que os primers desenhados foram específicos para esta detecção.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose						
			PM	B	DV1	DV2	DV3	DV4	
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300						
DENV-1 (R)			200						
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200						
DENV-2(R)			100						
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	300						
DENV-3 (R)			200						
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300						
DENV-4 (R)			200						

Figura 21 - PCR dos modelos positivos DENV1-4.

Imagem representativa do gel de agarose, após amplificação por PCR convencional, com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como molde, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controle negativo, DV1 = cDNA de DENV-1, DV2 = cDNA de DENV2, DV3 = cDNA de DENV-3, DV4 = cDNA do DENV-4.

15.2. Quantificação e sensibilidade analítica de SYBR Green usando DNA plasmidial como modelo

Para as análises de sensibilidade e quantificação por técnica de qPCR utilizando SYBR Green, os plasmídeos DENV-1-4 foram diluídos, em série, e amplificados utilizando cada conjunto de primers específicos para os diferentes sorotipos DENV-1-4 (STD1 / rTS1; STD1 / mTS2; STD3 / TS3 e STD4 / rTS4). As amostras diluídas dos padrões de plasmídeos, de cada sorotipo, tiveram o nº de cópias determinado. Foram medidas $4,54 \times 10^6$ cópias de DENV-1, $7,29 \times 10^6$ cópias de DENV-2, $3,38 \times 10^6$ cópias de DENV--3 e $3,62 \times 10^6$ cópias de DENV4. A relação linear entre o nº de cópias DNA dos diferentes plasmídeos, de cada diluição, e os valores de CT foram utilizados para a determinação dos coeficientes de regressão (R2). Os valores de coeficientes foram superiores a 0,99 para todos os vírus, exceto o DENV-2, que foi de 0,97, com esses valores foi concluído que as diluições dos plasmídeos mantiveram uma correlação linear com a variação de CT, podendo então gerar uma curva padrão para quantificação dos diferentes sorotipos da dengue. Os valores médios de CT em triplicata variaram de: $11,03 \pm 0,045$ ($4,54 \times 10^6$ cópias) a $30,73 \pm 0,045$ ($4,54$ cópias) de DENV1; $14,87 \pm 0,078$ ($7,29 \times 10^6$ cópias) $32,79 \pm 0,078$ ($7,29$ cópias) de DENV2; $11,58 \pm 0,134$ ($7,29 \times 10^6$ cópias) $32,75 \pm 0,135$ ($7,29$ cópias) de DENV3; E $14,87 \pm 0,098$ ($7,29 \times 10^6$ cópias) $35,74 \pm 0,098$ ($7,29$ cópias) de DENV4, como mostrado na Figura 22 e Tabela 2A. Assim, o coeficiente de variação foi inferior a 4,0% para os sorotipos DENV-1-4, demonstrando a reprodutibilidade da amplificação, semelhante ao descrito por Dhar *et al.* (2002).

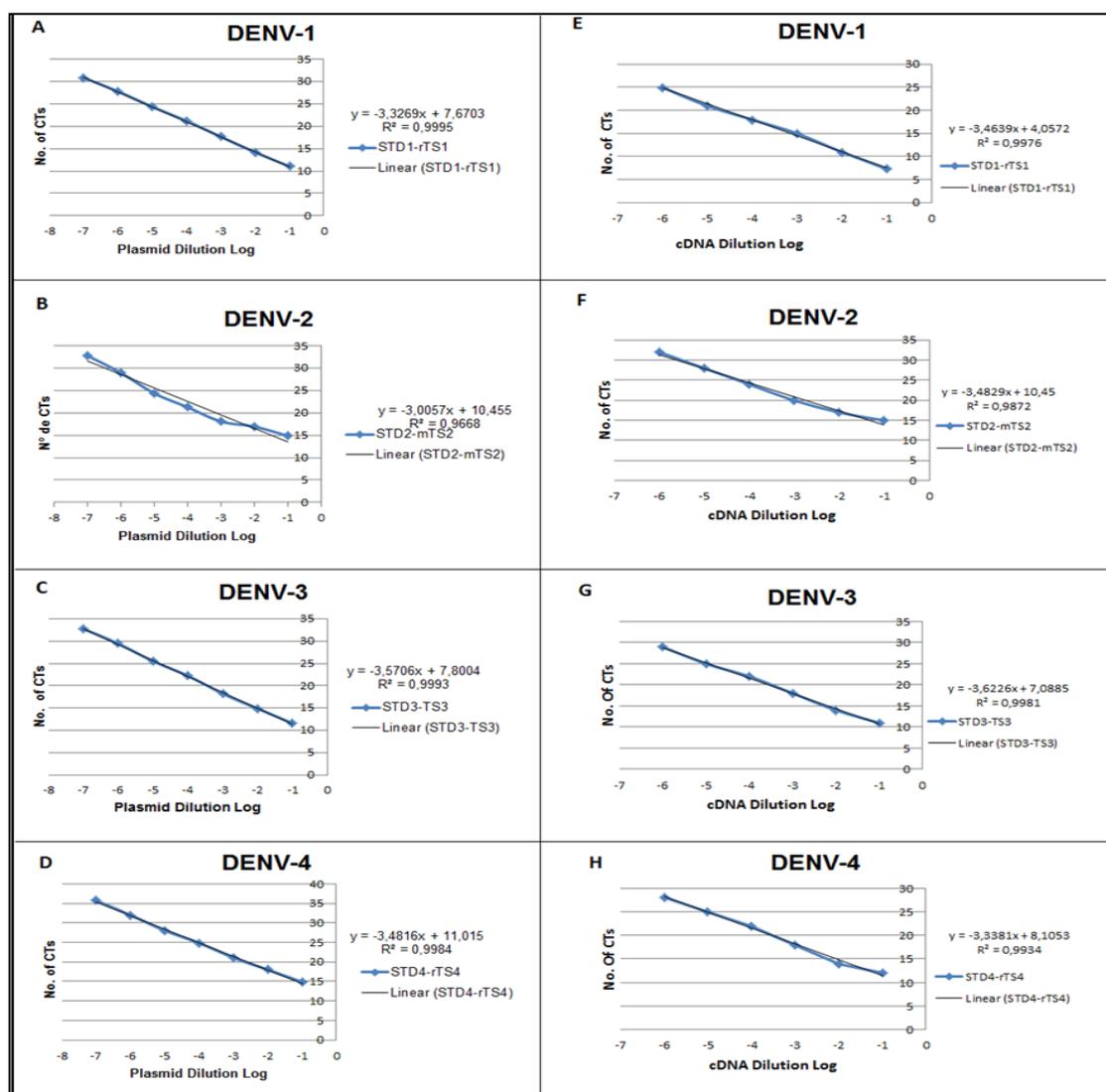


Figura 22 - curva de calibração qPCR.

As curvas padrão para DENV-1 (A), DENV-2 (B), DENV-3 (C) e DENV-4 (D) obtidas por SYBR Green PCR usando DNA plasmidial como molde. O número de cópias de DNA de plasmídeo DENV adicionado a cada mistura reacional foi derivado de uma diluição de 10 vezes em série para cada modelo, partindo da concentração em termos do número de cópias ($4,54 \times 10^6$ cópias para DENV-1, $7,29 \times 10^6$ cópias para DENV-2, $3,38 \times 10^6$ cópias para DENV-3 e $3,62 \times 10^6$ cópias para DENV-4) correspondentes aos números na base de registro 10 na curva linear nos painéis AD. As curvas padrão para DENV1 (E), DENV2 (F), DENV3 (G) e DENV4 (H) obtidas no PCR quantitativo utilizando cDNA viral como modelo.

Tabela 2A: Desempenho para o ensaio SYBR Green utilizando vírus da dengue 1-4 e primers sorotipo-específicos

Diluição do vírus	Media do CT da reação em triplicata indicando o sorotipo e o par do primer usado			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	STD1/rTS1	STD2/mTS2	STD3/TS3	STD4/rTS4
1:10	7,36	14,99	10,95	11,97
1:100	10,96	16,98	13,93	13,95
1:1.000	14,96	19,96	17,94	17,96
1:10.000	17,97	23,96	21,94	21,95
1:100.000	20,94	27,97	24,92	24,95
1:1.000.000	24,95	31,98	28,92	27,94
H ₂ O	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabela 2B: Desempenho para o ensaio SYBR Green utilizando fragmento sintético em plasmídeo do DENV1-4 e primers sorotipo-específicos

Diluição positivo viral [§]	Media do CT da reação em triplicata indicando o sorotipo e o par do primer usado				Nº DE CÓPIA S*
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
	STD1-rTS1	STD2-mTS2	STD3-TS3	STD4-rTS4	
1:10	11,03	14,87	11,58	14,87	10 ⁶
1:100	14,14	16,94	14,86	18,02	10 ⁵
1:1.000	17,64	18,09	18,21	21,09	10 ⁴
1:10.000	21,19	21,28	22,23	24,85	10 ³
1:100.000	24,31	24,39	25,49	28,04	10 ²
1:1.000.000	27,78	28,99	29,46	32,00	10 ¹
1:10.000.000	30,76	32,79	32,75	35,72	10 ⁰
H ₂ O	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

§ Coluna com o valor da diluição de cada plasmídeo molde.

*Coluna apresenta apenas o valor do exponencial, já que o nº de copia exato depende do tamanho do fragmento em pares de base.

15.3. Padronização de qPCR usando cDNA viral a partir de DENV e SYBR Green

Para determinar a curva de eficiência do ensaio qPCR, utilizou-se cDNA dos sorotipos virais e os primers específicos descritos na Tabela 1. Inicialmente, o cDNA foi testado com os primers, em concentrações variando de 100-500 nmol, para cada conjunto de primers (STD1 / rTS1, STD1 / mTS2, STD3 / TS3 e STD4 / rTS4), com cDNA dos sorotipos virais diluídos 1:10. Assim, foi determinada a concentração ideal de 400 nM para cada um dos primers. Os cDNAs dos sorotipos foram utilizados em diluições seriadas de 10 vezes, como descrito na Tabela 2B. Em seguida, determinou-se a sensibilidade analítica do ensaio de PCR SYBR Green, através da avaliação da relação linear entre as diluições do cDNA viral e os valores de CT que são apresentados na Figura 22. Nesta análise, obtivemos os coeficientes de regressão (R^2), que foram maiores que 0,99 para quase todos os sorotipos do vírus. As equações das retas foram calculadas e as inclinações obtidas foram utilizadas para determinar a eficiência da reação SYBR Green com a fórmula: $E = 10^{(-\frac{1}{\alpha}) - 1}$, onde α é o coeficiente angular da reta (Gluber, 1998). Desta forma, foram determinados os valores de eficiência de amplificação com os conjuntos de primers nos ensaios SYBR Green, sendo todos os valores superiores a 90% para todos os sorotipos DENV, como se mostra na Tabela 3. Em ensaio de qPCR utilizando SYBR Green é estabelecido uma boa eficiência para valores que variam de 90 a 110%, logo os primers desenhados e o protocolo estabelecido para quantificação de DENV1-4 por q PCR foram adequados.

Tabela 3: de coeficiente angular e valores de eficiência do PCR para o ensaio de SYBR green usando os primers específicos nas amostras de cDNA e Plasmideo dos DENV1-4.

