

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

MESTRADO EM BIOCÊNCIAS

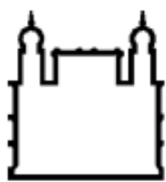
ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM DENGUE
EM FASE AGUDA NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

CURITIBA
2018

TESE MBB-ICC

T. B. ARRUDA

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Thaís Bonato de Arruda

ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM DENGUE
EM FASE AGUDA NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos
Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biociências

Orientador: Juliano Bordignon
Co-orientador: Guilherme Ferreira Silveira

Curitiba
2018

Bonato de Arruda, Thaís.

ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM DENGUE EM FASE AGUDA NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ / Thaís Bonato de Arruda. - Curitiba, 2018.

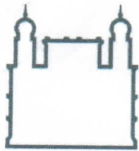
120 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Juliano Bordignon. Co-orientador: Guilherme Ferreira Silveira.

Bibliografia: f. 83-104

1. Dengue. 2. Epidemiologia. 3. Imunologia. 4. Filogenia. 5. Cambé. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Bióciências e Biotecnologia.

Aos 30 dias do mês de maio de dois mil e dezoito, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Letusa Albrecht, Dra. Lorena Bavia e Dr. Sérgio de Almeida, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Thais Bonato de Arruda**, intitulada: “**Análise do perfil clínico e imunológico de pacientes com dengue em fase aguda**”, sob a orientação do Dr. Juliano Bordignon e co orientação do Dr. Guilherme Ferreira Silveira, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Letusa Albrecht**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

- Aprovação da dissertação por unanimidade
- Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).
- Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Dra. Letusa Albrecht - ICC / Fiocruz-Pr

Curitiba, 30 de maio de 2018

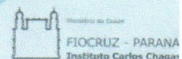
Dra. Lorena Bavia - UFPR

Dr. Sérgio de Almeida - UFPR

Candidato(a): Thais Bonato de Arruda

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



Ao meu pai, Reinaldo de Arruda Jr. (*In memorium*), à
minha mãe, Cláudia Bonato de Arruda, e irmão, Gabriel
Bonato de Arruda.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha família, em especial a minha mãe, Cláudia, e irmão, Gabriel, que sempre apoiaram todas as minhas decisões de forma incondicional. A presença de vocês em minha vida é essencial para que eu me mantenha forte durante todas as empreitadas, e agradeço muito pelo amor e carinho de vocês.

À minha tia Vânia, que foi o meu exemplo e estímulo para iniciar a carreira científica.

Aos meus orientadores, Dr. Juliano Bordignon e Dr. Guilherme Ferreira Silveira, pela constante dedicação e direcionamento. Agradeço por tudo o que aprendi com vocês, e tenho certeza que este legado estará sempre presente em minha vida.

Aos colegas e professores Dr. Mateus Aoki, Dra. Lorena Bavia, Me. Francine Nesello e Dr. Rafael Carvalho Barreto pela ajuda com as análises laboratoriais, coleta e avaliações de dados epidemiológicos.

À Dra. Ana Luiza Pamplona Mosimann, pelo auxílio com as análises filogenéticas e escrita.

Aos membros da banca de acompanhamento, Dra. Camila Zanluca e Dra. Alessandra Melo de Aguiar, cujas avaliações, críticas e elogios foram essenciais para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial, Nathalia, Humberto, Diogo, Sibelle, Allan, Gisiane, Andrea Koishi, Ana Paula Ribeiro e Ana Paula Andreolla pelo ambiente acolhedor e auxílio nos experimentos.

À minha amiga, Stefanny, pelas conversas e discussões que me fizeram refletir muito sobre a minha vida pessoal e profissional.

Ao meu amigo, Agustin, que forneceu apoio emocional e científico para a finalização deste trabalho.

À prefeitura de Cambé, aos profissionais das Unidades de Pronto Atendimento e pacientes pelo fornecimento das amostras de soro.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Sérgio Monteiro de Almeida, Dra. Lorena Bávia e Dra. Letusa Albrecht, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao Instituto Carlos Chagas ICC/Fiocruz-PR que ofereceu o curso de pós-graduação e a estrutura necessária para a realização deste projeto.

À Dra. Cláudia Nunes dos Santos, chefe do Laboratório de Virologia, pelo laboratório e materiais cedidos.

Finalmente, meus sinceros agradecimentos a todos os envolvidos na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

“The moment you doubt whether you can fly, you
cease for ever to be able to do it.”

J.M. Barrie



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ANÁLISE DO PERFIL CLÍNICO E IMUNOLÓGICO DE PACIENTES COM DENGUE EM FASE AGUDA NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Bonato de Arruda

A dengue é uma doença multifatorial causada pela infecção por um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV 1-4). Neste trabalho avaliou-se diferentes características (viremia, citocinas e sorotipo viral) da infecção por DENV em pacientes do município de Cambé, região Norte do Paraná. Para tanto, foram obtidas 888 amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de infecção, provenientes de unidades de pronto atendimento de Cambé, durante os anos de 2013 e 2014. As análises sorológicas (ELISA anti-IgM, anti-IgG e NS1) demonstraram que 264 representavam casos de infecção aguda (NS1⁺ e/ou IgM⁺). Observou-se uma correlação positiva entre condições climáticas (pluviosidade e temperatura) e a densidade populacional do mosquito vetor com a incidência da doença. A média de idade dos pacientes com dengue foi de 33 anos, e não houve prevalência de infecção de acordo com a cor ou gênero. Adicionalmente, os sintomas mais frequentes foram febre (87%), cefaléia (78%) e mialgia (70%), e observou-se uma baixa prevalência de sinais hemorrágicos (6%). O isolamento viral em células C6/36 confirmou a presença da partícula viral em 145 das 264 (55%) amostras. Além disso, houve uma alta correspondência entre as técnicas de ELISA NS1 e a detecção da partícula viral. Ademais, o sorotipo viral foi determinado em 138 das 145 amostras positivas para o isolamento viral pela técnica de RT-PCR *One Step*. Deste modo, observou-se a soroprevalência do sorotipo-1 do DENV (137 amostras) no período do estudo, com apenas uma amostra de DENV-4. Ainda, 7 amostras não foram amplificadas pelo protocolo de análise e estão sendo testadas com outros *primers* e para outros vírus. Adicionalmente, a viremia foi determinada pela técnica de titulação em células C6/36 nas amostras com sorotipo viral definido (138). Nestes pacientes, a viremia média foi de $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL, sendo esta mais alta nos primeiros três dias da doença. Adicionalmente, determinou-se os níveis de citocinas inflamatórias no soro destes pacientes e pode-se observar um perfil misto Th1/Th2, marcado pela produção aumentada de IFN- γ , IL-6 e IL-4 nos pacientes com dengue comparado aos saudáveis. Finalmente, com o sequenciamento da região codificadora da proteína E seguida de análise filogenética demonstrou a co-circulação de duas linhagens (1b e 2) de DENV-1 de genótipo V em Cambé no período de estudo. Assim, conclui-se que diversos fatores podem influenciar na incidência e na patologia da dengue. Deste modo, a análise combinada de fatores epidemiológicos, bem como a caracterização de cepas virais e da resposta imune dos pacientes, é capaz de contribuir para o esclarecimento dos diferentes aspectos envolvidos na imunopatologia da dengue, e no surgimento de novos surtos da doença.

Palavras-Chave: Dengue; Viremia; Inflamação; Epidemiologia; Filogenia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PROFILE ANALYSIS OF ACUTE DENGUE PATIENTS FROM NORTH OF PARANA

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Bonato de Arruda

Dengue is a multifactorial pathology caused by the infection with one of the four dengue virus serotypes (DENV 1-4). The present study aimed to evaluate distinct characteristics of DENV infection (viremia, cytokines and viral serotype) in Cambé city, northern Paraná. Thus, in 2013 and 2014, 888 sera samples from patients with clinical suspicion of dengue infection were collected from emergency care units in Cambé. The serological results (ELISA anti-IgM, anti-IgG and NS1) classified 264 samples as acute phase dengue (NS1⁺ and/or IgM⁺). It was observed a positive correlation between climate conditions (pluviosity and temperature), population density of the vector, and dengue cases. Besides, the median age of dengue patients was 33 years old, and there was no differential incidence by skin color or gender. In addition, the most frequent symptoms were fever (87%), headache (78%) and myalgia (70%), and there was a low prevalence of bleeding signs (6%). Next, using the viral isolation technique in C6/36 cell line, the viral particle presence was confirmed in 145 of the 264 samples (55%). From these evaluations, we observed a strong correspondence between the detection of NS1 and the presence of the viral particle. Furthermore, the viral serotype was determined on 138 from the 145 samples positive for the viral isolation using a RT-PCR One Step technique. This way, in the period of the study, it was observed a seroprevalence of DENV-1 (137 samples), with only one DENV-4. Also, 7 samples were not amplified by this assay, and they are going to be re-tested using other primers to dengue and for different virus. In addition, those serotyped samples had their viremia determined by titration in C6/36 cell line. These patients had a median viremia of 1.0×10^5 FFU_{C6/36}/mL. which was higher in the first 3 days of the disease. Additionally, we measured the inflammatory cytokines levels from the dengue patients' serum. From this evaluation, it was observed a mixed Th1/Th2 profile, which was defined by a higher production of both IFN- γ , IL-6 and IL-4 cytokines in dengue patients when compared with the healthy donors. Finally, with the sequencing of the coding region of the protein E followed by phylogenetic analysis, it was observed the co-circulation of two strains (1b and 2) of DENV-1 genotype V in Cambé, during the study period. In conclusion, the combined analysis of epidemiological factors, as well as the characterization of viral strains and the immune response of the patients contribute to elucidate the different aspects involved in dengue immunopathogenesis and in the arise of new outbreaks of the disease.