Amostra Víral	Coeficiente angular	Valor de eficiência do PCR (%)
DENV-1		
cDNA	0,996	92,6
Plasmideo	0,999	100
DENV-2		
cDNA	0,987	93,7
Plasmideo	0,974	101,1
DENV-3		
cDNA	0,998	91,1
Plasmideo	0,999	91,0
DENV-4		
cDNA	0,989	99,3
Plasmideo	0,998	94,0

15.4 Especificidade do qPCR contra outros vírus

A especificidade de cada conjunto de primers para detecção dos sorotipos no ensaio de PCR SYBR Green foi determinada. Utilizou-se o cDNA viral de DENV1-4, a partir de uma nova passagem dos vírus em cultura de células Vero, e os conjuntos de primers específicos para DENV, ZIKV e YFV, estes dois últimos vírus também pertencentes à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, tendo portanto, a mesma classificação do DENV. Foram incluídas, no ensaio, amostras de cDNA virais de ZIKV e YFV, estes dois últimos foram usados como controles negativos. A Tabela 4 mostra as médias dos valores de CT em triplicata correspondentes aos cDNA virais (1:100), utilizando primers específicos para detecção dos diferentes vírus. Quando a amplificação foi realizada para DENV-1, a amostra de cDNA de DENV-1 teve um aumento significativo no sinal de fluorescência do SYBR Green, com o valor médio de CT em 28,18, enquanto que nenhum sinal de fluorescência de SYBR Green foi detectada nas amostras de cDNA dos demais *Flavivirus*. Da mesma forma, o uso de cDNA de DENV2-4, separadamente, gerou um aumento significativo do sinal de fluorescência do SYBR Green quando utilizado os respectivos conjuntos de primers específicos, tendo os valores médios de CT de 32,79, 32,90 e 31,28, respectivamente, para DENV-2-4, nas demais amostras de cDNAs virais não foi observado sinal de fluorescência SYBR Green, controles negativos (Tabela 4).

Como a técnica de qPCR SYBR Green, consiste na utilização de um intercalante na dupla fita, no momento da sua polimerização, essa ligação do agente intercalante, ocorre independentemente da especificidade da reação (amplificação). Assim, é necessário o uso da análise pós-amplificação (Curva de Melting) para confirmação do produto amplificado. A amplificação de produtos específicos vs. não específicos foi confirmada, através da análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR, alvos, amplificados. Os perfis de amplificação e as curvas de dissociação para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, juntamente com controles virais negativos de YFV e ZIKV, estão ilustrados na Figura 23. Na reação específica para detectar DENV-1, utilizou-se o cDNA do DENV-1 e o cDNAs dos sorotipos DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV e ZIKV foram usados como controles negativos. Esse desenho experimental foi

repetido para todos os demais sorotipos. Na análise de qPCR com SYBR GREEN para detectar DENV-1 (Tabela 4, Figura 23A,) o cDNA de DENV-1 exibiu um aumento significativo na fluorescência de SYBR Green, com um valor médio de CT de 28,18, os demais cDNAs (DENV-2, DENV-3, DENV-4, YFV e ZIKV) não apresentaram valores de CT significativos, pois não alcançaram a linha do *Threshold*. Quando a amplificação foi realizada para detectar DENV-2, o cDNA de DENV-2 exibiu um aumento significativo na fluorescência de SYBR Green, com um valor médio de CT de 32,79 (Tabela 4, Figura 23C). A amplificação de cDNA de DENV-1, DENV-3, DENV-4, YFV e ZIKV não aumentou significativamente a fluorescência, indicando ausência do alvo DENV-2. Quando a amplificação foi realizada para detectar DENV-3, o cDNA de DENV-3 registrou um aumento significativo no sinal de fluorescência do SYBR Green, com um valor médio de CT de 32,90 (Tabela 4 e Figura 23E). Os cDNA de DENV-1, DENV-2, DENV-4, YFV e ZIKV não geraram qualquer aumento significativo na fluorescência, indicando ausência do alvo específico de DENV-3. Da mesma forma, na amplificação realizada para detectar DENV-4, o cDNA de DENV-4 mostrou um aumento significativo na fluorescência de SYBR Green com uma CT média de 31,28 (Tabela 4 e Figura 23F). De modo semelhante, a amplificação de cDNA de DENV-1, DENV-2, DENV-3, YFV e ZIKV não gerou qualquer aumento significativo na fluorescência, indicando a ausência do alvo específico de DENV-4.

As curvas de dissociação pós-amplificação mostraram apenas um único pico à temperatura de fusão ($T_m = 80,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) esperada para o *amplicon* de DENV-1 utilizando o cDNA de DENV-1, nas demais amostras de cDNA, nenhum pico foi observado (Figura 23B). Adicionalmente, apenas um único pico à temperatura de fusão ($T_m = 79,8\text{ }^{\circ}\text{C}$) foi encontrado para o *amplicon* de DENV-2 utilizando cDNA de DENV-2, mas nas outras amostras de cDNA (Figura 23D), nenhum pico foi observado. De forma semelhante, só um pico à temperatura de fusão ($T_m = 79,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) foi encontrado para o *amplicon* de DENV-3 utilizando cDNA de DENV-3, mas não forma observados picos (temperatura de melting) nas demais amostras de cDNA (Figura 23F). Observou-se um único pico à temperatura de fusão ($T_m = 80,3\text{ }^{\circ}\text{C}$) como esperado para o *amplicon* de DENV-4 utilizando o cDNA de DENV-4, mas não foram observados picos nas demais amostras de cDNA (Figura 23H), esses resultados do perfil de

amplificação e da curva de dissociação confirmam a especificidade dos conjuntos de primers para detecção dos sorotipos do DENV.

Tabela 4: Desempenho da especificidade dos conjuntos de primers para detecção de sorotipos específicos de DENV no ensaio qPCR SYBR Green.

Amostra Viral*	Media do CT da reação em triplicata indicando o sorotipo de DENVs e outros <i>Flavivirus</i> e o par do primer usado			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	STD1-rTS1	STD2-mTS2	STD3-TS3	STD4-rTS4
DENV-1	28,18	N/A	N/A	N/A
DENV-2	N/A	32,79	N/A	N/A
DENV-3	N/A	N/A	32,90	N/A
DENV-4	N/A	N/A	N/A	31,28
ZIKV	N/A	N/A	N/A	N/A
YFV	N/A	N/A	N/A	N/A
H ₂ O	N/A	N/A	N/A	N/A

*Amostra de cDNA de cultura de célula VERO infectada.

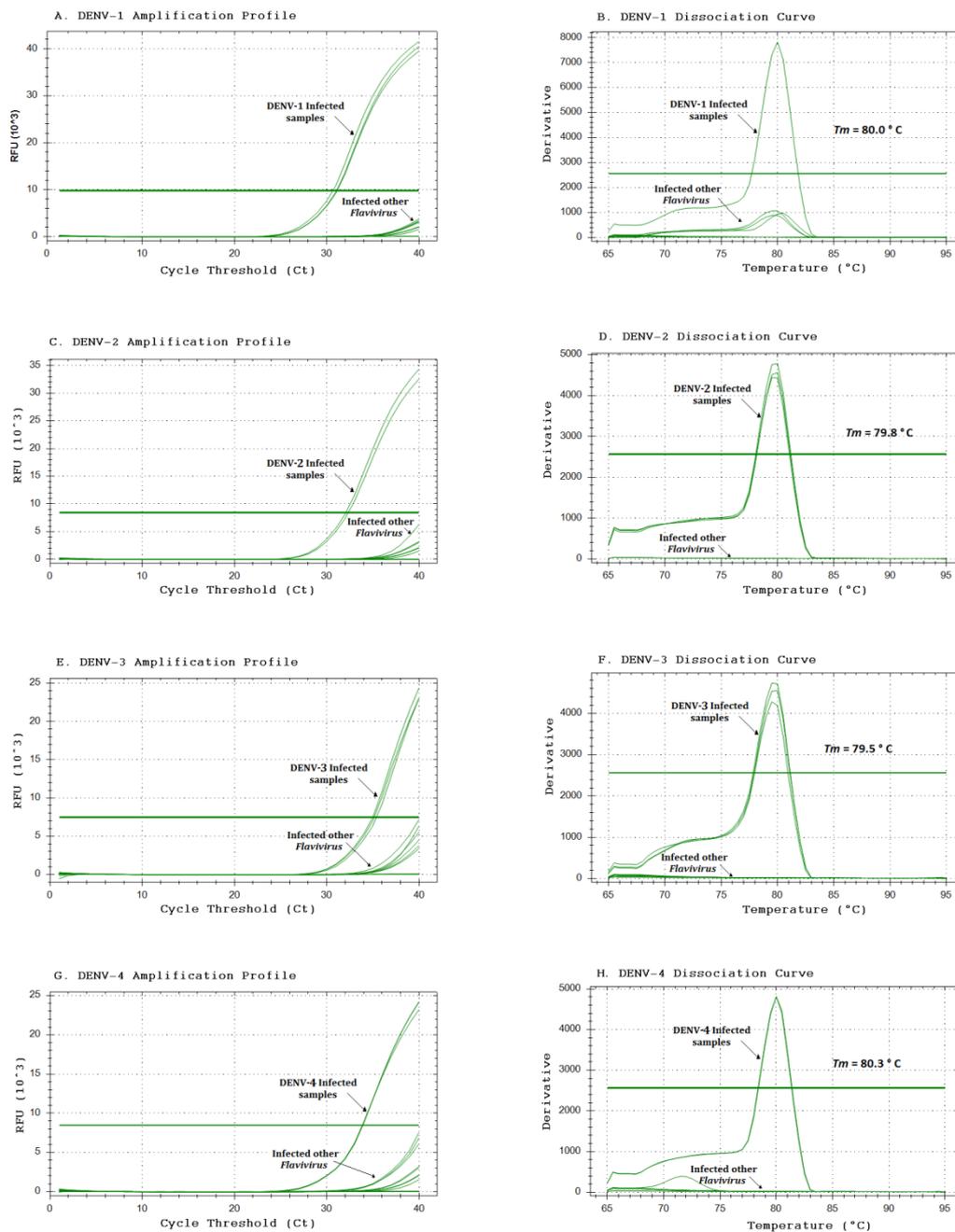


Figura 23 - Os perfis de amplificação e as curvas de dissociação do cDNA de DENV1-4 utilizando o ensaio de PCR SYBR Green.

O perfil de amplificação é mostrado onde o gráfico de amplificação cruza a linha limiar para cada amplificação. A temperatura de fusão (T_m) de cada *amplicon* é mostrada ao lado da sua curva de dissociação.

15.5 Análise dos mosquitos infectados por alimentação e dos ovos dos mosquitos infectados por alimentação

O nosso próximo passo foi fazer a alimentação das fêmeas de mosquito, cepa Liverpool, com o DENV-3 para verificar a transmissão transovariana como descrito em Material e Métodos. No 5º dia após a alimentação, foi colocado papel úmido para coleta dos ovos. No 6º dia após a alimentação, as fêmeas foram retiradas da caixa em conjunto (pools) de 5 fêmeas para obtenção do RNA viral e a produção de cDNA, para detecção do material viral. Do mesmo modo, os ovos coletados no 6º dia, aproximadamente 300 ovos, após o desenvolvimento embrionário, foram homogeneizados e extraído o RNA viral para a produção do cDNA. Tanto a amostra de fêmea quanto a amostra de ovos foram amplificadas com primers específicos para todos os sorotipos de dengue por técnica de PCR Nested convencional. Na Figura 24, está apresentado a imagem representativa do gel de agarose com os produtos de amplificação destas amostras de fêmeas e de ovos. Pode ser observado na coluna LA1, pool de fêmeas infectadas com DENV-3, um produto de PCR amplificado com os primers específicos do DENV-3, correspondente a amplificação do sorotipo, os demais conjuntos de primers do DENV-1, 2 e 4, não foram capazes de amplificar produto de PCR, indicando que as fêmeas tinham sido infectada por alimentação com DENV-3. Do mesmo modo, os primers específicos do DENV-3 amplificaram um produto de PCR na coluna LA3, pool de ovos com DENV-3, relativo ao DENV-3, os demais primers dos DENVs não amplificaram produto de PCR. O resultado desta experiência sugere a transmissão vertical, para prole, do DENV-3 adquirido na alimentação da fêmea em laboratório.

O produto de PCR amplificado da fêmea foi purificado, sequenciado e analisado. Na Figura 25 está apresentado o resultado da busca de sequências virais, utilizando o fragmento genômico sequenciado como sequência molde para busca no programa Blastn no banco de dados do NCBI. Pode ser observado no resultado da busca que todas as 18 sequências recuperadas são relativas a sequências de DENV-3, confirmando o sucesso da infecção do mosquito por DENV-3 em laboratório.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose								
			MM	B	LA1	LA2	LA3	LA4	CP		
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300								DV1
DENV-1 (R)			200								
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200								DV2
DENV-2(R)			100								
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	400								DV3
DENV-3 (R)			300								
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300								DV4
DENV-4 (R)			200								

Figura 24 - PCR dos mosquitos e ovos infectados por alimentação.