Key-words: Dengue, Viremia, Inflammation, Epidemiology, Phylogenetics.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Aumento dependente de anticorpo, do inglês, <i>antibody dependent-enhancement</i>
Arbovirose	Doença transmitida por artrópodes, do inglês, <i>arthropod borne disease</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno, do inglês, <i>antigen presenting cells</i>
C	Capsídeo viral
CD	Grupamento de diferenciação, do inglês, <i>cluster of differentiation</i>
DC-SIGN	Molécula integrina não captadora da molécula de adesão intercelular 3 específica das células dendríticas, do inglês, <i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>
DCSA	Dengue com sinais de alarme
DENV	Dengue vírus
DFND	Doença febril não dengue
DG	Dengue grave
DSSA	Dengue sem sinais de alarme
E	Envelope viral
ED	Domínio de proteína E, do inglês, <i>E domain</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FcR	Receptor de porção Fc, do inglês, <i>Fc receptor</i>
Fig	Figura
Hsp70	Proteína de choque térmico 70, do inglês, <i>heat shock protein 70</i>
Hsp90	Proteína de choque térmico 90, do inglês, <i>heat shock protein 90</i>
IFI	Imunofluorescência indireta, do inglês, <i>indirect immunofluorescence</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ISG	Genes estimulados por interferon, do inglês, <i>interferon stimulated genes</i>
JAK	Janus quinases, do inglês, <i>Janus kinase</i>
Kb	Quilobase, do inglês, <i>kilobase</i>
LRV	Laboratório de Referência em Virologia
L-15	Leibovitz's-15
M	Proteína de membrana
MBL	Lectina ligadora de manose, do inglês, <i>mannose-binding lectin</i>
MCP	Proteína quimioatrativa de monócitos, do inglês, <i>monocyte chemoattractant protein</i>
MDA-5	Gene 5 associado com diferenciação de melanoma, do inglês, <i>melanoma differentiation associated gene-5</i>
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos, do inglês, <i>macrophage inflammatory protein</i>
mL	Mililitros
MOI	Multiplicidade de infecção, do inglês, <i>multiplicity of infection</i>
MS	Ministério da Saúde
NK	Célula exterminadora natural, do inglês, <i>natural killer</i>
NOS	Óxido Nítrico Sintase, do inglês <i>nitric oxide synthase</i>
NS	Não estrutural, do inglês, <i>non-structural</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP's	Padrões moleculares associados à patógenos, do inglês, <i>pathogens-associated molecular pattern</i> .
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pg	Picograma
prM	Proteína pré-membrana, do inglês, <i>pre membrane protein</i> ,
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês, <i>pattern recognition receptors</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso

RIG-1	Gene 1 ácido retinoico-induzido, do inglês <i>retinoic acid-inducible gene-1</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa, do inglês, <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SCD	Síndrome do choque de dengue
SESA	Secretaria de Estado da Saúde
sNS1	NS1 secretada, do inglês, <i>secreted NS1</i>
STAT	Transdutores de sinais e ativadores de transcrição, do inglês, <i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Solução tampão tris, borato, EDTA, do inglês, <i>Tris/Borate/EDTA buffer</i>
TCR	Receptor de células T, do inglês, <i>T cell receptor</i>
Th	Célula T auxiliar, do inglês, <i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês, <i>tumor necrosis factor</i>
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i> , do inglês, <i>Toll-like receptors</i>
TYK	Tirosina quinase, do inglês, <i>tyrosine kinase</i>
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
UTR	Região não codante, do inglês, <i>untranslated region</i>

LISTA DE SOLUÇÕES

Meio L-15 completo	Meio leibovitz's-15 suplementado com 25 µg/mL de gentamicina, 0,26% de triptose e 5% de soro fetal bovino inativado;
Meio L-15 incompleto	Meio leibovitz's-15 suplementado com 25 µg/mL de gentamicina e 0,26% de triptose;
<i>Overlay</i> (titulação)	1:1 de Carboximetil celulose (3%) e meio leibovitz's-15 suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 0,52% de triptose e 10% de soro fetal bovino inativado;
PBS 10x	Cloreto de sódio, 1,37 M; cloreto de potássio, 27 M; fosfato dissódico, 100 M; fosfato monopotássico, 18 M, pH 7,2 – 7,6
PSB 1x	1:10 de PBS 10x e água destilada;
TBE	Em 1L: 108g Tris Base; 55g de Ácido Bórico e 7,5g EDTA;
<i>Sample Diluent</i> (ELISA)	Solução TRIS com preservativos (0,1% Proclin™);
Solução Reveladora	10mL de tampão de fosfatase alcalina (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl e 5 mM MgCl ² a pH 9.5) mais 33 µL de BCIP e 66 µL de NBT;
<i>Stop Solution</i> (ELISA)	Ácido sulfúrico 1M
<i>Wash Buffer</i> (ELISA)	PBS (pH 7.2-7.6) com Tween 20 e preservativos (0.1% Proclin™)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 A dengue	16
1.2 Histórico e epidemiologia da dengue	17
1.3 A partícula viral, ciclo de infecção e replicação	20
1.4 Patogênese de dengue	24
1.5 Resposta imune antiviral	26
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Obtenção das amostras dos pacientes e dados clínicos	36
3.2 Dados Epidemiológicos	36
3.3 Diagnóstico sorológico	37
3.4 Isolamento viral	37
3.5 Imunofluorescência Indireta	38
3.6 Titulação viral	39
3.7 Determinação do sorotipo viral	40
3.8 Sequenciamento do gene do envelope viral (E)	42
3.9 Determinação das citocinas	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Epidemiologia	46
4.2 Análises laboratoriais	56
4.3 Sequenciamento e filogenia	74
5. CONCLUSÕES	81
6. PERSPECTIVAS	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXO A	106
ANEXO B	108
ANEXO C	109
ANEXO D	111
ANEXO E	112
ANEXO F	113

ANEXO G	114
ANEXO H	117
ANEXO I	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 A dengue

A dengue é uma doença febril aguda provocada pelo vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*. Existem quatro sorotipos distintos do vírus (DENV-1, -2, -3 e -4), sendo que todos são capazes de provocar a doença no homem (HALSTEAD, 1988). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 70% dos casos de dengue são assintomáticos, sendo que grande parte dos pacientes que apresentam sintomas desenvolvem uma doença febril autolimitante, e uma pequena parcela desenvolvem as formas mais graves da doença (OMS, 2009). Apesar de ser a arbovirose (virose transmitida por artrópodes) mais prevalente do mundo e provocar a morte de cerca de 20.000 pacientes ao ano, ainda não existem tratamentos específicos ou marcadores de gravidade bem definidos para a doença (OMS, 2009; GUBLER, 2011, RAJAPAKSE, et al., 2012). Atualmente, de acordo com as recomendações da OMS, 2009, a suspeita de dengue se dá a partir da avaliação clínica e epidemiológica, e a confirmação da doença é realizada de forma laboratorial. Para tanto, é recomendado o uso de técnicas que confirmem a presença da partícula viral, ou de produtos de replicação viral, bem como detectem a produção de anticorpos específicos anti-DENV. Além disso, a OMS recomenda a utilização dos dados clínicos em conjunto com a determinação do hematócrito para determinar o prognóstico de evolução da doença, e o seu tratamento consiste basicamente em reposição fluídica, que é capaz de reduzir a taxa de mortalidade de 20% para <1% (OMS, 2009).

Ademais, alguns fatores que podem estar relacionados com a gravidade da doença são a cepa viral, o estado imunitário e genético do paciente, a existência de outras doenças e a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (HALSTEAD et al., 1970; ARIAS, et al., 2014; MALAVIGE & OGG, 2013; COFFEY et al., 2009; PANG et al., 2012; LEITMEYER et al., 1999). No entanto, a correlação e influência de cada um desses fatores ainda não é bem esclarecida. Sobre a resposta imunológica frente à infecção, sabe-se que a produção de citocinas pode ter papel importante na patogênese da doença, porém, os padrões de resposta não são consistentes, o que ainda levanta dúvidas para a definição de possíveis marcadores de gravidade (RAGHUPATHY, 1998; PANDEY, 2015; MANGIONE, et al., 2014). Desta forma, a caracterização da resposta imunológica de pacientes com dengue tem se mostrado uma

ferramenta importante para a compreensão da patogênese e para auxiliar no manejo e prognóstico dos pacientes.

1.2 Histórico e epidemiologia da dengue

Historicamente, as doenças febris agudas vêm sendo relatadas há séculos, sendo que o primeiro registro de uma doença compatível com a dengue está na enciclopédia médica chinesa de 992 D.C., descrita como uma “intoxicação de água” e associada a insetos voadores (NOBUCHI, 1979 *apud* GUBLER, 2006). Entre os anos de 1779 a 1780 na Ásia, África e América do Norte ocorreu o primeiro registro de epidemia de uma doença clinicamente similar à dengue, descrita como “*Break-bone fever*” ou “febre quebra-ossos” (GUBLER & CLARK, 1995). Segundo Gubler e Clark, 1995, a ocorrência quase que simultânea da doença nestes três continentes demonstra que o vírus e seu vetor apresentam uma ampla distribuição global há mais de 200 anos.

Em relação à América do Sul, em 1818, uma doença semelhante à dengue gerou um surto que atingiu cerca de 50.000 pessoas no Peru (MUNOZ, 1828 *apud* DICK, et al., 2012). Além disso, outros surtos parecidos, mas de menor impacto, ocorreram neste mesmo período em diversos países da América, como Cuba, Jamaica, Colômbia, Venezuela, Estados Unidos e Brasil (EHRENKRANZ, et al., 1971; SCHNEIDER, 2001). Durante os anos de 1950 a 1970, a dengue foi erradicada nas Américas devido a campanhas de controle da febre amarela, que combateu o seu vetor, *Aedes aegypti* (SHEPARD et al., 2011). No entanto, com o término das campanhas em 1970, a reintrodução do mosquito vetor e sua expansão geográfica resultou em novos surtos da doença em diferentes países da América Central e do Sul (GUZMÁN & KOURI, 2003; SEPHARD et al., 2011).

Atualmente, a dengue se encontra ao longo dos trópicos com a sua incidência dependendo de condições como: chuvas, temperatura, umidade relativa, grau de urbanização e qualidade do controle vetorial, e estima-se que mais de 390 milhões de infecções por dengue a cada ano, das quais 96 milhões manifestam sintomatologia (MURRAY, et al., 2013; BHATT et al., 2013). A distribuição de casos da doença pelo mundo, entre os anos 2010 a 2016 estão representados na Fig. 1.1.

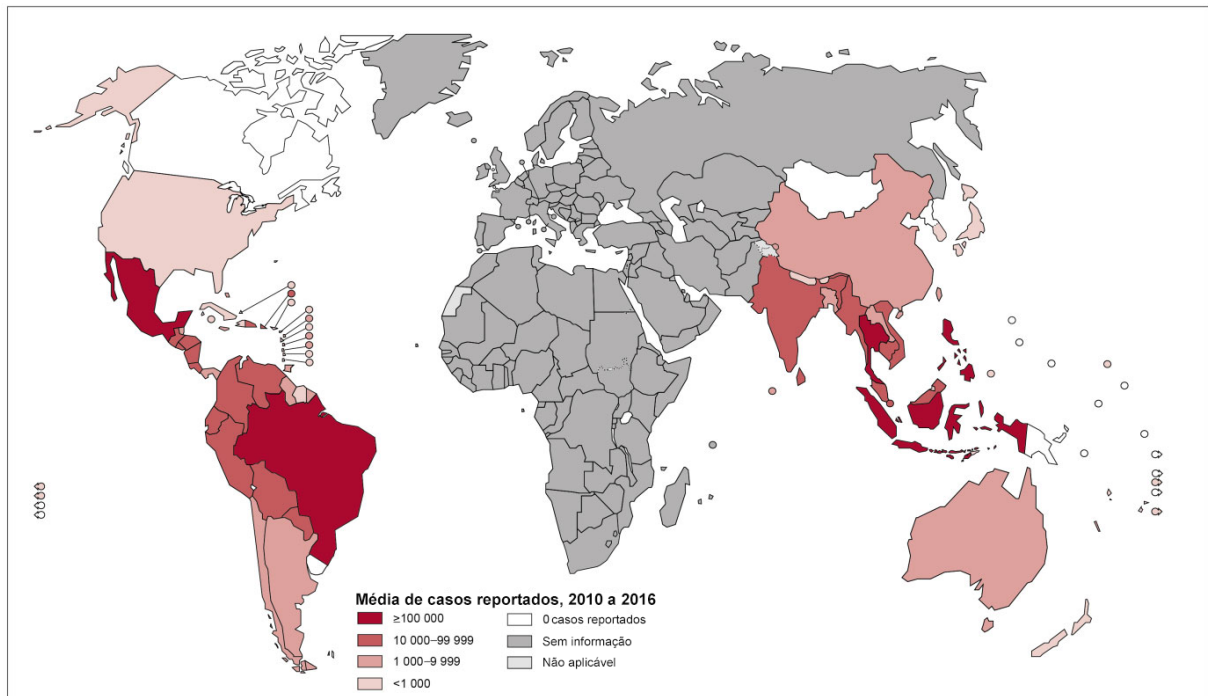


Fig. 1.1 Distribuição de dengue no mundo de 2010 a 2016. A distribuição dos casos de dengue reportados no mundo durante os anos de 2010 a 2016 está em gradiente vermelho, partindo dos países com ≥ 100.000 casos reportados neste período (vermelho escuro), como o Brasil, até países com nenhum caso de dengue reportado, como o Canadá (branco).