Uma imagem do gel de agarose após amplificação por PCR nested convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como Positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controlo negativo; LA1 = Pool de fêmeas infectadas com DENV-3, LA2 = pool de mosquitos controle experimental, LA 3= Pool de Ovos infectados com DENV-3, LA4 = Pool de ovos controle experimental, CP = Controlo Positivo (DV1 = vírus da Dengue tipo 1, DV2 = vírus da Dengue tipo 2, DV3 = vírus da Dengue tipo 3, DV4 = vírus da Dengue tipo 4).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments							Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus type 3 vector p3, complete sequence	80.6	80.6	52%	6e-12	88%	AY656169.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus type 3 strain Sleman/78, complete genome	80.6	80.6	52%	6e-12	88%	AY648961.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/IND/864481/1966, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	JQ922555.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V3175/2008, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	HQ541791.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/MX/BID-V2989/2007, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	FJ898442.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/MX/BID-V2987/2006, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	FJ898441.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/MX/BID-V2985/2003, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	FJ898440.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V2654/2008, complete genome	77.0	77.0	54%	7e-11	86%	FJ850049.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 strain D83-144, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KJ737430.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 strain C0360/94, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KJ737429.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate MKS-2065, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KC762689.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate MKS-0396, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KC762687.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7699/2011, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973487.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7694/2012, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973486.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7674/2011, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973485.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7668/2011, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973484.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7665/2011, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973483.1			
<input type="checkbox"/>	Dengue virus 3 isolate DENV-3/NI/BID-V7663/2011, complete genome	75.2	75.2	52%	2e-10	86%	KF973482.1			

Figura 25 - Resultado da busca de sequência viral no NCBI utilizando a ferramenta BLASTn a partir da sequência de nucleotídeo do obtida no sequenciamento.

Busca feita a partir da sequência de DNA, obtida após resultado do sequenciamento da amostra de produto de PCR amplificado da amostra pool de fêmeas infectada com DENV3 e o conjunto de primers (CD-CDC).

15.6 Análise dos mosquitos e ovos de mosquitos *Aedes aegypti* coletados no campo

Os ovos de mosquitos *Ae. aegypti* do campo são oriundos da cepa representativa da região metropolitana do Rio de Janeiro denominada Aedes-RIO, projeto Avoiding bite, doada pelo (LFCAV), essa cepa foi produzida através do cruzamento de mosquitos, de 5 localidades coletados em 2013, a saber: Niterói, Praça XV, São Gonçalo, Paquetá e Ilha do Governador gerando uma cepa homogênea representativa da região metropolitana do Rio de Janeiro. Proveniente, desta cepa foram utilizados, neste trabalho, as fêmeas geração F2 e os seus respectivos ovos. Para a análise dos mosquitos e dos ovos foram feitas extrações do material genético viral, conjunto de 10 mosquitos por grupo com total de 10 grupos e aproximadamente 4 grupos de 300 ovos. Em seguida, os RNAs dos ovos e dos mosquitos extraídos foram submetidos à síntese de cDNA, conforme protocolo descrito em Material e Métodos. Na primeira etapa de análise, os cDNAs dos ovos e dos mosquitos foram utilizados para o ensaio de PCR convencional, usando o conjunto de primers DC-CDC para detecção de todos os DENVs descritos na Tabela 1. Na Figura 26, podemos observar a imagem representativa do gel de agarose que somente nas colunas denominadas E2, E3 e E4, referente as amostras de cDNA dos ovos, foram amplificados produto de PCR relacionado a algum tipo de sorotipo de DENV. Não foi observado produto de amplificação nos cDNAs de fêmeas coletadas no campo e nem no pool de ovos, coluna E1.

Para sorotipagem do vírus nos ovos da cepa Aedes-RIO foram feitos ensaios utilizando a técnica de PCR Nested convencional. Na figura 27, podemos observar, na imagem representativa do gel de agarose, a amplificação de bandas nas amostras de cDNA de ovos da cepa Aedes-RIO nas colunas E2, E3 e E4, somente na reação específica para a detecção do DENV-4, assim, foi então avaliado que os ovos da cepa Aedes-RIO apresentam o DENV-4, muito provavelmente adquirido pela transmissão vertical.

O produto de PCR amplificado dos ovos foi sequenciado e analisado. Na Figura 28 está apresentado o resultado da busca, utilizando o fragmento genômico sequenciado, dos ovos, como sequência molde para busca com a

ferramenta Blastn no banco de dados do NCBI. Pode ser observado no resultado da busca que todas as 20 sequências recuperadas são relativas ao DENV-4, confirmando a infecção do mosquito da cepa Aedes-RIO por DENV-4.



Figura 26 - PCR dos mosquitos e ovos cepa Aedes-RIO .

Imagem representativa do gel de agarose após amplificação por PCR convencional, o conjunto de primers comum a todos os DENVs (DC-CDC), onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controlo negativo, G01= Pool de mosquitos grupo 1 , G02= Pool de mosquitos grupo 2, G03= Pool de mosquitos grupo 3, G04= Pool de mosquitos grupo 4, G05= Pool de mosquitos grupo 5, G06= Pool de mosquitos grupo 6, G07= Pool de mosquitos grupo 7, G08= Pool de mosquitos grupo 8, G09= Pool de mosquitos grupo 9, G10= Pool de mosquitos grupo 10, E1= Pool de Ovos 1, E2= Pool de Ovos 2, E3= Pool de Ovos 3, E4= Pool de Ovos 4 e DV1 = vírus da Dengue tipo 1, como controlo positivo.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose							
			PM	B	E1	E2	E3	E4	CP	
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300							
DENV-1 (R)			200							
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200							
DENV-2 (R)			100							
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	300							
DENV-3 (R)			200							
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300							
DENV-4 (R)			200							

Figura 27 - Ensaio de PCR Nested convencional com ovos cepa Aedes-RIO.

Imagem representativa do gel de agarose após amplificação por PCR Nested convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controle negativo, E1= Pool de Ovos 1, E2= Pool de Ovos 2, E3= Pool de Ovos 3, E4= Pool de Ovos 4, todos da população Aedes-RIO; CP = Controle positivo (DV1 = DENV-1, DV2 = DENV-2, DV3 = DENV-3, DV4 = DENV-4).

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MSI17/2014 capsid/pre-membrane protein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY461776.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MSI15/2014 capsid/pre-membrane protein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY461775.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MSI14/2014 capsid/pre-membrane protein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY461774.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MEB17/2014 capsid/pre-membrane protein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY461772.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MCCA3/2014 capsid/pre-membrane protein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY461770.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate DENV-4/CR/MNB8/2014 polyprotein gene, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	KY474382.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate TVP/360, complete genome	336	336	98%	1e-88	100%	KU513442.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.44_1981DM polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012032.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.20_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012031.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.7_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012030.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.16_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012029.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.3_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012028.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.15_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012027.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.5_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012026.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.21_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012025.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.12_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012024.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.9_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012023.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.4_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012022.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.10_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012021.2
<input type="checkbox"/> Dengue virus 4 isolate D4M.13_1982 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B, and polyprotein precursor, genes, partial cds	336	336	98%	1e-88	100%	AH012020.2

Figura 28 - Resultado da busca de seqüências utilizando como molde o produto de PCR amplificado e sequenciado dos ovos cepa *Aedes-Rio*.

Busca feita a partir da seqüência de DNA obtida após resultado do sequenciamento da amostra de produto de PCR do E3 amplificado com o conjunto de primers (STD-D2).

Em seguida, foi feita a investigação de DENV em ovos de mosquitos *Ae. aegypti* do município do Rio de Janeiro, oriundos da Urca foram cedidos pelo Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos-RJ) e de Paquetá cedidos pelo LFCAV coletados em outubro de 2015 e janeiro de 2016, respectivamente. Os ovos da geração F1 dos mosquitos da Urca foram divididos em dois *pools* de 300 ovos e o Paquetá apenas um *pool* de 300 ovos.

Além destes, outros ovos de mosquitos do campo foram investigados, oriundos de Bangu e Vila Kennedy coletados em 2016, ambos foram cedidos pela Superintendência de Vigilância Epidemiológica e Ambiental do Estado do Rio de Janeiro. Os ovos foram retirados diretamente das palhetas (de alcatex) usadas na coleta. Dos ovos proveniente de Bangu foi feito um *pool* de 97 ovos e o da Vila Kennedy dois *pools* 135 e 35 ovos, respectivamente.

Além dos ovos de mosquitos, foram também utilizados, neste trabalho, larvas coletadas direto do criadouro natural, tendo sido uma coleta feita no município de Volta Redonda em outubro de 2017 e outra no Bloco A do Centro de Tecnologia (CT), Ilha do Fundão, no município do Rio de Janeiro, em dezembro de 2017. Proveniente, destas coletas foram utilizados, larvas, pulpas e adultos, sendo feitos *pools* de 3 unidades de cada estágio do desenvolvimento.

Para a análise dos ovos, larvas, pulpas e adultos foram feitas extrações do material genético viral. Em seguida, os RNAs dos ovos foram submetidos à síntese de cDNA, conforme protocolo descrito em Material e Métodos. Na primeira etapa de análise, os cDNAs dos ovos foram utilizados para o ensaio de PCR convencional, usando o conjunto de primers STD-D2 para amplificação de um fragmento de 572 pb, comum a todos DENVs, seguido de uma amplificação com conjunto de primers específicos para cada um dos 4 sorotipos, conforme protocolo descrito em Material e Métodos, para sorotipagem do vírus utilizando a técnica de PCR Nested convencional.

Na Figura 29, podemos observar a imagem representativa no gel de agarose, um produto de PCR foi amplificado na coluna Ur1, relativa a um *pool* de ovos coletados na Urca, somente na reação específica para a detecção do DENV-1, assim, foi então determinado que este *pool* coletado na Urca apresentam o DENV-1.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose						
			PM	B	Ur1	Ur2	Pqt	CP	
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300						
DENV-1 (R)			200						
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200						
DENV-2(R)			100						
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	400						
DENV-3 (R)			300						
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300						
DENV-4 (R)			200						

Figura 29 - Ensaio de PCR nested convencional com ovos Urca e Paquetá.

Uma imagem representativa de gel de agarose após amplificação por PCR Nested convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controle negativo, UR1= Pool de Ovos URCA 1, UR2= Pool de Ovos URCA 2, PQT= Pool de Ovos Paquetá; CP = Controle Positivo (DV1 = DENV-1, DV2 = DENV-2, DV3 = DENV-3, DV4 = DENV-4).

Na Figura 30, podemos observar na imagem representativa do gel de agarose, foram observadas duas amplificação de produto de PCR em cDNA CP1 (pool de ovos de Bangu) com os conjuntos de primers de DENV-1 e 2. Na amostra CP2 (pool de ovos de Vila Kennedy) ocorreu a reação específica para a detecção do DENV-2, assim, foi então determinado que os ovos coletados de Bangu estavam co-infectado com DENV-1 e 2 e os da Vila Kennedy somente o DENV-2.

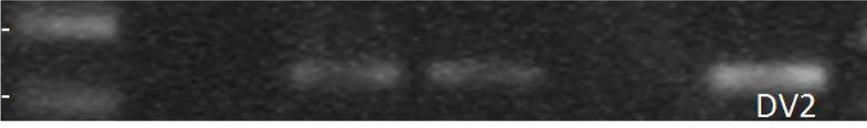
Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose						
			PM	B	CP1	CP2	CP3	CP	
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300						
DENV-1 (R)			200						
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200						
DENV-2(R)			100						
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	400						
DENV-3 (R)			300						
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300						
DENV-4 (R)			200						

Figura 30 - Ensaio de PCR nested convencional ovos Bangú e Vila Kennedy.

Uma imagem do gel de agarose após amplificação por PCR nested convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controlo negativo, CP1= Pool de Ovos Bangú, CP2= Pool de Ovos Vila Kennedy 1, PQT= Pool de Ovos Vila Kennedy 2; CP = Controle Positivo (DV1 = DENV-1, DV2 = DENV-2, DV3 = DENV-3, DV4 = DENV-4).

Na Figura 31, podemos observar no gel de agarose a amplificação de produtos de PCR, das amostras do Município de Volta Redonda, em cDNA de VR1 (pool de larvas 1), VR2 (pool de larvas 2), VR4 (pool de fêmeas) e VR5 (pool de machos), na reação específica para a detecção do DENV-1, VR2 (pool de larvas 2) foi detectado DENV-3, VR1 (pool de larvas 1) e VR4 (pool de fêmeas) para a detecção do DENV-4, assim, foi então determinado que as larvas, pupas e adultos dos mosquitos *Ae. aegypti* coletados em Volta Redonda, apresentam infecções pelos DENV-1, DENV-3 e DENV-4, provavelmente adquirido pela transmissão vertical.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose							
			PM	B	VR1	VR2	VR3	VR4	VR5	CP
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300							
DENV-1 (R)			200							
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200							DV2
DENV-2(R)			100							
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	400							DV3
DENV-3 (R)			300							
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300							
DENV-4 (R)			200							DV4

Figura 31 - Ensaio de PCR Nested convencional de amostra ovos *Urca* e *Paquetá*.

Uma imagem do gel de agarose após amplificação por PCR *Nested* convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controlo negativo, VR1= pool de Larvas 1 de VR, VR2= pool de Larvas 2 de VR, VR3 = pool de pulpas de VR; VR4 = pool de fêmeas de VR, VR5 = pool de macho de VR, CP = Controlo Positivo (DV1 = DENV-1, DV2 = DENV-2, DV3 = DENV-3, DV4 = DENV-4).

Na Figura 32, podemos observar no gel de agarose a amplificação de banda na coluna CT1 (pool de machos de *Ae. Albopictus*) somente na reação específica para a detecção do DENV-1, assim, foi então determinado que as larvas do mosquito *Ae. aegypti* coletados no CT apresentam o DENV-1, muito provavelmente adquirido pela transmissão vertical.

O quadro 1 descreve as informações das amostras de mosquitos apresentada no texto acima.

Específico	Set de primers	Tamanho (pb)	Figura do gel de agarose							
			PM	B	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CP
DENV-1 (F)	STD1-rTS1	225	300							DV1
DENV-1 (R)			200							
DENV-2 (F)	STD2-mTS2	140	200							DV2
DENV-2(R)			100							
DENV-3 (F)	STD3-TS3	302	400							DV3
DENV-3 (R)			300							
DENV-4 (F)	STD4-rTS4	282	300							DV4
DENV-4 (R)			200							

Figura 32 - Ensaio de PCR nested convencional de ovos Ilha do Fundão (CT).

Uma imagem do gel de agarose após amplificação por PCR nested convencional com os conjuntos de primers específicos utilizando o cDNA de DENV1-4 como Positivos, onde as siglas representam: PM = padrão de massa molecular, B = reação de controlo negativo, CT1= Pool de 3 fêmeas de *Aedes aegypti* do CT, CT2 = Pool de 3 macho de *Aedes aegypti* do CT, CT3 = Pool de 3 fêmeas de *Aedes albopictus* do CT, CT4 = Pool de 3 macho de *Aedes albopictus* do CT, CT5 = Pool de 3 larvas de *Aedes* do CT, CP = Controle Positivo (DV1 = DENV-1, DV2 = DENV-2, DV3 = DENV-3, DV4 = DENV-4).

QUADRO 1: informação das amostras de mosquitos		
SIGLA	DESCRIÇÃO	DATA DA COLHETA
LA 1	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> cepa liverpool infectada com DENV3 por alimentação em laboratório	2015
LA 2	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> cepa liverpool não infectada (controle experimental)	2015
LA 3	Ovos das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> cepa liverpool infectada com DENV3 por alimentação em laboratório	2015
LA 4	Ovos das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> cepa liverpool não infectada (controle experimental)	2015
E1	Pool de 300 ovos da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
E2	Pool de 300 ovos da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
E3	Pool de 300 ovos da geração F2 da cepa <i>AedesRio</i>	2013
E4	Pool de 300 ovos da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
UR1	Pool de 300 ovos da geração F1 coletado na Urca	2015
UR2	Pool de 300 ovos da geração F1 coletado na Urca	2015
PQT	Pool de 300 ovos da geração F1 coletado na Ilha de Paquetá	2016
CP1	Pool de 97 ovos da geração F1 coletado Bangu	2016
CP2	Pool de 163 ovos coletado Vila Kennedy	2016
CP3	Pool de 35 ovos coletado Vila Kennedy	2016
VR1	Pool de 3 larvas de <i>Aedes</i>	2017
VR2	Pool de 3 larvas de <i>Aedes</i>	2017
VR3	Pool de 3 pulpas de <i>Aedes</i>	2017
VR4	Pool de 3 fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	2017
VR5	Pool de 3 macho de <i>Aedes aegypti</i>	2017
CT1	Pool de 3 macho de <i>Aedes albopictus</i>	2017
CT2	Pool de 3 fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	2017
CT3	Pool de 3 macho de <i>Aedes aegypti</i>	2017
CT4	Pool de 3 fêmeas de <i>Aedes albopictus</i>	2017
CT5	Pool de 3 macho de <i>Aedes albopictus</i>	2017
G1	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
G2	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
G3	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
G4	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>Aedes-Rio</i>	2013
G5	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013
G6	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013
G7	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013
G8	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013
G9	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013
G10	Pool de 10 fêmeas da geração F2 da cepa <i>aedes-rio</i>	2013

15.7 Análise dos mosquitos e ovos tanto infectados por alimentação quanto os coletados no campo por qPCR.

Afim de confirmar a presença do DENV em todas as amostras analisadas por PCR convencional, foram feitas as análises de qPCR com o cDNA dos ovos para também determinar o número de cópias dos DENV-1-4 em cada amostra.

Na tabela 5, estão apresentada nas linhas as amostras seguida pelo número de Ct e número de cópias, nas colunas as detecções para os DENV1-4, respectivamente.

Tabela 5: Detecção dos DENV1-4 por qPCR nas amostras

Amostras	DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
	Media CTs	n° Copias	Media CTs	n° Copias	Media CTs	n° Copias	Media CTs	n° Copias
LA-1	N/A	N/A	N/A	N/A	34,10	7,15E+02	N/A	N/A
LA-2	N/A							
LA-3	N/A	N/A	N/A	N/A	33,44	6,98E+02	N/A	N/A
LA-4	N/A							
E1	34,05	7,93E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E2	N/A							
E3	34,71	8,13E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	35,40	8,09E+01
E4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	36,43	8,40E+00
UR1	34,54	8,08E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
UR2	33,79	7,85E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
PQT	30,45	6,85E+02	30,31	7,58E+02	N/A	N/A	N/A	N/A
CP1	29,84	6,67E+02	34,07	8,76E+00	N/A	N/A	N/A	N/A
CP2	32,70	7,52E+01	34,83	9,00E+00	N/A	N/A	N/A	N/A
CP3	31,00	7,01E+01	33,72	8,65E+01	N/A	N/A	N/A	N/A
VR1	N/A							
VR2	N/A							
VR3	N/A							
VR4	N/A							
VR5	N/A							
CT1	32,74	7,54E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CT2	33,87	7,88E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CT3	34,12	7,95E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

CT4	32,48	7,46E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CT5	32,39	7,43E+01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	35,48	8,12E+01
G2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G4	34,52	8,07E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G6	34,54	8,08E+00	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
G10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CR1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
*PLD 10¹	8,87	3,60E+09	8,25	6,70E+08	11,61	1,13E+08	12,29	1,26E+08
*PLD 10²	13,28	1,69E+08	12,21	1,91E+08	15,69	2,22E+06	N/A	N/A
*PLD 10³	15,98	2,50E+07	14,01	2,47E+07	19,30	3,19E+05	19,49	3,39E+06
*PLD10⁴	21,06	4,03E+05	21,46	4,81E+05	23,26	4,25E+04	N/A	N/A
*PLD10⁵	23,71	4,82E+04	24,85	5,87E+04	29,12	5,82E+03	25,15	5,06E+04
*PLD10⁶	27,45	5,95E+03	28,19	6,92E+03	N/A	N/A	N/A	N/A
+cDNA viral	26,11	5,54E+03	33,70	8,64E+01	27,72	5,44E+03	22,06	4,15E+04
NEG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

*PLD = plasmídeo dos DENV1-4

+ cDNA viral = cDNA dos DENV1-4 (positivo para cada reação)

NEG = negativo da reação

Através da análise do qPCR obtivemos detecção positiva para o DEN1 em amostras de ovos, que não tinham sido detectadas pelo ensaio de PCR convencional, como: E1 (pool de ovos Aedes -Rio) , E3 (pool de ovos Aedes-Rio), UR2 (pool de ovos, geração F1 Urca) , PQT (pool de ovos, geração F1 Paquetá), CP2 (pool de ovos Vila Kennedy 1), CP3 (pool de ovos Vila Kennedy 2), CT2 (fêmeas de *Ae aegypti*) , CT3 (machos de *Ae aegypti*), CT4 (fêmeas de *Ae albopictus*), CT5(macho de *Ae albopictus*), G4 (fêmeas de Aedes-Rio) e G6 (fêmeas de Aedes-Rio). Já as amostras de ovos provenientes de UR1 (pool de ovos, Urca), de CP1(pool de ovos de Bangu) e de CT1 (machos de *Ae. Albopictus*) foram positivas para DENV1, no ensaio de PCR convencional, e confirmadas pela técnica de qPCR. O DENV2 foi detectado em amostras de ovos oriundos de PQT(Paquetá), CP1(Bangu), CP2 (Vila Kennedy) e CP3 (Vila Kennedy), sendo que nas amostras PQT e CP3 não tinha sido detectado o vírus pelo ensaio de PCR convencional.

Na análise de detecção do DENV-3 somente as amostras de ovos proveniente de fêmeas infectadas com o DENV-3, através da alimentação em laboratório, foram confirmadas como positivas no ensaio de qPCR, tendo sido quantificada com o valor 10^2 cópias do vírus por 300 ovos. Já o DENV-4 foi detectado em amostras de ovos E3 (Aedes-Rio), E4 (Aedes-Rio) e G1 (fêmeas Aedes-Rio) por ensaio de qPCR, porém a amostra G1 não havia sido detectada anteriormente no PCR convencional.

Após as análises dos ensaios de qPCR podemos construir uma tabela de amostras positivas para DENVs, mostrado na tabela 6.

Tabela 6: Análise do PCR e qPCR para DENVs			
Amostras	RESULTADO FINAL		
	PCR	qPCR	PCR+qPCR
LA-1	+	+	+
LA-2	-	-	-
LA-3	+	+	+
LA-4	-	-	-
E1	-	+	+
E2	+	-	+
E3	+	+	+
E4	+	+	+
UR1	+	+	+
UR2	-	+	+
PQT	-	+	+
CP1	+	+	+
CP2	+	+	+
CP3	-	+	+
VR1	+	-	+
VR2	+	-	+
VR3	+	-	+
VR4	+	-	+

VR5	+	-	+
CT1	+	+	+
CT2	-	+	+
CT3	-	+	+
CT4	-	+	+
CT5	-	+	+
G1	-	+	+
G2	-	-	-
G3	-	-	-
G4	-	+	+
G5	-	-	-
G6	-	+	+
G7	-	-	-
G8	-	-	-
G9	-	-	-
G10	-	-	-
CR1	-	-	-
*PLD 10¹	+	+	+
*PLD 10²	+	+	+
*PLD 10³	+	+	+
*PLD 10⁴	+	+	+
*PLD 10⁵	+	+	+
*PLD 10⁶	+	+	+
*cDNA viral	+	+	+
NEG	-	-	-

*PLD = plasmídeo dos DENV1-4 (controles positivos)

+ cDNA viral = cDNA dos DENV1-4 positivo para cada reação

NEG = negativo da reação

Na análise conjunta das amostras provenientes do campo obtivemos um número de 25 amostras positivas para qualquer um dos DENVs num total

32 amostras, como mostrado na tabela 6. Sendo que dessas amostras, a LA1(fêmeas infectadas em laboratório) foi positiva para infecção do DENV3 por alimentação no laboratório, as amostras LA2 (fêmea não infectada), LA4 (ovos de fêmeas não infectadas) e CR1 (cepa *Ae. aegypti* Rockfeller) foram usadas controles experimentais negativos.