Fonte: Adaptado de OMS, 2016

No Brasil, a primeira evidência de epidemia de dengue ocorreu em Boa Vista, Roraima, em 1982, quando foram isolados de pacientes infectados os sorotipos 1 e 4 (OSANAI, 1984). Após esta epidemia, restrita à região Norte do País, uma nova entrada do vírus DENV-1 foi reportada em 1986, em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, com mais de 30 mil pessoas infectadas (SCHATZMAYR et al., 1986). No ano seguinte, o DENV-1 atingiu o Ceará, Alagoas e Pernambuco, com pequenos surtos (TEIXEIRA et al., 1999). Durante este período, a maioria dos casos relatados foi de uma patologia com sintomatologia branda, cenário que mudou com a introdução do DENV-2 em 1990, quando casos graves foram relatados com maior frequência (NOGUEIRA et al., 1993). Em 2000, o sorotipo 3 chegou ao país, marcando um período de circulação simultânea de três sorotipos virais (DENV-1, -2 e -3) (NOGUEIRA, 2001). Finalmente, no ano de 2010, houve um surto da doença nos estados de Roraima e Amazonas onde foi isolado o DENV-4, caracterizando a co-circulação dos quatro sorotipos de dengue, situação que permanece até o presente momento (TEMPORÃO, et al., 2011; ANDRADE et al., 2016). A progressão do número de casos de dengue e dengue com manifestação hemorrágica durante os anos de 1990 a 2016 está apresentado na Fig. 1.2.

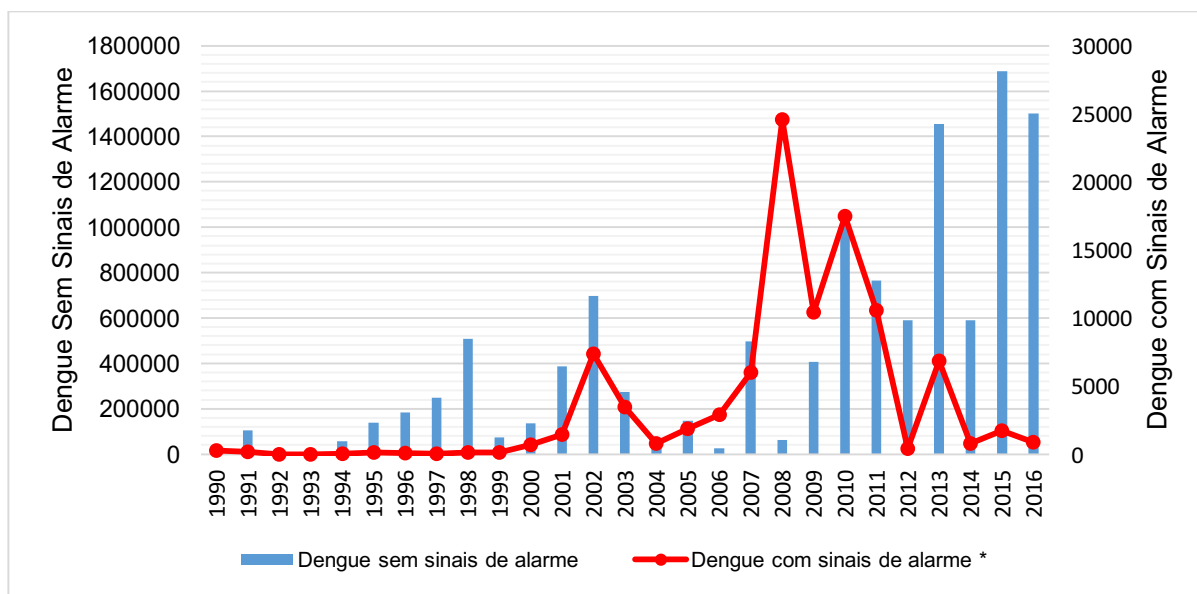


Fig. 1.2 Evolução do número de casos notificados e de dengue com e sem sinais e sintomas hemorrágicos no Brasil entre 1990 e 2016. A figura representa a incidência de casos de dengue sem sinais de alarme (eixo à esquerda, representados por barras azuis) e com sinais de alarme (eixo à direita, representados pela linha vermelha) desde o ano de 1990, até o ano de 2016.

*Foram considerados casos de dengue com sinais de alarme aqueles classificados como “dengue hemorrágica” nos boletins epidemiológicos emitidos pelo MS. Os anos de 1992, 1993, 2014, 2015 e 2016 não apresentavam dados para dengue hemorrágica.

Fonte: Adaptado de MS, 2017.

No Paraná, segundo dados do Ministério da Saúde (MS), os primeiros registros de casos autóctones de dengue aconteceram no ano de 1993, sendo que em 1995 iniciou-se o registro de três grandes ondas epidêmicas que ocorreram em 1995-1996, 2002-2003 e 2006-2007 (MS, 2017; DUQUE et al., 2010). Até o ano de 2003, os casos de dengue notificados na região sul representavam cerca 2,4% do total registrado no Brasil. Apesar do baixo índice, do ano de 1999 a 2003 a taxa média anual de casos da doença no Estado do Paraná aumentou 1.605% e esses números seguiram aumentando (PAULA, 2005). Em 2007, o Brasil registrou de janeiro a julho 438.949 casos de dengue, sendo 45.127 provenientes da região sul (10,3% do total registrado), e 43.691 destes do Estado do Paraná (MENDONÇA et al., 2009). No ano de 2016, Londrina, município da região norte paranaense, apresentou um dos maiores números de casos de dengue por número de habitantes do Brasil, tendo registrado 101,2 casos/100 mil habitantes (MS, 2016a). Esta região, juntamente com o nordeste e centro-oeste do Estado, tem se mostrado com uma grande incidência de dengue nos últimos anos, como visto na Fig. 1.3 (SESA Paraná, 2014).

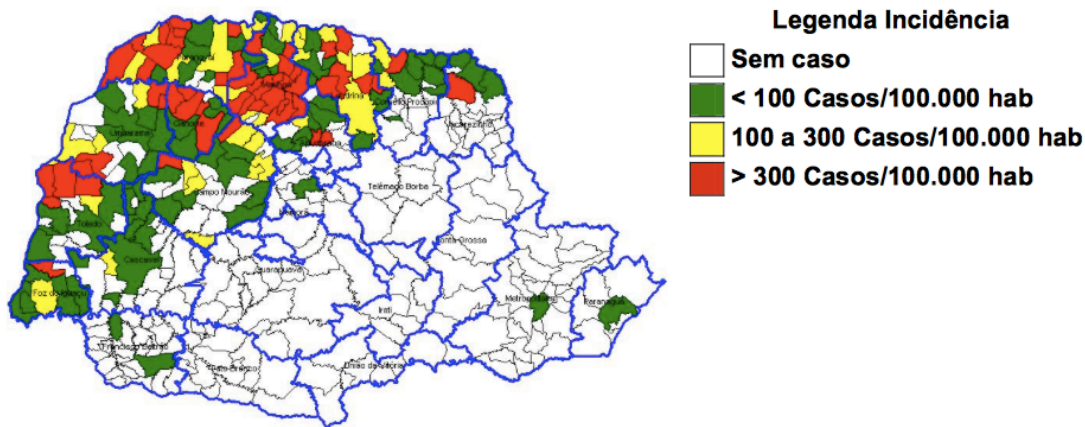


Fig. 1.3 Classificação dos municípios do estado do Paraná segundo incidência de dengue por 100.000 habitantes, nas semanas epidemiológicas 31/2013 a 30/2014. Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, as regiões norte e nordeste, bem como centro-oeste do Estado apresentam os maiores números de incidência de dengue a cada 100.000 habitantes. A região de Londrina e Cambé apresentam médio a alto risco (100 a 300 casos/100.000 habitantes) de incidência da doença.

Fonte: SESA Paraná, 2014.

1.3 A partícula viral, ciclo de infecção e replicação

A partícula viral do dengue é esférica, com cerca de 50 nm de diâmetro, envolta por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira, e contém as proteínas M e E inseridas em sua superfície (CHAMBERS, et al., 1990). Seu genoma (representado na Fig. 1.4) é constituído por um RNA de fita simples e tamanho de aproximadamente 11Kb e polaridade positiva (5' – 3'), podendo ter seu material genético diretamente traduzido em proteínas, sem a necessidade de etapas adicionais de transcrição (CHAMBERS, et al., 1990).

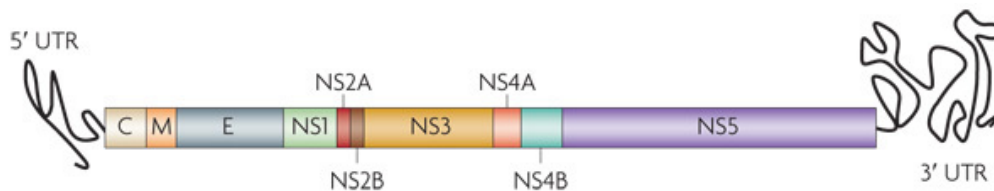


Fig. 1.4 Organização do genoma do vírus da dengue. Estrutura do genoma do vírus tendo nas duas extremidades regiões não codificadoras (5' e 3' UTR, do inglês, *untranslated region*), sendo que a 5' apresenta uma estrutura do tipo *cap*. O genoma apresenta apenas uma fase de leitura, gerando uma poliproteína que em seguida é clivada em proteínas C, prM/M e E (estruturais) e NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (não-estruturais).

Fonte: GUZMÁN, et al., 2010.