Um total de 27 amostras provenientes do campo (ovos, larvas e mosquitos de 2ª geração), 24 delas são positivas para pelo menos um dos sorotipos DENV, ou seja 85% das amostras foram infectadas por transmissão vertical.

15.8 Isolamento do vírus do ovos

Para análise da infecciosidade dos vírus obtido a partir dos ovos do campo foi feito isolamento viral através de cultura de células Vero, seguindo o protocolo de infecção e propagação de vírus descrito no Material e Métodos.

Foram utilizados ovos das amostras E4 (cepa *Aedes*-Rio, positiva para DENV-4) e PQT (proveniente de Paquetá, positiva para DENV-1 e DENV-2) , na Figura 33, observa-se a placa de lise dos vírus isolados.

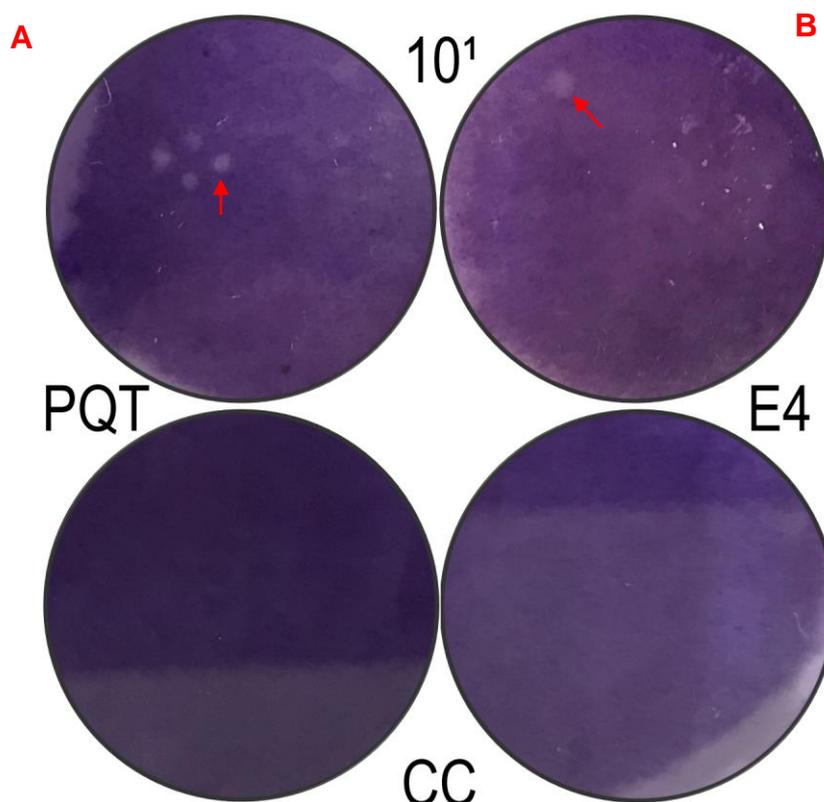


Figura 33 - Isolamento dos ovos PQT e E4.

Na imagem o **CC** representa o controle celular na parte inferior, **10¹** representa a diluição 1/10 na parte superior da imagem, **A** está representado o PQT e **B** está representado o E4.

Pode ser observado que ovos provenientes de Paquetá (PQT) apresentam um título viral de 40 PFU e o E4 um título de 10 PFU. Ao calcularmos o PFU / mL, levando em conta de que o volume de infecção foi de 400 μ L, chegamos a um valor 100 PFU / mL para o PQT e 25 PFU / mL para o E4.

15.9 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão dos ovos

Com o propósito de demonstrar através de imagem de microscopia eletrônica de transmissão a presença do DENV, a amostra do ovo UR1 (Urca) e como controle negativo (ovo da cepa Rockfeller) foram utilizadas no ensaio.

Na Figura 34 (b, d e f) pode ser observado material eletrodens, de forma arredondada, com tamanho em torno de 50 nm de diâmetro, como esperado para as partículas virais de Flavivírus, como os DENVs, no ovo

proveniente da região da Urca (UR1). Já na Figura 34 (a, c e e), de ovos controles não foi observado nenhuma estrutura semelhante. Assim, a presença do DENV foi confirmada dentro dos ovos de mosquitos *Ae. aegypti* coletado no campo.

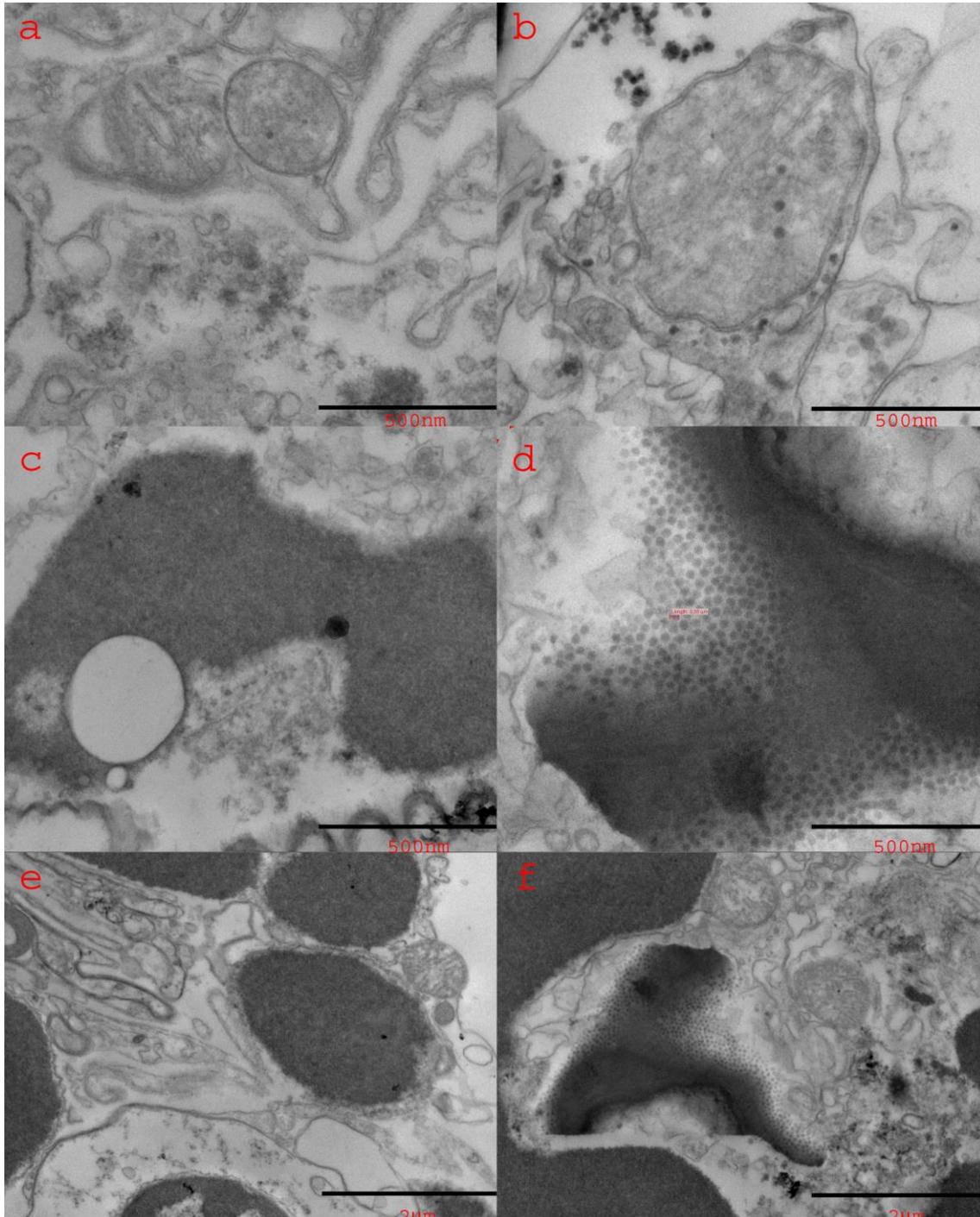


Figura 34 - Microscopia eletrônica de transmissão.

Na imagem o controle negativo dos ovos CR1 estão representados pelas letras **a**, **c** e **e**. Os ovos UR1 estão representados pelas letras **b**, **d** e **f**. Barra de medida das imagens de 1 cm equivale a 500 nm de comprimento para **a**, **b**, **c** e **d**, e 2 μm de comprimento para **e** e **f**.

O conjunto de resultados, deste trabalho, mostram que os novos *primers* específicos confeccionados para identificação de DENV-1-4 foram eficientes tanto no ensaio de PCR convencional quanto no ensaio de qPCR, neste ensaio foi possível medir o número de cópias dos soropitos dos vírus presentes nas amostras. Nos mosquitos alimentados com DENV-3 foi confirmada a infecção com o vírus em fêmeas inteiras e em seus ovos postos.

Na coleta de ovos do campo de diferentes locais do Estado do Rio de Janeiro, em um total de 24 amostras, foram positivas para DENV 85%, tendo sido encontrados os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 pela técnica de PCR convencional ou qPCR. O material viral dos ovos também foi isolado e sequenciado na Plataforma da Fiocruz confirmando a natureza dos sorotipos encontrados em ovos do campo. O vírus do DENV foi isolado de ovos do campo em cultura de células Vero e o ensaio de lise indicou a capacidade infecciosa do vírus encontrados presente nos ovos. Mais estudos são necessários para se comprovar a transmissão transvoaria, em especial o aumento do número de amostras de ovos coletados no campo; e também para testar a hipótese de que sejam os ovos, de fato, um dos reservatórios do DENV, na natureza. Entretanto, este estudo constitui-se uma nova estratégia de prospecção do DENV, como uma possível ferramenta de monitoramento epidemiológico.

16. Discussão

Atualmente, existem diversos kits comerciais para detecção de DENV, o kit CDC DENV-1-4-RT-PCR (sistema TaqMan) é considerado padrão ouro, para detecção e identificação de sorotipo do vírus, este kit foi baseado no artigo de Johnson et al. (2005). Estes autores usaram para detecção específica do sorotipo de dengue um ensaio de PCR com transcriptase reversa em tempo real quadriplex. O kit CDC DENV-1-4-RT-PCR tem uma grande vantagem, pois os quatro sorotipos podem ser identificados, simultaneamente, usando 4 sondas diferentes e cada sorotipo também pode ser identificado separadamente usando a mesma sonda. Entretanto, algumas desvantagens são observadas: primeiro, o custo do kit é elevado; necessita de 3 primers de oligonucleotídicos e 2 deles, necessariamente, são sondas fluorogênicas utilizadas no ensaio DENV específico. Os primers oligonucleotídicos para identificação do DENV-1-4 foram projetados em diferentes regiões do genoma de cada DENV, fato que impossibilita o uso na técnica *Nested* por PCR. Além disso, a sorotipagem do DENV é feita utilizando a mistura de enzimas Invitrogen 2X PCR Master Mix e Superscript III RT / Platinum Taq, com custo elevado. No CDC DENV1-4- RT-PCR, as instruções do kit de ensaio RT-PCR destacam que a sensibilidade do teste é outra questão importante. Observou-se que apenas unidades formadora de placas (PFU) elevadas, aproximadamente 1×10^3 - 10^7 , poderia estar correlacionada com os valores de CT. Neste ensaio, a correlação do valor de CT com 10^3 PFU / mL do soro, seja de 36,36; 36,58; e 36,68 para o DENV 1, 3 e 4, respectivamente, segundo Johnson et al. (2005), uma amostra é determinada empiricamente como negativa se o valor do CT for > 36 , permitindo concluir que o teste do kit CDC DENV-1-4-RT-PCR tem baixa sensibilidade.

Najioullah et al. (2014) avaliaram quatro outros kits RT-qPCR comerciais e compararam com o protocolo de Lanciotti et al, (1992). Todos os kits comerciais usam sonda de 6-carboxifluoresceína (FAM) no sistema TaqMan. Para três deles, Geno-sen, Liferiver, Realstar, a região alvo do vírus

não é especificada e esses kits não podem ser usados para a sorotipagem do DENV. Apenas o kit Simplexa, apresenta a região alvo de detecção para DENV-1-4 e podendo ser usado para sorotipagem de amostras. Najioullah et al. (2014) utilizaram um painel com 162 amostras confirmadas por laboratório: 46 DENV-1, 37 DENV-2, 33 DENV-3 e 46 DENV-4. Os resultados mostraram que nenhum dos kits RT-qPCR comerciais testado alcançaram 100% de sensibilidade na detecção de todos os DENVs, a sensibilidade de Geno-sen foi 85,2%, Realstar 83,3% e Simplexa 93,2%.

Por outro lado, o protocolo de Lanciotti, o mais utilizado, foi indicado para a sorotipagem dos DENVs com primers desenhados na região C-prM (Lanciotti et al., 1992). Chien et al. (2006) redesenhou primers para detectar DENV-1-4 na mesma região de Lanciotti et al., (1992) e comparou com outros protocolos. Os resultados mostraram que a região C-prM é de fato a mais sensível, com 100% de sensibilidade, para detecção dos DENVs quando comparado com os protocolos das regiões: NS5 com 91% (Chao et al., 2007) e 3'NC com 91% de sensibilidade (Chien et al., 2006).

Os métodos de PCR quantitativos, como o ensaio SYBR Green e o sistema de detecção TaqMan, têm sido tradicionalmente usados para a sorotipagem do DENV por apresentar uma faixa de dinâmica e de sensibilidade compatíveis. A detecção do SYBR Green foi mais precisa e produziu um gráfico de decaimento mais linear do que o sistema de detecção TaqMan (Dhar et al., 2002; Chien et al., 2006; Chao et al., 2007). O aumento da sensibilidade e da especificidade na detecção de DENV por qPCR utilizando SYBR Green PCR e *primers* específicos, descritos no presente trabalho; sabe-se que o ensaio SYBR Green PCR é muito rápido e robusto por natureza. A placa de 96 poços, utilizada neste trabalho, pode ser usada para analisar entre 6-10 amostras com 2 ou 3 réplicas, assim os sorotipos DENV-1-4 podem ser testados na mesma placa, junto controles positivos e negativos. O ensaio dura cerca de 2 horas para ser executado utilizando a placa de 96 poços. Após a amplificação, a análise de dados pode levar alguns minutos (Salles et al., 2017). Em contraste, a detecção do sistema TaqMan pode ser usada com múltiplas sondas fluorogênicas para detectar mais de um sorotipo de DENV na mesma reação (Johnson et al., 2005). No entanto, o ensaio TaqMan é mais caro do que o ensaio SYBR Green (Dhar et al., 2002; Chien et al., 2006), em

função do custo das sondas para sorotipagem, o que favorece a utilização do SYBR Green para testes em laboratórios de pesquisa e diagnóstico sorológico em países em desenvolvimento, como no caso do Brasil.

O protocolo de sorotipagem de DENV adotado por Chien et al., (2006) incluiu uma abordagem com custo elevado, um kit de *one step* RT-PCR e uma segunda reação utilizando a enzima HotStarTaq, ambos os kits fornecidos pela QIAGEN (Lanciotti et al., 1992; Chien et al., 2006). Reduções nos custos operacionais do ensaio de detecção de DENV usando uma enzima DNA polimerase, mais barata, e um aumento na sensibilidade do ensaio para detectar os sorotipos foram as nossas principais motivações para redesenhar ou modificar os conjuntos de primers da C-prM previamente estabelecidos, de modo, que pudesse atender a rotina do laboratório

No presente estudo, escolhemos a região do gene C-prM e novos primers foram projetados para serem compatíveis com enzimas polimerase mais baratas para uso do laboratório. Modificamos os primers de um protocolo já existente para a junção C-prM (Chien et al., 2006), projetando 5 novos primers senso para formar conjuntos de sorotipagem dos DENVs. Este protocolo recém-estabelecido utiliza um método de detecção do tipo *Nested* PCR convencional e um ensaio quantitativo PCR por SYBR Green (Salles et al., 2017).

Para detectar todos os DENVs, primeiramente foi realizada uma técnica de *Nested* PCR convencional revelada pela técnica gel de agarose (Figura 21). Substituímos o *primers* senso mD1 descrito por Chien et al., (2006) pelo *primers* senso STD na primeira reação do ensaio. Na segunda reação, também substituímos o *primers* senso mD1 (Chien et al., 2006) pelos primers senso mais específicos STD1, STD2, STD3 e STD4, um para cada seqüência de DENV, criando um ensaio de *Nested* PCR usando a enzima Phusion DNA polimerase, uma enzima mais barata do que as enzimas anteriormente usadas em estudos de detecção de DENV (Lanciotti et al., 1992; Chien et al., 2006; Thongrunkiat et al., 2011). Assim, foi aumentada a eficiência e reduzido os custos do protocolo para a sorotipagem do DENV. Com isso, obtivemos resultados de sorotipagem precisos e reprodutíveis com os novos primers senso específicos (STD1, STD2, STD3 e STD4) em conjunto como os primers anti-senso adotados por Chien et al. (2006) para detectar DENV1-4.

A partir disto, fomos testar a eficiência dos novos conjuntos de *primers* no ensaio de qPCR SYBR Green, onde o valor da eficiência deve ficar no intervalo entre 90-110% que indica uma duplicação do *amplicon* a cada ciclo (Thornton & Basu, 2011). A Tabela 3 mostra que os valores de eficiência da qPCR com os novos conjuntos de primers (STD1 / rTS1; STD2 / mTS2; STD3 / TS3 e STD4 / rTS4) usando tanto no ensaio com o plasmídeo viral quanto no ensaio que utiliza cDNA como molde, os valores de eficiência foram maiores que os valores encontrados na literatura (Chien et al., 2006), exceto para o cDNA do DENV2, confirmando que os novos primers são apropriados para sorotipagem do DENV com alta eficiência.

A especificidade dos novos conjuntos de primers para detectar DENV-1-4 foi determinada através da análise das curvas de temperatura de dissociação pós-amplificação (curva de *Melting*) utilizada no ensaio SYBR Green. Uma curva de dissociação com um único pico à temperatura esperada para cada *amplicon* indica uma amplificação específica. Na Figura 23, a presença de um único pico pode ser observada em cada um dos cDNA de DENV-1-4 testado e a ausência de picos nos cDNAs de outros *Flavivírus* utilizados como controles negativos no mesmo ensaio. No ensaio de PCR SYBR Green, uma amostra é considerada positiva quando o gráfico de amplificação cruza a linha limite (*threshold*). No exemplo da Figura 23A, pode-se observar que o perfil de amplificação da amostra infectada com DENV-1 excede a linha limite, enquanto os perfis de amplificação das outras amostras virais não atingem este limiar. Este parâmetro representa a linha de base da detecção de fluorescência, isto é, o número mínimo de ciclos de amplificação. O número de ciclos é determinado pelo sistema de análise de software usado. O ponto em que o sinal de fluorescência da amostra é superior ao limite de detecção / quantificação de fluorescência indica o número de ciclos necessários para detectar o produto amplificado da sequência alvo do gene presente no DNA de cada amostra a ser determinada. Dessa forma, o valor é denominado Ciclo *Threshold* (CT) e permite a quantificação relativa ou absoluta de DNA de cada amostra após ser corrigida pelo CT do controle endógeno do gene e / ou controle de amostra. O CT é proporcional ao logaritmo da quantidade de expressão do gene alvo em uma dada amostra. Quanto menor o valor de CT obtido do gene alvo na amostra comparado a outro gene endógeno

indica a maior expressão relativa ou maior concentração deste gene (quantificação absoluta).

O ensaio de qPCR descrito no presente estudo é altamente sensível e capaz de detectar até pouco mais de uma cópia do genoma do DENV máximo de 40 ciclos (Figura 23). Uma relação linear entre o número de cópias do DNA plasmidial com valores de CT de 10^6 até 3 cópias de DENV pôde ser observada (Tabela 2A). Além disso, qualquer resultado negativo, ou seja, amostras com valores de CT superiores ao 36,5 devem ser testadas pelo menos duas vezes para confirmação.

Na sorotipagem de DENV por qPCR SYBR Green, uma amostra será considerada positiva quando o gráfico de amplificação cruza a linha limite linear. Como podemos ver, no exemplo, (Figura 23A) o gráfico de amplificação da amostra infectada com DENV-1 excede a linha limite no ciclo (28.18), enquanto que o gráfico de amplificação das amostras negativas não alcançaram a linha limite. O perfil da curva de dissociação depende da composição das bases CG e do comprimento da sequência amplificada, devendo o produto não específico ser diferenciado pelo exame da curva de dissociação. O fragmento amplificado de DENV-1 produziu uma curva de dissociação específica exibindo um único pico a 80,0 °C, o que é esperado para o produto de amplificação específico de DENV-1 (Figura 23B). Com o objetivo de determinar a especificidade, qualidade e eficiência da reação, os cDNAs de todas as amostras virais foram amplificados em paralelo para cada vírus alvo, desse modo, fomos capazes de discriminar cada gene alvo pela sua curva de dissociação, de acordo com a temperatura de fusão prevista (T_m para DENV-2 foi de 79,8 ° C, T_m para DENV-3 foi de 79,5 ° C e T_m para DENV-4 foi de 80,3 ° C, Figura 23D, F e H).

Com as padronizações das técnicas de *Nested* PCR convencional e qPCR SYBR Green, analisamos as amostras mosquitos, obtidas tanto por infecção das fêmeas do *Ae. aegypti* em laboratório por alimentação com DENV3 e seus ovos quanto as amostras de mosquitos (larvas, pulpas e ovos) coletados no campo. Inicialmente, foi feita a análise das fêmeas e seus ovos por *Nested* PCR convencional mostrando que era possível detectar a presença do DENV-3 tanto nas fêmeas e quanto em ovos. Confirmando a transmissão transovariana do DENV-3 em laboratório e a capacidade do novo protocolo em

detectar o vírus em ovos dos mosquitos *Aedes aegypti* (Figura 24). A capacidade das fêmeas realizarem a transmissão transovariana do DENV-1 em infecção feita por alimentação foi documentada por Buckner et al., (2013), outros estudos demonstraram que os DENVs podem ser mantidos por transmissão transovariana durante várias gerações de mosquitos *Ae. aegypti* em condições de laboratório (Joshi et al., 2002; Wasinpiyamongkol et al., 2003; Rohami et al., 2008).

Em seguida, foram feitas as análises em mosquitos em outros estágios do desenvolvimento, larvas, pulpas e ovos de *Ae. aegypti* de campo, foram utilizadas amostras de ovos da geração F2 da cepa representativa do Rio de Janeiro (cepa *Aedes*-RIO), onde foi detectado o DENV-4, em três dos quatro pools de ovos analisados (Figuras 26 e 27), este resultado está de acordo com o dado de prevalência de DENV-4 apresentado na Figura 7. As amostras de ovos coletadas no bairro da Urca, na Ilha de Paquetá, em Vila Kennedy, em Bangú, no Município de Volta Redonda e na Ilha do Fundão foram detectados sorotipos específicos do ano e da localidade (Figuras 29, 30, 31 e 32).