A transmissão do vírus da dengue é dependente de mosquito vetores como o *Aedes aegypti* e em menor extensão, o *Aedes albopictus*. Sob condições naturais, as fêmeas hematófagas de mosquitos do gênero *Aedes* entram em contato com o DENV alimentando-se do sangue de pacientes virêmicos (RODHAIN & ROSEN, 1997). O vírus então se liga a receptores na superfície celular do intestino médio do mosquito, infecta essas células, replica e chega até a cavidade circulatória do mosquito, sendo disseminado até tecidos secundários, como as glândulas salivares. Se a replicação viral neste órgão for eficiente, na próxima alimentação, o vírus pode ser transmitido a um novo hospedeiro através da saliva do mosquito (RODHAIN & ROSEN, 1997). Além disso, o DENV também pode ser transmitido de forma vertical para a nova prole de mosquitos (LE GOFF, et al., 2011).

Nos humanos, após a picada do mosquito vetor, o DENV infecta células residentes da pele, como as células de Langerhans, através de receptores celulares como o DC-SIGN (do inglês, *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*) (WU et al., 2000). Após este primeiro contato, a infecção segue para outras células-alvo, tais como monócitos, macrófagos, células endoteliais e células hepáticas (BALSITIS, et al., 2009). Glicoaminoglicanos negativamente carregados, como o heparan sulfato, que são abundantemente expressos em diversos tipos celulares, podem facilitar a entrada do vírus na célula, atuando como um receptor de baixa afinidade e atraindo as partículas virais para a superfície celular (CHEN, et al., 1997).

Após a ligação ao receptor celular, o DENV entra nas células hospedeiras através do processo de endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido do endossoma gera alterações estruturais que provocam a fusão da membrana do endossoma e do vírus, liberando o nucleocapsídeo viral no citoplasma. Uma vez que o RNA viral está disponível, este então passa a ser traduzido em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (MUKHOPADHYAY, KUHN & ROSSMANN, 2005). Como o RNA do DENV possui apenas uma fase aberta de leitura, traduz-se uma única poliproteína que é clivada de forma co- e pós-traducionalmente no RER. Essa clivagem é realizada por proteínas da célula hospedeiras e virais e gera um total de 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM), envelope (E); e 7 proteínas não-estruturais (do inglês, *non-structural*, NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MUKHOPADHYAY, KUHN & ROSSMANN, 2005; PERERA & KUHN, 2008). Após a tradução, ocorre a replicação do material genético com o auxílio das proteínas não-estruturais. Para tanto é gerada uma fita-molde de polaridade negativa (3'-5') para a síntese de múltiplas cópias do RNA viral no sentido positivo (5'-3') (MUKHOPADHYAY, KUHN & ROSSMANN, 2005). Então, o RNA viral é sintetizado no

citoplasma e complexado à proteína C, gerando o nucleocapsídeo. Este complexo se associa (através da membrana do complexo de Golgi) às proteínas prM/E, que estão no lúmen do retículo endoplasmático, gerando as partículas virais imaturas. Estas são transportadas via rede trans-Golgi onde furinas fazem a quebra do precursor de membrana prM resultando na maturação viral e liberação do vírion maduro para o exterior celular (MUKHOPADHYAY, KUHN & ROSSMANN, 2005; LINDENBACH & RICE, 2005). A Fig. 1.5 apresenta o ciclo de replicação viral na célula infectada.

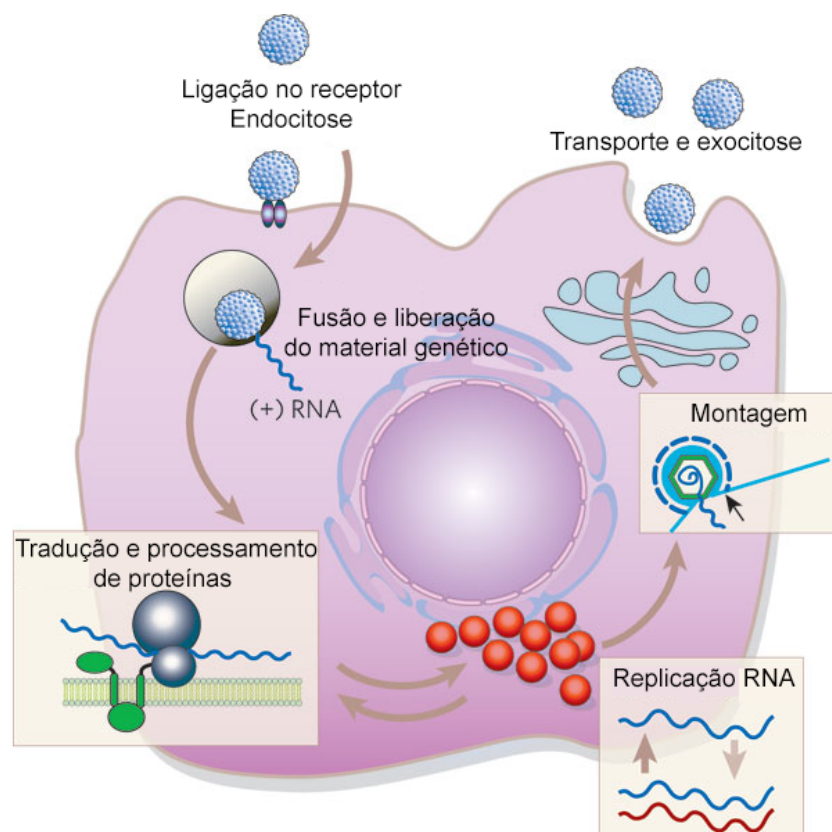


Fig. 1.5 Ciclo de replicação viral da dengue em célula infectada. O DENV liga-se ao receptor celular e é endocitado. No interior celular ocorre a fusão da membrana viral e do endossoma, e liberação do material genético para o citoplasma. Assim que liberado, ocorre a tradução e processamento da poliproteína viral no retículo endoplasmático rugoso. Quando a tradução é finalizada, é iniciada a etapa de replicação do RNA com auxílio das proteínas não-estruturais, montagem do vírion, seguido pelo transporte e liberação da partícula viral ao meio extracelular.

Fonte: Adaptado de LINDENBACH & RICE, 2005.

Em relação à tradução, a proteína C é a primeira a ser sintetizada e é crucial para a formação do nucleocapsídeo, que compreende a primeira etapa da montagem da partícula viral (HENCHAL & PUTNAK, 1990). Ela é rica em resíduos de arginina e lisina, o que promove uma característica básica à proteína e que facilita a sua interação com o RNA viral (PONG, et

al., 2011). Durante o processo de maturação da partícula viral, a proteína prM é clivada pela furina gerando o peptídeo pr e a proteína M, e esta auxilia na exposição do domínio de ligação ao receptor da proteína de envelope. O peptídeo pr permanece associado à proteína E cobrindo a porção hidrofóbica da proteína de envelope, protegendo-a da reorganização estrutural e da fusão prematura durante a secreção (YU et al., 2009; HENCHAL & PUTNAK, 1990). A proteína E possui três domínios estruturais, ED1, ED2, ED3 que formam um dímero na partícula viral madura. Durante a endocitose, devido ao pH ácido do endossomo tardio, ela sofre uma alteração estrutural irreversível dos homodímero em trímeros. Isto resulta na exposição do peptídeo de fusão na porção distal do ED2, formando um poro de fusão seguido pela liberação do material genético no citoplasma (MODIS, et al., 2004; PERERA & KUHN, 2008; SMIT, et al., 2011). Adicionalmente, a proteína viral E pode sofrer alterações devido a pressão seletiva proveniente da interação vírus-célula hospedeira e vírus-sistema imunológico (PARAMESWARAN et al., 2017).

Sobre as proteínas não-estruturais, a NS1 é a primeira a ser codificada e é altamente conservada (FALGOUT, et al., 1989). Ela está envolvida na formação do complexo de replicação viral e pode ser expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático localizando-se com o complexo de replicação viral; uma forma ancorada na membrana e uma terceira que é secretada (sNS1), sendo que a presença da sNS1 no soro de pacientes é uma ferramenta importante para o diagnóstico de dengue (MACKENZIE, et al., 1996; WINKLER et al., 1989; KASSIM, et al., 2011). Um dos papéis propostos para a NS1 é que induza a produção de anticorpos específicos não-neutralizantes e auxilie na evasão viral do sistema imune (EDELING et al., 2014) Adicionalmente, a NS1 solúvel é capaz de se ligar ao sulfato de heparina, um componente importante no glicocálix endotelial, e seu reconhecimento por anticorpos e formação de imunocomplexos podem ativar a lise dependente de complemento e conseqüentemente, contribuir para o dano ao endotélio e para o extravasamento plasmático (PUERTA-GUARDO et al., 2016; AVIRUTNAN et al., 2011).

Já a região codificadora NS2 consiste em duas proteínas, a NS2A e NS2B, sendo necessárias para o processamento proteolítico da NS1 e para a formação da protease viral, complexo NS2B-NS3, respectivamente. (CHAMBERS et al., 1990). A NS3 é uma proteína conservada em *Flavivirus*, estando presente no complexo de replicação viral e apresenta atividade protease e helicase viral (CHAMBERS et al., 1990). Adicionalmente Duangchinda e colaboradores (2010), demonstraram que a proteína NS3 tem uma importante representatividade imunológica, verificando a imunodominância desta proteína em uma análise global da resposta por células T. Além do papel de formação do complexo de replicação viral,

as proteínas não-estruturais podem interagir com proteínas da cascata JAK/STAT (do inglês, *Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription*) alterar a produção dos interferons (IFN) α/β em células humanas (MUNOZ-JORDÁN et al., 2003; JONES et al., 2005). As proteínas NS2A, NS4A e NS4B, por exemplo, podem inibir a fosforilação da STAT1 (ZOU et al., 2015; MUNOZ-JORDÁN et al., 2003), enquanto a NS5 pode mediar a degradação proteolítica da STAT2 (ASHOUR et al., 2009). Durante uma infecção por DENV, a protease NS2B/3 cliva a NS5 da NS4B, que então facilita a degradação da STAT2 (JONES et al., 2005). Sabendo que a produção de IFN-1 (α/β) é uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra a infecção viral, estas características antagonistas na sinalização do IFN-1 agem como um mecanismo de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, podendo contribuir para o agravamento da doença (MORRISON & GARCÍA-SASTRE, 2014). Além disso, A NS5 age como RNA polimerase dependente de RNA e sintetiza a fita de RNA complementar negativa necessária para a etapa de replicação viral na célula hospedeira. (IGLESIAS et al., 2011; ZHAO et al., 2015).

1.4 Patogênese da dengue

A dengue é uma doença sistêmica e dinâmica, cuja ampla sintomatologia clínica inclui manifestações brandas e graves que surgem após o período de incubação viral com duração de três a quinze dias (OMS, 2009). A sintomatologia clínica da dengue pode classificar a doença em dengue com sinais de alarme (DCSA) ou sem sinais de alarme (DSSA), sendo que ambas podem evoluir para dengue grave (DG) (OMS, 2009). Segundo a OMS (2009), a DSSA é caracterizada por febre e mais dois dos seguintes sinais ou sintomas relatados: náusea e vômito, erupção cutâneo, artralgia, mialgia, teste de laço positivo e leucopenia. Já os pacientes que apresentam sinais ou sintomas como: dor abdominal, vômito persistente, hepatomegalia, sangramento de mucosas, entre outros, podem ser classificados como DCSA. A não resolução da doença nestas fases iniciais pode favorecer a progressão do paciente para para a DS. Na dengue grave há um extravasamento plasmático e hemorragia grave, bem como, disfunção orgânica, o que pode provocar a Síndrome do Choque de Dengue (SCD). Nesta fase, caso o paciente não receba o tratamento adequado, sua taxa de mortalidade pode chegar a 20% (OMS, 2009). As diferentes classificações da dengue estão representadas na Fig. 1.6.