Após as análises das amostras por *Nested* PCR convencional, todas elas foram submetidas ao ensaio de qPCR, onde a maioria delas foram positivas para algum sorotipo do DENV. As amostras E1, UR2, PQT, CP2, CP3, CT2, CT3, CT4, CT5, G4 e G6, que, anteriormente, não foram detectadas no *Nested* PCR convencional, foram positivas para DENV no ensaio de qPCR SYBR Green (tabela 5).

Na tabela 6, sumariza a detecção dos sorotipos pelas técnicas de PCR convencional e quantitativo, onde foram analisadas 27 amostras provenientes do campo (ovo, larva, pulpa, adulto macho e fêmea) em 85% delas foram detectados os DENVs, este resultado reforça a nossa hipótese de que a transmissão transovariana ocorre, de fato, na natureza, uma vez que todas as amostras de campo, são geração seguinte, por terem sido coletados no estágio de ovos e larvas do mosquito *Ae. Aegypti*, assim os mosquitos adultos são proveniente das formas imaturas.

A ocorrência da transmissão transovariana natural de DENV já havia sido relatada em mosquitos do gênero *Aedes* (Thongrungkait et al., 2011; Martins et al., 2012; Cruz et al., 2015), sendo que, na literatura, a detecção feita

em ovos não havia ainda sido descrita, geralmente, a detecção foi feita nas larvas ou mosquitos.

Mourya et al., (2001) demonstraram que os mosquitos de fêmeas infectadas, em laboratório, via transmissão transovariana podem transmitir o DENV por via oral. Resultados de Thongrungrakait et al. (2011) suportam a ocorrência de uma alta taxa de infecção do DENV por transmissão transovariana em mosquitos adultos vetores, como sendo um sinal epidemiológico importante, podendo ser usada como ferramenta de vigilância.

Assim, os resultados obtidos neste estudo e em estudos anteriores apoiam a hipótese de que a transmissão transovariana do DENV ocorram na natureza, sugerindo que estudos de vigilância epidemiológica em ovos tem potencial como ferramenta na detecção de DENV, de modo rápido em áreas de possível ocorrência de surto de dengue. O aumento das taxas de detecção de ovos infectados por DENV pode fornecer um sinal de alerta precoce de uma epidemia de dengue iminente, sendo assim, pode ser possível realizar intervenções de controle epidêmico, como o combate do vetor para suprimir a transmissão da doença e evitar que a doença se espalhe para novas áreas, similar ao estudo de Thongrungrakait et al., (2011) feito em mosquito adulto.

O presente estudo de detecção dos DENVs em ovos, poderá contribuir como ferramenta de vigilância epidemiológica, seguido da intervenção de combate ao vetor, de forma mais eficaz para diminuir o número de casos de dengue.

17. Conclusão

- O protocolo desenvolvido e validado nesse trabalho para detecção dos DENVs, por *Nested* PCR convencional, utilizou os novos conjuntos de *primers* para sorotipagem e a enzima Phusion DNA High-Fidelity polimerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) de alto rendimento e mais barata, do que as enzimas usadas anteriormente para detecção de DENV.
- O protocolo de quantificação por qPCR foi estabelecido e validado, observou-se a eficiência dos *primers* desenhados para sorotipagem em função da curva de dissociação e da temperatura de Melting. Foi possível associar um valor de CT correspondente ao N^o de cópias de DNA dos plasmídeos (curva padrão) para quantificar os diferentes sorotipos de dengue, em diferentes amostras.
- Alimentação artificial do mosquito em DENV-3 foi efetiva, pois foi observada a presença do vírus na fêmea de 6^o dia após a infecção e em ovos após o desenvolvimento embrionário, comprovando assim a transmissão transovarina em laboratório.
- Em ovos coletados no campo, em diversas localidades do Estado do Rio de Janeiro foi encontrado a presença de todos os DENVs, o que sugere a transmissão transovariana, na natureza.
- O isolamento de DENV dos ovos, confirma a infecciosidade dos vírus encontrado em ovos mostrando que o vírus é capaz de infectar novas células.
- O resultado de microscopia eletrônica de transmissão, sugere a presença de partículas virais dentro de ovos, coletados no campo, do mosquito *Ae. Aegypti*, este resultados podem ser confirmado por ainda por anticorpo anti-DENV.
- O método, proposto neste trabalho, foi capaz de detectar os DENVs em menor quantidade do que em outros métodos descritos na literatura. A detecção do vírus em ovos dos mosquitos *Ae. Aegypti* pode auxiliar os estudos de monitoramento epidemiológico, indicando uma ação de intervenção no combate ao vetor em áreas estratégicas, evitando assim o espalhamento do mosquito infectado para outras áreas.

Referências Bibliográficas

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., *Imunologia Básica. Mecanismos Efetores da Imunidade Humoral. Capítulo 8. 2ª edição. 157-176, 2006.*

Barba-Spaeth, G., Longman, R.S., Albert, M.L., Rice, C.M. Live Attenuated Yellow Fever 17D Infects Human DCs and Allows for Presentation of Endogenous and Recombinant T Cell Epitopes. *J. Exp. Med.* 202, 1179–1184, 2005.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*; 496: 504–07, 2013.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL et.al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*;496(7446):504-507., 2013.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.*;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760., 2012.

Braga I.A. & Valle D. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol. Serv. Saude* 16:4., 2007.

Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.*;87(4):584–93, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention. Dengue map. <http://www.healthmap.org/dengue/en/> accessed June 19, 2014.

Chambers, T.J., Weir, R.C., Grakoui, A., McCourt, D.W., Bazan, J.F., Fletterick, R.J., Rice, C.M. Evidence That the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8898–8902, 1990.

Chao DY, Davis BS, Chang G. Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 584-589, 2007.

Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, et al. Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays to Detect and Serotype Dengue Viruses. *Journal of clinical microbiology* 44: 1295-1304. 0095-1137/06/\$08.000., 2006.

Chu, P.W.G., Westaway, E.G. Molecular and Ultrastructural Analysis of Heavy Membrane-Fractions Associated With the Replication of Kunjin Virus RNA. *Arch. Virol.* 125, 177–191, 1992.

Clum, S., Ebner, K.E., Padmanabhan, R. Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 is Required for Efficient *in Vitro* Processing and Is Mediated Through the Hydrophobic Regions of NS2B. *J. Biol. Chem.* 272, 30715–30723, 1997.

Combata Dengue, como combater, <http://www.combatadengue.com.br/como-combater>, 20/01/2011

Combate à dengue, Historico, www.combateadengue.com.br, 16/08/2010

Consoli, R.A.G.B. and Oliveira, R.L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 228 p. ISBN 85-85676-03-5, 1994.

Cruz LC, Serra OP, Leal-Santos FA, Ribeiro AL, Silhessarenko RD, Santos MA. Natural transovarial transmission of dengue virus 4 in *Aedes aegypti* from Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* Jan-Feb;48(1):18-25. doi: 10.1590/0037-8682-0264-2014, 2015.

Dengue.org.br, Prevenção da Dengue http://www.dengue.org.br/dengue_prevenir.html, 20/01/2011

Dhar AK, Roux MM, Klimpel KR Quantitative assay for measuring the Taar syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry. *Journal of Virological Methods* 104: 69-82, 2002.

Diário Oficial da União, Brasília, DF, Brazil. 2015. Available from: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/106783857/dou-suplemento-secao-1-28-12-2015-pg-4>. Accessed 28 Dec 2015.

Dokland, T. *et al.* West Nile Virus Core Protein; Tetramer Structure and Ribbon Formation. *Structure (Camb)* 12, 1157–1163, 2004.

Dong, H.P., Ray, D., Ren, S.P., Zhang, B., Puig-Basagoiti, F., Takagi, Y., Ho, C.K., Li, H.M., Shi, P.Y. Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *J. Virol.* 81, 4412–4421, 2007.

Dumard, C. H.; Barroso, S.P.; de Oliveira, G. A.; Carvalho, C. A.; Gomes, A. M.; Couceiro, J. N.; Ferreira, D. F.; Nico, D.; Oliveira, A. C.; Silva, J. L.; Santos, P. S. Full Inactivation of Human Influenza Virus by High Hydrostatic Pressure Preserves Virus Structure and Membrane Fusion While Conferring Protection to Mice against Infection. *PLoS One* 8, e80785, 2013.

Eram, S. *et al.* Epidemic Dengue Hemorrhagic Fever in Rural Indonesia: II. Clinical Studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 711–716, 1979.

Folha - Vacina Contra a Dengue Deve Ser Comercializada em Três Anos. www.folhaonline.com.br em 09/02/2010.

Ghosh, D. and Basu, A. Present Perspectives on Flaviviral Chemotherapy, National Brain Research Centre, Manesar, Haryana 122050, Indi Drug Discovery Today Volume 13, Numbers 13/14, 629-624, 2008.

Gould, E.A., Solomon, T. Pathogenic Flaviviruses. *Lancet*, 371, 500-509, 2008.

Gubler D.J. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. *Clin. Micro. Rev* 11, 480-496, 1998.

Guzman, M. G. *et al.* Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e811, 2010.

Guzman, M. G., Buchy, P., Enria, D. & Vazquez, S. in *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* 2nd edn (eds Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S. & Farrar, J.) 184–213 (CAB International), 2014.

Guzman, M. G., Rosario, D. & Kouri, G. in *Molecular Biology of the Flavivirus* (eds Kalitzky, M. & Borowski, P.) 191–223 (Horizon Bioscience), 2006.

Halstead, S. B. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr. Int. Child Health* 32 (Suppl. 1), 5–9, 2012.

Halstead, S. B. Dengue virus–mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 273–291, 2008.

Halstead, S.B. Dengue. *Lancet*, 370, 1644-1652, 2007.

Hayes, E.B., Gubler, D.J., Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Ped. Infect. Dis. J.* 11, 311–317, 1992.

Holmes, E.C., Twiddy, S.S. The Origin, Emergence and Evolution Genetics of Dengue Virus. *Infection, Genetics and Evolution* 3: 19 – 28 www.elsevier.com/locate/meegid. 2003.

Hunsperger, E. A. *et al.* Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 436–440, 2009.

Hunsperger, E. A. *et al.* Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3171, 2014.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 43(10):4977-83, 2005.

Joshi, V., D.T. Mourya, and R.C. Sharma. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 158–161, 2002.

Kho, L. K., Sumarmo, Wulur, H., Jahja, E. & Gubler, D. J. Dengue Hemorrhagic Fever Accompanied by Encephalopathy in Jakarta. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 12, 83–86, 1981.

Krishnan, M.N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J.L., Hodge, T.W., Fikrig, E. Rab 5 is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses. *J. Virol.* 81, 4881–4885, 2007.

Lai, C.J., Monath, T.P. Chimeric Flaviviruses: Novel Vaccines Against Dengue Fever, Tick-borne Encephalitis, and Japanese Encephalitis. *Advances in Virus Research*, 61, 469-509, 2003.

Li, H., Clum, S.R., You, S., Ebner, K.E., Padmanabhan, R. The Serine Protease and RNA-Stimulated Nucleoside Triphosphatase and RNA Helicase Functional Domains of Dengue Virus Type 2 NS3 Converge Within a Region of 20 Amino Acids. *J. Virol.* 73, 3108–3116, 1999.

Li, L., Lok, S.M., Yu, I.M., Zhang, Y., Kuhn, R.J., Chen, J., Rossmann, M.G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* 319, 1830–1834, 2008.

Lindenbach, B. D., Thiel, H-J. e Rice, C. M., em *Fields Virology* (eds Knipe, D. M. e Howley, P. M.) 1101–1152 (Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia) 2007.

Lozach, P.Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J.L., Rey, F.A., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F., Amara, A. Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Non-Integrin (DCSIGN)- Mediated Enhancement of Dengue Virus Infection is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J. Biol. Chem.* 280, 23698–23708, 2005.

Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J. & Post, C. B. Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 3414–3419, 2004.

Maciel-de-Freitas R, Marques WA, Peres RC, Cunha SP & Lourenço-de-Oliveira R. Variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) container productivity in a slum and a suburban district in Rio de Janeiro during dry and wet seasons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 489–496, 2007.