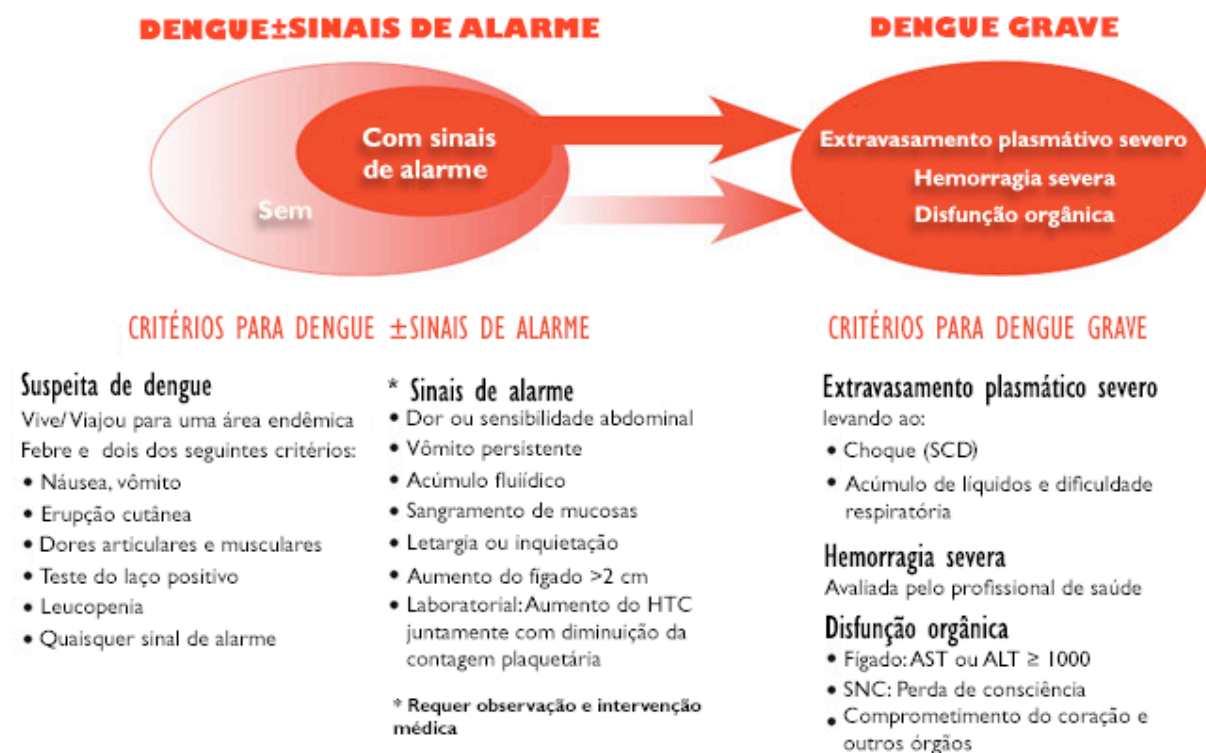


Fig. 1.6 Critérios para classificação dos diferentes espectros de manifestações clínicas da dengue. Para a classificação de dengue com sinais de alarme, o paciente precisa apresentar além dos sintomas clássicos de dengue (febre e pelo menos dois sintomas como náusea, vômito, leucopenia e dor muscular) outros sintomas como dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de líquido ou qualquer tipo de hemorragia. A progressão para dengue grave é caracterizada por um extravasamento plasmático intenso, juntamente com hemorragia e disfunção de órgãos.

Fonte: Adaptado de OMS, 2009

Quando o paciente é infectado, a progressão da doença pode ser dividida em três fases: a febril, a crítica e a de recuperação (OMS, 2009). A fase febril é caracterizada pelo surgimento de febre alta que dura de 2 a 7 dias, acompanhada de calafrios, cefaléia intensa, dor retro-orbitária, mialgia, náuseas e vômitos. A fase crítica inicia com a defervescência, podendo durar entre 3 a 7 dias e neste período, os pacientes podem exibir sinais hemorrágicos associados ao aumento da permeabilidade vascular, como leucocitose e diminuição do volume plasmático e consequentemente, aumento na densidade, viscosidade e nas quantidades relativas de eritrócitos e proteínas (OMS, 2009). Os pacientes nesta fase podem seguir dois desfechos, a recuperação ou a piora do quadro, resultando em dengue grave. A DG é caracterizada por um extravasamento plasmático intenso, hemorragia que pode vir acompanhada de choque hipovolêmico, sendo que este ocorre quando um volume crítico do plasma é perdido, o que pode gerar uma falha no funcionamento de diversos órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada (GUBLER, 1998; KULARATNE, 2015; OMS, 2009). A fase de recuperação dura entre 2 a 7 dias, quando ocorre a estabilização da concentração hematócrita

devido a recuperação da capilaridade e reabsorção de fluidos. O nível plaquetário também é restaurado e a produção de anticorpos aumenta. Esta fase pode ser acompanhada por coceira pelo corpo, além de diminuição da frequência cardíaca (OMS, 2009; KULARATNE, 2015). A cinética acima descrita com suas diferentes fases está representada na Fig. 1.7.

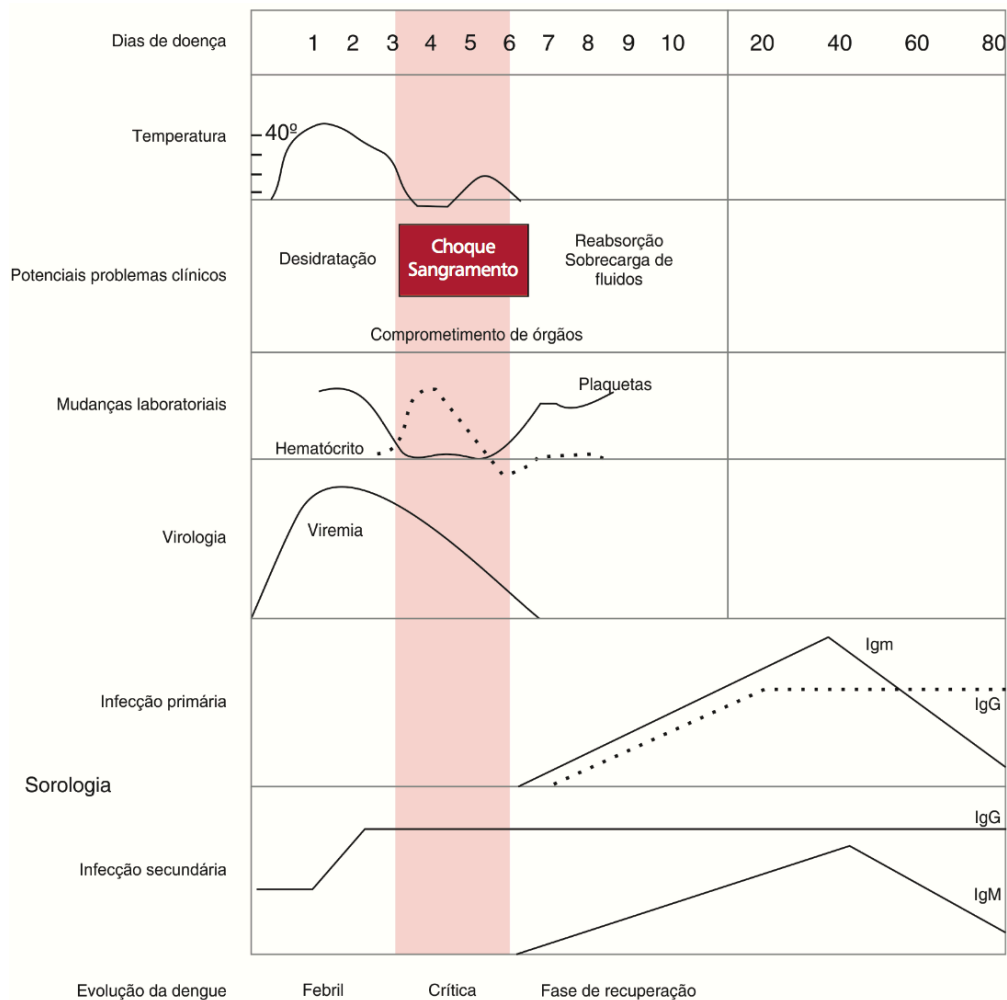


Fig. 1.7 Curso da infecção pelo vírus da dengue em humanos. Durante a progressão da doença do primeiro até o décimo dia após o início dos sintomas, vê-se a variação de parâmetros como temperatura, sinais clínicos e laboratoriais, além da sorologia e viremia. Em seguida, na fase crítica que tem duração média de três dias, os títulos virais são baixos ou indetectáveis, e o organismo passa a produzir anticorpos IgM e IgG. O paciente pode apresentar leucopenia e a concentração hematócrita aumenta. Pode haver hipotermia além de sinais hemorrágicos ou até disfunção de órgãos. Se o paciente chegar na fase de recuperação, sua produção de anticorpos IgM e IgG estará em altos níveis, enquanto os níveis plaquetários, a concentração hematócrita e a temperatura terão voltado às condições normais.

Fonte: Adaptado de MS, 2016b

1.5 Resposta imune antiviral

A apresentação clínica da infecção pelo vírus da dengue é multifatorial e sabe-se que mediadores imunológicos característicos da resposta imune inata e adaptativa apresentam um papel importante para a resolução ou agravamento da infecção pelo DENV (SCREATON, et al., 2015). A resposta imune inata é caracterizada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) virais (JENSEN & THOMSEN, 2012). Este reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de padrão (PPRs) presentes nas células infectadas como os receptores tipo *Toll* (TLR), particularmente os TLR-3, TLR-7 e TLR-8, ou ainda sensores intracelulares que reconhecem RNA de fita-dupla e modificações no RNA, como o RIG-1 (do inglês, *retinoic acid-inducible gene 1*) e o MDA-5 (do inglês, *melanoma differentiation-associated gene 5*) (LOO et al., 2008; NASIRUDEEN et al., 2011). Este reconhecimento culmina na produção e secreção dos interferons (IFN) α e β que, ao se ligarem ao receptor de IFN (IFNAR), recrutam e ativam as proteínas kinases JAK1 e TYK2 (do inglês, *janus kinase 1* e *tyrosine kinase 2*, respectivamente). Ambas as quinases se ligam e fosforilam os transdutores de sinal e ativadores da transcrição 1 e 2 (STAT1 e 2) o que estimula um estado antiviral da célula pela produção de proteínas antivirais através de ativação de genes-estimulados por interferon (ISGs) e de citocinas (SCREATON, et al., 2015; JENSEN & THOMSEN, 2012). A Fig. 1.8 representa o reconhecimento da infecção viral pelo sistema imune inato. Além disso, o IFN-II (γ) derivado de células NK (do inglês, *natural killer*) e células T ativadas podem modular a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas antivirais (KURANE et al., 1986; OKAMURA et al., 1998). A produção de IFN- γ é dependente da interação com o antígeno, ao contrário do IFN-I (α e β) que são produzidos por células infectadas, incluindo monócitos, macrófagos, e células endoteliais (MULLBACHER et al., 2002; ZUST et al., 2014).