Mackenzie, J. Wrapping Things Up About Virus RNA Replication. *Traffic* 6, 967–977, 2005.

MacKenzie, J.M., Westaway, E.G. Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear to Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and Along the Secretory Pathway, Respectively. *J. Virol.* 75, 10787–10799, 2001.

Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, Malasit P, Limjindaporn T, Finley Jr RL. Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PLoS One.*; 8: e53535., 2013.

Mancini, E. J., Clarke, M., Gowen, B. E., Rutten, T. & Fuller, S. D. Cryo-Electron Microscopy Reveals the Functional Organization of an Enveloped Virus, Semliki Forest Virus. *Mol. Cell* 5, 255–266, 2000.

Marianneau, P., Steffan, A.M., Royer, C., Drouet, M.T., Jaeck, D., Kim, A., Deubel, V. Infection of Primary Cultures of Human Kupffer Cells by Dengue Virus no Viral Progeny Synthesis, But Cytokine Production is Evident. *J. Virol.* 73, 5201–5206, 1999.

Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, Guedes MI. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One.*;7(7):e41386. doi: 10.1371/journal.pone.0041386., 2012.

Mascarenhas, F. Fiocruz Pretende Desenvolver Vacina Contra a Dengue. <http://cienciaevida.atarde.com.br/?p=3859>, em 08/19/2009.

Matusan, A.E., Kelley, P.G., Pryor, M.J., Whisstock, J.C., Davidson, A.D., Wright, P.J. Mutagenesis of the Dengue Virus Type 2 NS3 Proteinase and the Production of Growth-Restricted Virus. *J. Gen. Virol.* 82, 1647–1656, 2001.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue Análise de Situação e Tendências. www.saude.gov.br, em 12/08/2010.

Monath, T.P., Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2395–2400, 1994.

Mourya, D.T., M.D. Gokhale, A. Basu, P.V. Barde, G.N. Sapkal, V.S. Padbidri, and M.M. Gore. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta. Virol.* 45: 67–71, 2001.

Mukhopadhyay S., Kuhn, R.J. e Rossmann, M.G. A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 13–22, 2005.

Munoz-Jordan, J. L. *et al.* Inhibition of α/β interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, 8004–8013, 2005.

Murray, C. J. *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 disease and injuries in 21 regions, 1990– 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380, 2197–2223, 2012.

Nimmannitya, S. Clinical Spectrum and Management of Dengue Haemorrhagic Fever. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 18, 392–397, 1987.

O Globo – Jornal O Globo. www.oglobo.com.br em 03/08/2010.

O Globo – Portal G1 da Globo. Casos de Dengue Tipo 4 em Roraima São Confirmados no Pará. <http://g1.globo.com/brasil/noticia/2010/08/casos-de-dengue-tipo-4-em-roraima-sao-confirmados-no-para.html> em 12/08/2010.

Ouvidoria Anvisa: National Health Surveillance Agency. Manifestações envolvendo a aplicação da vacina contra a dengue. 2017. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111522/3613595/Tema+de+Destaque++Novembro_Dezembro+2017/c64fc913-6b39-4e06-92d9-a485e1af174d. Accessed 31 Jan 2018.

Pan American Health Organization & World Health Organization. Zika virus (ZIKV) surveillance in the Americas: laboratory detection and diagnosis. Algorithm for detecting Zika virus (ZIKV). PAHO <http://www.paho.org/hq/index.php?option=comdocman&task=docview&gid=30176&Itemid=270>, 2016.

Pan American Health Organization. Dengue mortality rate for countries and territories of the Americas, 1990–2017. 2018. Available from: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/denguenacional-en/253-dengue-mortalidad-tasa-en.html?showall=&start=2>. Accessed 27 Feb 2018.

Pan American Health Organization. Distribution of dengue virus serotypes in the Americas, 1990–2017. 2018. Available from: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/254-dengue-incidencia-en.html?showall=&start=3>. Accessed 27 Feb 2018.

Pan American Health Organization. Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion) 1980–2018. 2018. Available from: <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>. Accessed 2 Feb 2018.

Peiris, J.S.M., Dittus, W.P.J., Ratnayake, C.B. Seroepidemiology of dengue and other arboviruses in a natural population of toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. *J. Med. Primatol.* 22, 240–245. 1993.

Perera, R., Khaliq, M. e Kuhn, R.J. Closing the Door on Flaviviruses: Entry as a Target for Antiviral Drug Design. *Antiviral Res.* 80, 11-22, 2008.

Pramulijo, H. S. & Harun, S. R. Ultrasound Findings in Dengue Haemorrhagic Fever. *Pediatr. Radiol.* 21, 100–102, 1991.

Ray, D., Shi, P.Y. Recent Advances in Flavivirus Antiviral Drug Discovery and Vaccine Development. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* 1, 45–55, 2006.

Reuters. Philippines says anti-dengue vaccine may be connected to three deaths. 2018. Available from: <https://www.reuters.com/article/us-sanofidengue-philippines/philippines-says-anti-dengue-vaccine-may-beconnected-to-three-deaths-idUSKBN1FM0SP>. Accessed 2 Feb 2018.

Reynolds E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 17(1): 208–212, 1963.

Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution. *Science* 229, 726–733, 1985.

Rodhain F. The Role of Monkeys in the Biology of Dengue and Yelow Fever. *Comp. Immunol. Micro. Infect. Dis.* 14, 9-19, 1991.

Rohani, A., I. Zamree, R.T. Joseph, and H.L. Lee. Persistency of transovarial dengue virus in *Aedes aegypti* (Linn.). *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 39: 813–816, 2008.

Rudnick A. Ecology of Dengue Virus. *Asian J. Infect, Dis.* 2, 156-160, 1978.

Rudnick, A. The ecology of the dengue virus complex in peninsular Malaysia. In: Pang, T., Pathmanathan, R. (Eds.), *Proceedings of the International Conference on Dengue/DHF*. University of Malaya Press, Kuala Lumpur, p. 7, 1984.

Sampath, A., Padmanabhan, R., Molecular Targets for Flavivirus Drug Discovery. *Antiviral Research* 81, 6-15, 2009.

San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.*;82:128–35, 2010.

Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Butantã deve ter vacina contra dengue em 2010, <http://gaia.saude.mg.gov.br/blog/2010/01/butantan-deve-ter-vacina-contra-dengue-em-2010>, em 28/01/2010

Secretaria de Saúde do Estado Rio de Janeiro; LIRAa: Região do Médio Paraíba. www.riocontradengue.com.br, 2008.

Shepard, D. S., Coudeville, L., Halasa, Y. A., Zambrano, B. & Dayan, G. H. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 200–207, 2011.

Shepard, D. S., Halasa, Y. A. & Undurraga, E. A. in *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* 2nd edn (eds Gubler, D. J., Ooi, E. E., Vasudevan, S. & Farrar, J.) 50–77 (CAB International), 2014.

Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A. & Stanaway, J. D. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 16, 935–941, 2016.

Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab. Immunol.*;11: 642–50, 2004.

Slonczewski, J.L. & Foster, J.W. *Em Microbiology: an evolving science*, 2009. http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sense_RNA_Virus:_West_Nile_Virus, em 01/09/2010.

Solanki HA, Shankar SS, Pandya HA Dengue as a Druggable Disease: A Review. *J Fever*, 1, 2017.

Stadler, K., Allison, S.L., Schlich, J. & Heinz, F.X. Proteolytic Activation of Tick-borne Encephalitis Virus by Furin. *J. Virol.* 71, 8475–8481, 1997.

Stiasny, K., Allison, S.L., Marchler-Bauer, A., Kunz, C. & Heinz, F.X. Structural Requirements for Low-pH-Induced Rearrangements in the Envelope Glycoprotein of Tick-borne Encephalitis Virus. *J. Virol.* 70(11), 8142-8147, 1996.

Stiasny, K., Fritz, R., Pangerl, K. e Hans, F.X. Molecular Mechanisms of Flavivirus Membrane Fusion. *Amino Acids*, 2009.

Subramanian, V., Shenoy, S. & Joseph, A. J. Dengue Hemorrhagic Fever and Fulminant Hepatic Failure. *Dig. Dis. Sci.* 50, 1146–1147, 2005.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2011.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2012.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2013.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2014.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2015. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2016.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 2 Nov 2017. 2017.

SVS. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Guia de vigilância. Epidemiológica: Secretaria de Vigilância em Saúde; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Accessed 14 set 2018, 2018.

Tang, K. F. & Ooi, E. E. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 895–907, 2012.

Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfherer, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L., Steinman, R.M., Schlesinger, S., Marovich, M.A. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 197, 823–829, 2003.

Thongrungrat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 36 (1):147-152, 2011.

Thornton B and Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, 39:145–154, 2011.

Vazquez, S., Hafner, G., Ruiz, D., Calzada, N. & Guzman, M. G. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *J. Clin. Virol.* 39, 194–198, 2007.

Venkata Sai, P. M., Dev, B. & Krishnan, R. Role of Ultrasound in Dengue Fever. *Br. J. Radiol.* 78, 416–418, 2005.

Vieira, I. Fiocruz quer parceria tecnológica com a GSK, <http://www.saudebusinessweb.com.br/noticias/index.asp?cod=68317>, em 09/05/2010.

Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.*; 11:164, 2015.

Wahala, W.M., Donaldson, E.F., de Alwis, R., Accavitti-Loper, M.A., Baric, R.S., de Silva, A.M. Natural Strain Variation and Antibody Neutralization of Dengue Serotype 3 Viruses, *Plos Pathog.* 6, 1-10, 2010.

Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D.T., Watowich, S.J., Gubler, D.J., Weaver, S.C., Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J. Virol.* 74, 3227–3234. 2000.

Wang, W.-K., Lin, S.-R., Lee, C.-M., King, C.-C., Chang, S.-C.. Dengue Type 3 Virus in Plasma is a Population of Closely Related Genomes: Quasispecies. *J. Virol.* 76, 4662–4665. 2002.

Wasinpiyamongkol, L., S. Thongrungrat, N. Jirakanjanakit, and C. Apiwathnasorn. Susceptibility and transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti*: A preliminary study of morphological variations. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 34 (Suppl. 2): 230–232, 2003.

Weaver, S.C., Ferro, C., Barrera, R., Boshell, J., Navarro, J. Venezuelan Equine Encephalitis. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 141–174, 2004.

Wengler, G., Wengler, G. Cell-associated West Nile flavivirus is Covered With E+pre-M Protein Heterodimers Which are Destroyed and Reorganized By Proteolytic Cleavage During Virus Release. *J. Virol.* 63, 2521-2526, 1989.

Whitehead, S.S., Blaney, J.E., Durbin, A.P., Murphy, B.R., Prospects for a Dengue Virus Vaccine. *Nature Reviews Microbiology* 5, 518-528, 2007.

WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment Prevention and Control, Geneva, 1997.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 1999.

WHO. International travel and health interactive map. <http://apps.who.int/ithmap/>; accessed June 19, 2014.

Wichmann, O. *et al.* Risk Factors and Clinical Features Associated with Severe Dengue Infection in Adults and Children During the 2001 Epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 9, 1022–1029, 2004.

Wolfe N.D., Kilbourn A.M., Karesh W.B., Rahman H.A., Bosi E.J., Cropp B.E., Andau M., Spielman A., Gubler D.J., Sylvatic Transmission of Arboviruses Among Bornean Orangutans, *Am. J. Trop. Hyg. Med.* 64, 310-316, 2001.

World Health Organization (WHO). Dengue vaccine: WHO position paper - *Wkly Epidemiol Rec.* 2016;91:349–64, July 2016.

Yon, C., Teramoto, T., Mueller, N., Phelan, J., Ganesh, V.K., Murthy, K.H., Padmanabhan, R. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural

Protein 3 (NS3) By Interaction with NS5, the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 280, 27412–27419, 2005.

Yu, M., Zhang, W., Hotdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipaman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., Chen, J. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*, 319: 1834 – 1837, 2008.

Zhang, W, Placement of the Structural Proteins in Sindbis Virus. *J. Virol.* 76, 11645–11658, 2002.