Outro componente da resposta imune inata é o sistema complemento. Ele apresenta três vias convergentes de ativação; a via clássica e dependente de anticorpo, de lectina e alternativa. Durante a infecção por dengue, o complemento pode ser ativado por complexos de vírus-anticorpo ou pelo reconhecimento de padrões moleculares presentes no envelope viral (THIELENS, et al., 2002; AVIRUTNAN, 1998). Sua ação é capaz de provocar um efeito protetor contra infecções virais através de mecanismos como a inativação direta do vírion por lectina ligadora de manose (MBL), pelo aumento da resposta humoral, e pela regulação da resposta de células T (STOERMER & MORRISON, 2011). Células T e apresentadoras de antígeno expressam receptores de proteínas do complemento que ativam a expressão de genes

para produção de citocinas e quimiocinas e aumentam a atividade inflamatória para o combate ao vírus (NORIS & REMUZZI, 2013).

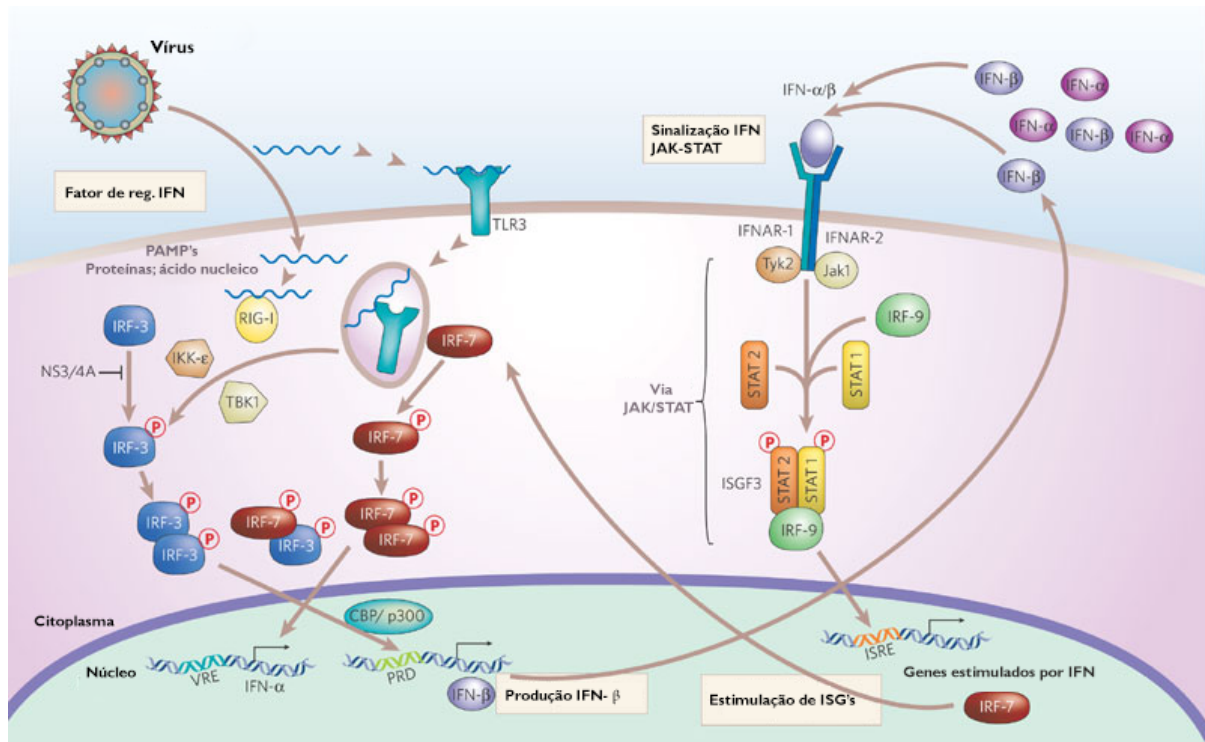


Fig. 1.8. Reconhecimento da infecção viral e ativação de fatores da resposta imune inata através de PAMP's. O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos pode se dar tanto com a endocitose do vírus, ou pelo reconhecimento na superfície celular a partir de TLR, sendo que ambas culminam na produção de IFN- α e - β . O IFN recém-produzido pode ligar-se ao receptor específico da própria célula que o produziu, ou em células vizinhas. Este receptor é composto por duas subunidades, IFNAR1 e IFNAR2, as quais são associadas com as kinases JAK1 e TYK2. A ativação das kinases resulta na fosforilação das STAT1 e STAT2, homodímeros que são translocados para o núcleo e ligam-se a elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE's) no DNA, o que inicia a transcrição de genes ISG's e ativação do estado antiviral. O DENV é capaz de bloquear esta ativação através da atividade antagonista das proteínas NS4A e B, e NS2A contra a STAT-1, e atividade de degradação proteolítica da STAT-2 pela NS5.

Fonte: Adaptado de MORRISON et al., 2012.

Após a etapa inicial de reconhecimento viral pela resposta imune inata, os antígenos virais são processados e apresentados para componentes da resposta imune adaptativa. Esta apresentação é realizada pelas células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen-presenting cells*, APC's), e inicia com o reconhecimento e fagocitose do vírus, seguido pelo processamento da partícula viral e apresentação de antígeno para as células linfocitárias imaturas via MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) (WARRINGTON, et al., 2011). Em seguida, ocorre o reconhecimento do peptídeo apresentado e ativação dos linfócitos,

que são então selecionados, maturados e sofrem a expansão clonal. (WARRINGTON et al., 2011). A apresentação de antígeno estimula a diferenciação de células T nas classes de células T CD4⁺ e T CD8⁺. As células T CD8⁺ são conhecidas como linfócitos T citotóxicos e apresentam função efetora induzindo a morte celular das células-alvo com a liberação de granzimas e perforinas. Estas células reconhecem a apresentação de peptídeos ligados ao MHC de classe I (WARRINGTON, et al., 2011). Já os linfócitos T CD4⁺ auxiliares (Th), exercem funções no estabelecimento, manutenção e maximização da resposta imunológica, sendo capazes de reconhecer a apresentação de peptídeos ligados ao MHC de classe II (WARRINGTON, et al., 2011). Uma vez ativados, produzem citocinas que recrutam e ativam diferentes tipos celulares. Os linfócitos Th podem apresentar diferentes resposta, caracterizadas pela produção de citocinas específicas de perfil Th1, Th2, Th17 e também T regulatório (Treg), como representado na Fig. 1.9 (BROERE et al., 2011).

Na dengue, de uma forma geral, estudos mostram uma tendência de citocinas com perfil Th1 apresentarem uma função mais protetora, e a troca para o perfil Th2) pode provocar um agravamento da doença (CHATUVERDI et al., 1999; CHATURVEDI et al., 2000; ABHISHEK et al., 2017.). Ademais, as citocinas produzidas por células de perfil Th17 estão relacionadas à patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias, e, apesar de o seu papel na dengue não ser muito bem definido, evidências mostram que as citocinas estimuladas por este tipo celular, como a IL-17, podem estar elevadas em casos de dengue grave (FURUTA et al., 2012; JAIN et al., 2013).

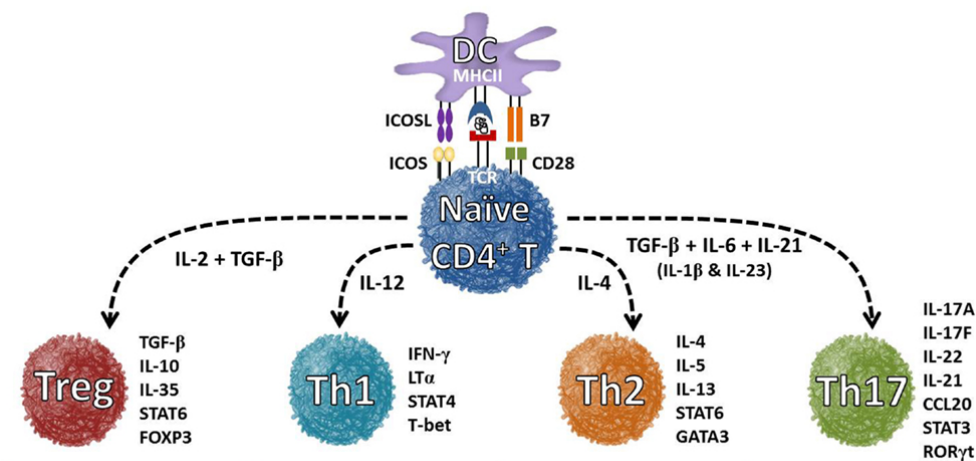


Fig. 1.9 Diferenciação de células T CD4⁺. As células T CD4⁺ imaturas dependem da apresentação do antígeno por células APC's, aqui representado por uma célula dendrítica, e das citocinas que elas produzem, para o direcionamento do seu perfil de maturação. Quando na presença de IL-6, -21 e TGF-β, células T CD4⁺ imaturas diferenciam para um fenótipo Th17. Citocinas IL-12, IL-4, TGF-β e IL-12 promovem a diferenciação aos perfis Th1, Th2 e Treg, respectivamente.

Fonte: BAILEY et al., 2014.

A resposta imunológica do hospedeiro é essencial para a resolução da infecção; no entanto, quando ineficiente, ela pode gerar o agravamento do quadro da doença, como através do fenômeno *antibody-dependent enhancement* (ADE). O ADE foi primeiramente descrito para a dengue por Halstead e colaboradores (1970), quando observaram que durante um surto de dengue na Tailândia nos anos de 1962 e 1964, 85% das crianças com sinais hemorrágicos apresentavam infecção prévia por dengue. Segundo esta teoria, durante uma infecção primária pelo DENV, anticorpos são gerados para aquele sorotipo em particular o que proporciona uma proteção de longo prazo ao sorotipo homólogo. No entanto, em uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, estes anticorpos pré-existentes podem facilitar a infecção celular (HALSTEAD, et al., 1970; LITTAUA et al., 1990). Os anticorpos heterólogos produzidos pelas células de memória podem ligar-se ao vírus e formar imunocomplexos que são reconhecidos por células fagocíticas, através de receptores Fc-gama I e II, o que resulta na internalização viral, exacerbando a infecção. Como estes anticorpos não são neutralizantes, eles acabam por facilitar a entrada do DENV em células hospedeiras e aumentando a viremia e inflamação (LITTAUA et al., 1990; SINGLA et al., 2016; UBOL et al., 2010). Este fenômeno é evidenciado em dados *in vitro* e *in vivo* e acredita-se que as manifestações hemorrágicas vistas na dengue sejam devido ao aumento da replicação viral, a qual induz monócitos e macrófagos infectados a liberarem mediadores vasoativos que aumentam a permeabilidade vascular (KING et al., 2000; GONÇALVEZ, et al., 2007. SINGLA et al., 2016).

Além do papel dos anticorpos na patogenia da dengue, as células T também podem contribuir para o desenvolvimento de casos graves da doença (CHATUVERDI, 2009; KURANE et al., 1991). A infecção por DENV induz a modulação da resposta mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺, que reconhecem epítomos tanto de proteínas não-estruturais quanto estruturais (KURANE, et al., 1991). Na dengue, trabalhos como o de Mongkolsapaya e colaboradores (2003) mostram que durante uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo, células T de memória de uma infecção prévia podem se ligar de forma cruzada e com baixa avidéz ao antígeno do segundo sorotipo. A seleção de células T de memória com baixa afinidade pode competir com a ativação de linfócitos T *naive* que apresentam maior afinidade com os antígenos virais. Deste modo, a infecção viral não é controlada de forma eficiente, o que pode gerar uma ativação ainda maior de células T e uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (*cytokine storm*), como observado por Mongkolsapaya e colaboradores (2006) e Duangchinda e colaboradores (2010).

Tanto a ADE como a ativação de células T de baixa avidéz podem contribuir para o desenvolvimento da tempestade de citocinas (do inglês, *cytokine storm*). Sabe-se que citocinas podem ter um efeito sinérgico, como por exemplo TNF- α , IFN- γ e IL-1 têm uma capacidade maior de provocar a permeabilidade vascular quando atuando juntas (BURKE-GAFFNEY & KEENAN, 1993). Desta forma, uma produção desregulada destas substâncias pode causar a imunopatogênese vista na dengue (KURANE & ENNIS, 1986). Neste caso, as citocinas liberadas especialmente por células T, e após a defervescência na dengue sustentam a teoria de que estas podem estar envolvidas em casos de dengue grave contribuindo para a gênese do dano endotelial (GREEN et al., 1999a; GREEN, et al., 1999b; MONGKOLSAPAYA, et al., 2003).

Ademais, as quimiocinas também podem estar envolvidas no fenômeno *cytokine storm* e, conseqüentemente, no agravamento da doença. Elas são substâncias quimioatrativas que controlam a migração celular, e sua hiperresponsividade durante a infecção pode gerar uma resposta pró-inflamatória exacerbada (TISONCIK, et al., 2012). Na dengue, estudos mostram que quimiocinas como IL-8, MCP-1 e MIP-1 β podem estar elevadas nos casos graves da doença, indicando um possível papel no extravasamento plasmático e dano endotelial (PANDEY et al., 2015; BOZZA et al., 2008; RAGHUPATHY et al., 1998). Finalmente, sabendo que diversos estudos mostram uma correlação positiva entre a magnitude da resposta imunológica e a gravidade da dengue, foi realizada uma revisão bibliográfica que associam

mediadores inflamatórios com os quadros clínicos da dengue que foram abordados nesta dissertação (Quadro 1.1)

Quadro 1.1. Trabalhos que associam possíveis marcadores de gravidade da dengue.

Citocina	Estudo e população avaliada	Considerações
IFN- α	DE LA CRUZ HERNÁNDEZ et al. (2014) - idade não definida, 204 pacientes CHEN et al. (2005) - 30-76 anos, 99 pacientes	DSSA > DCSA Sem diferença entre as formas graves e brandas
IFN- γ	CHAKRAVATI & KUMARIA (2006) – idade não definida, 60 pacientes BOZZA et al. (2008) - 23-53 anos, 59 pacientes	Dengue > Controles Associado à gravidade (preditor)
TNF- α	BOZZA et al. (2008) BRAISIER et al. (2012) - Média de idade de 13,4 anos, 51 pacientes GUERRERO et al. (2013) - 6-12 anos, 89 pacientes ARIAS et al. (2014) - 2-42 anos, 40 pacientes SUHARTI et al. (2003) - Média de 6 anos, 50 pacientes	Correlação negativa com trombocitopenia Sem diferença entre formas graves e brandas Dengue > Controles Sem diferença entre formas graves e brandas Sem diferença entre formas graves e brandas
IL-2	BOZZA et al. (2008) BRAISIER et al. (2012)	Sem diferença entre formas graves e brandas Sem diferença entre formas graves e brandas
IL-4	BOZZA et al. (2008) BUTTHEP et al. (2012) - Idade não definida, 164 pacientes	DCSA > DSSA DCSA > DSSA (Apenas no primeiro dia após início dos sintomas)
IL-6	BOZZA et al. (2008) BRAISIER et al. (2012) BUTTHEP et al. (2012)	Sem diferença entre formas graves e brandas DCSA > DSSA DG, DCSA, DSSA (maior que controles nos dois)

	<p>GUERRERO et al. (2013)</p> <p>ARIAS et al. (2014)</p> <p>SUHARTI et al. (2003)</p>	<p>primeiros dias após o início dos sintomas)</p> <p>DCSA > DSSA</p> <p>Controle > DSSA > DCSA > DG</p> <p>Falecidos com SCD > Sobreviventes com SCD</p>
IL-10	<p>CHEN et al. (2005)</p> <p>BOZZA et al. (2008)</p> <p>BRAISIER et al. (2012)</p> <p>GREEN, et al. (1999a), Crianças, sem definição de idade. 61 pacientes</p> <p>GUERRERO et al. (2013)</p>	<p>DCSA > DSSA</p> <p>Sem diferença entre formas graves e brandas</p> <p>DCSA > DSSA</p> <p><i>DCSA > DSSA (IL-10 correlaciona com o grau de efusão pleural)</i></p> <p>DSSA, DCSA, DG, SCD > Controles</p>
IL-17A	JAIN et al., 2013, 0 a acima de 35 anos, 211 pacientes	DCSA > DSSA > Controles
MCP-1	BOZZA et al. (2008)	Sem diferença entre formas graves e brandas

DSSA - Dengue Sem Sinais de Alarme ou Febre de Dengue

DCSA - Dengue Com Sinais de Alarme ou Dengue Hemorrágica

DG - Dengue Grave

SCD - Síndrome do Choque de Dengue

Adaptado de LEE et al., 2016

Desde as primeiras observações de uma doença hemorrágica provocada pelo DENV em 1950 na Tailândia e Filipinas, a busca por marcadores biológicos que consigam prever o agravamento da patologia tem se intensificado, no entanto, os resultados ainda são bastante contraditórios (GUERRERO, et al., 2013; BUTTHERP, et al., 2012; BOZZA, et al., 2008; DE-OLIVEIRA PINTO, et al., 2012). Além dos estudos envolvendo citocinas como marcadores biológicos, evidências mostram que altos níveis de NS1 solúveis e de carga viral podem estar associados a casos mais graves da doença (LIBRATY et al., 2002; VAUGHN et al., 2000). Esta replicação viral aumentada é capaz de ativar de forma exacerbada o sistema imune (*cytokine storm*) e, conseqüentemente, provocar o extravasamento plasmático observado em casos de dengue grave (LIBRATY, et al., 2002; LITTAUA et al., 1990; SINGLA et al., 2016; UBOL et al., 2010).

Além disso, fatores intrínsecos ao vírus podem estar relacionados ao aumento da replicação viral (COLOGNA, et al., 2005; COLOGNA & RICO-HESSE, 2003). O vírus da

dengue, assim como outros vírus RNA, apresentam uma alta taxa mutacional devido a pressões seletivas vetoriais e do hospedeiro (COLOGNA et al., 2005). A expressão destas mutações pode resultar em uma maior infectividade celular, replicação viral e viremia, ocasionando uma maior gravidade da doença, como foi visto em um estudo conduzido por Cologna e colaboradores (2005) que evidenciaram uma correlação entre a gravidade da doença com as cepas de DENV-2 pertencentes ao genótipo do Sudeste Asiático. Desta forma, urge a necessidade de estudos que esclareçam estas correlações entre a resposta inflamatória dos pacientes e replicação viral (viremia, proteínas virais e antigênicas), bem como, verifiquem e caracterizem as cepas virais (sorotipos/genótipos) de dengue circulantes no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil clínico e imunológico dos pacientes com dengue na região norte do Paraná visando analisar a associação entre viremia e inflamação.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil clínico dos pacientes infectados pelo vírus da dengue no município de Cambé;
- Analisar a epidemiologia da dengue na região Norte do Paraná, com foco especial no município de Cambé;
- Verificar a correspondência entre os testes ELISA e o isolamento viral e quais condições favorecem este último;
- Avaliar o perfil imunológico dos pacientes infectados pela dosagem de mediadores inflamatórios, como citocinas de perfil Th1, Th2 e Th17, e quimiocinas, presentes no soro dos pacientes e correlacionar com os dados da viremia e sintomatologia;
- Realizar análises filogenéticas entre os vírus isolados de Cambé com as cepas circulantes no Brasil e em outras regiões do mundo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras dos pacientes e dados clínicos

As amostras utilizadas neste estudo foram provenientes de Unidades de Pronto Atendimento (UPAs) do município de Cambé (23° 16' 33" S, 51° 16' 40" W), norte do Paraná, coletadas no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2014. Foram considerados pacientes elegíveis aqueles que apresentaram suspeita clínica de infecção por dengue, a partir dos critérios estabelecidos pelo MS (2002), com sintomatologia como febre alta, dores musculares e nas articulações, dor retro-orbital e prova do laço positiva, em fase aguda (até o sétimo dia do início dos sintomas). Esta seleção foi realizada pelos médicos e atendentes das UPAs do município, e está limitada aos pacientes que procuraram voluntariamente o atendimento. Aqueles que foram selecionados para o estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e tiveram o sangue obtido por punção venosa de superfície. Este material foi processado nas UPAs para a obtenção do soro ou plasma, seguido por separação em alíquotas, identificação e armazenamento a -80°C na Universidade Estadual de Londrina. Além das amostras de pacientes com diagnóstico clínico de dengue, foram obtidas 20 amostras de soro de doadores sem sinais clínicos da doença, bem como sorologia negativa para dengue aguda, confirmado por ELISA, e 20 amostras de pacientes com sintomatologia febril aguda, mas com sorologia negativa para dengue. A representatividade destes dois últimos grupos foi confirmada por teste estatístico de Fisher, através do programa GraphPad® Prism (San Diego, EUA), para MAC OS X.

Os dados clínicos e epidemiológicos sobre gênero, idade e cor autodeclarada dos pacientes foram analisados através das fichas do Sistema de Informação de Agravo de Notificação (SINAN), preenchidas no momento da entrada dos pacientes nas UPAs e/ou dos prontuários médicos, no caso de pacientes internados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fiocruz com o número de certificado de apresentação para apreciação ética: 49931415.7.1001.5248. Visando garantir o sigilo dos pacientes, as amostras foram armazenadas no Centro de Referência em Virologia do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) onde foram codificadas antes da utilização.

3.2 Dados epidemiológicos

Os dados do LIRAA (Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti*) foram fornecidos pela Secretaria da Saúde do Município de Cambé. Adicionalmente, os dados sobre temperatura média e índice pluviométrico foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2016). As análises de relação entre índice pluviométrico e casos confirmados de dengue foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA), para MAC OS X. Para a avaliação da correlação entre os fatores climáticos e os casos de dengue, foram realizados os testes de correlação de *Pearson* utilizando o programa Microsoft Excel (Washington, EUA) para Windows 10. A partir dos dados gerados, foi criado um gráfico de correlação no programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA), para MAC OS X.

Foram também realizados testes estatísticos entre as características das populações com dengue e sem a doença. Para tanto, os testes de Chi-quadrado e *Fisher's exact test* foram utilizados para as variáveis categóricas, representadas por porcentagem, enquanto o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as médias de idade entre as populações.

3.3 Diagnóstico sorológico

Os soros dos pacientes com suspeita clínica de dengue foram analisados pelo Laboratório de Referência em Virologia para determinação da presença de anticorpos IgM e IgG anti-dengue vírus (DENV), além da presença da proteína não estrutural (NS) 1. Utilizou-se para tanto os kits diagnóstico Panbio[®] Dengue IgM Capture ELISA (CAT – 01PE20), Panbio[®] Dengue IgG Indirect ELISA (CAT – 01PE30) e Panbio[®] Dengue Early ELISA (CAT – 01PE40), segundo metodologia do fabricante. Os protocolos de uso dos *kits* estão nos anexos A, B e C da dissertação. Para a avaliação dos índices de absorvância das amostras utilizou-se o aparelho Synergy H1, Biotek[®].

3.4 Isolamento viral

Visando realizar a confirmação diagnóstica, as amostras positivas e/ou indeterminadas para a presença do antígeno NS1 e/ou do anticorpo anti-dengue da classe IgM foram isoladas em cultivo celular. Para tanto, as células do estágio larval de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC[®] CRL-1660[™]), adaptado do protocolo de Igarashi (1978), foram semeadas 24h ou 48h antes do

experimento nas concentrações $2,0 \times 10^6$ ou $1,0 \times 10^6$, respectivamente, em garrafas de cultivo de 25cm^3 (T25). No dia da infecção, o meio de cultura das garrafas foi descartado, e o soro dos pacientes diluído (1:10) em meio de cultivo Leibovitz's-15 (L-15, Gibco® CAT- 11415064) incompleto. Esta solução diluída foi então filtrada em $0,22\ \mu\text{m}$, e $500\ \mu\text{L}$ dela foi transferida para a garrafa T25, sendo o restante (aproximadamente $200\ \mu\text{L}$) armazenado à $-80\ ^\circ\text{C}$ para posterior titulação. Para o controle negativo, filtrou-se apenas o meio L-15 incompleto. Ao final desta etapa, as garrafas foram incubadas em estufa de *Biological Oxygen Demand* (B.O.D.) (FANEM®, 347 CD), a $27\ ^\circ\text{C}$ e homogeneizadas a cada 20 min. Neste intervalo foi realizada a inspeção microscópica do tapete celular, sendo que a incubação foi interrompida em caso de descolamento celular excessivo. O tempo máximo de incubação foi de 1h30min.

Após o período de incubação, o inóculo foi retirado com pipeta de 5 mL estéril e transferido para um tubo cônico de 15 mL contendo 5 mL de meio L-15 completo. Em seguida, o tubo cônico foi centrifugado por 5 min a $500 \times g$, o sobrenadante descartado e o precipitado recuperado em 5 mL de meio L-15 completo e o volume devolvido para a mesma garrafa. As garrafas foram mantidas até 14 dias na B.O.D a $27\ ^\circ\text{C}$, sendo realizada a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) 7 e 14 dias após a infecção. Em caso de confirmação da infecção neste primeiro momento (7 dias) a(s) amostra(s) eram recolhidas. Quando negativa, a IFI foi repetida até 7 dias após o primeiro teste para confirmação do resultado. Para o recolhimento das amostras, foi feita a raspagem celular com *cell scraper* (TPP® CAT – 99003) e passagem do volume total das garrafas em tubos cônicos de 15 mL, seguido por centrifugação a $500 \times g$ durante 5 min. Para as amostras positivas, foram separados 4 tubos cônicos de 1,5 mL de sobrenadante, e 2 tubos de células com cerca de 500mL cada, além da 2 tubos cônicos de sobrenadante e 1 tubo de células para as amostras negativas, com cerca de 500mL cada, que foram posteriormente armazenadas a $-80\ ^\circ\text{C}$. Os tubos foram devidamente rotulados de forma a informar o número da amostra e a passagem (P.0) e estão disponíveis no banco de vírus do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas.

3.5 Imunofluorescência Indireta

Para confirmação da presença de antígenos virais do DENV nas células C6/36 inoculadas com as amostras de soro dos pacientes, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta com anticorpo anti-flavivirus (4G2; ATCC® HB-112™). Este anticorpo monoclonal

foi produzido por Henchal e colaboradores (1982) e liga-se a uma região conservada no domínio II da proteína E de *Flavivirus*. Inicialmente, parte da monocamada celular foi raspado com uma micropipeta P200 (ThermoFisher Scientific[®], Finnpiette F1 P200), retirando um volume de 200 µL. Estes 200 µL foram então depositados em um microtubo cônico de 1,5 µL rotulado e centrifugado a 1500 x g por 3 min. Parte do sobrenadante foi descartado, e o precipitado recuperado em aproximadamente em 50 µL de meio, distribuindo este volume em duplicata em uma lâmina de teflon para imunofluorescência.

Esta lâmina ficou dentro do fluxo por aproximadamente 3 h, para que assim o meio pudesse secar em temperatura ambiente (T.A.), e as células aderissem à lâmina. Após este período, as células foram fixadas com metanol absoluto por 3 min à T.A.. Depois da fixação, o procedimento teve continuidade fora do fluxo laminar. Logo após a retirada do excesso de metanol e as lâminas estarem devidamente secas, elas foram incubadas com o anticorpo específico, 4G2 (1:400 em PBS 1x) por 30 min a 1 h, em estufa a 37 °C. Depois deste período, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x, e incubadas com o anticorpo secundário, anti-camundongo IgG conjugado com Alexa 488 (1:400 em PBS 1x) juntamente com solução de azul de Evans em 1:400 (a partir de solução-mãe de 1% diluído PBS), incubando por 30 min a 1 h em estufa a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x, e incubadas com 4'-6-diamidino-2-fenolindol (DAPI) diluído em PBS a 1:100 (0,3 µg/mL) por 3 a 5 min, lavadas 3 vezes com PBS 1x, secas e preparadas para leitura com 3 a 5 µL de glicerol 10% diluído em PBS 1x e montadas com lamínula para observação em microscópio de fluorescência (Nikon[®] Eclipse 80i)

3.6 Titulação viral

A determinação da viremia no soro dos pacientes foi realizada pela técnica de titulação viral por imunodeteção de foco de infecção em células C6/36 com protocolo adaptado de Zamree e colaboradores (2005). As titulações foram realizadas em placa de 24 poços, semeadas a $1,0 \times 10^5$ células C6/36/poço. Após incubação que durou entre 16 a 24 h, o sobrenadante dos poços foi descartado, e em seguida, o soro dos pacientes foi diluído em gradiente de concentração (de 10^{-2} a 10^{-5}) em meio L-15 incompleto. Foram adicionados 400 µL destas diluições em duplicata nas placas de 24 poços. O controle negativo consistiu de meio L-15 incompleto. Após, deixou-se o inóculo de 1 h a 1 h 30 min em estufa B.O.D a 27 °C. Em seguida, o inóculo foi descartado e adicionou-se (400 µL/poço) uma solução 1:1 de 3,2% de

carboximetil celulose (CMC, Sigma-Aldrich[®], CAT C4888) com meio L-15 completo concentrado 2x (*overlay*). A placa foi vedada com fita crepe para evitar a evaporação, e permaneceu na incubadora a 27 °C por 7 dias. Apenas as amostras com isolamento viral positivo por imunofluorescência foram submetidas a titulação viral. Depois deste período, as placas foram reveladas, conforme descrito a seguir.

O *overlay* foi retirado e a monocamada celular lavada 3 vezes com PBS 1x. Posteriormente, foi adicionado 300 µL de paraformaldeído (Sigma-Aldrich[®] CAT – P6148) 3% em PBS 1 x para a fixação das células deixando-se incubar em temperatura ambiente (TA) por 20 min. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS 1 x e seguiu-se a permeabilização das células pela adição de 200 µL de 0,05 % de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich[®] CAT T8787) diluído em PBS 1x por 4 min em T.A. A monocamada foi lavada 3 vezes com PBS 1 x, e incubou-se 200 µL de anticorpo primário (4G2 diluído 1:400 em PBS 1x) durante 1 h a 37 °C. Depois desta incubação, a monocamada foi novamente lavada 3 vezes com PBS 1 x e realizou-se nova marcação agora com 200 µL com anticorpo secundário (Anti-Mouse AP – Sigma-Aldrich[®] CAT A3562, 1:7500 em PBS 1x) durante 1h a 37 °C. Após, a monocamada foi lavada 3 vezes com PBS 1x, e incubada com 200 µL de solução reveladora (contendo a solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato – BCIP – e cloreto nitro-azul de tretazólio –NBT-, ambos da marca Promega[®], CAT S3771), sendo mantida em temperatura ambiente e no escuro por até 1 h. A reação foi interrompida quando do aparecimento dos focos de infecção com água desmineralizada. Após a completa secagem das placas em T.A. os focos foram contados visando determinar a viremia nas amostras positivas para dengue no isolamento viral. Para o cálculo da viremia, utilizou-se a fórmula abaixo:

Fórmula 3.2. Cálculo para obtenção do valor de viremia

$$\frac{\text{média do número de focos}}{\text{volume do inóculo}} \times \text{diluição}$$

Fonte: FLINT, et al., 2009.

3.7 Determinação do sorotipo viral

Para determinação do sorotipo do vírus dengue nas amostras positivas no isolamento viral foi realizada a técnica de RT-PCR segundo descrito por Mishra e colaboradores (2011).

Inicialmente, foi realizada a extração de RNA do sobrenadante obtido através do isolamento viral, com o kit "QIAamp® Viral RNA" via procedimento "Mini Spin" (Qiagen® CAT - 52904). A primeira etapa consiste na diluição de 140 µL da amostra (sobrenadante de cultivo do isolamento positivo – P.0) em 560 µL de tampão "AVL", contendo tampão "AVE" + "RNA carrier" liofilizado (1:1), seguido por homogeneização da amostra e incubação à T.A. por 10 min. Após, adicionou-se 560 µL de etanol 96-100% (MERCK® CAT – 1009831000) e as amostras foram homogeneizadas por pipetagem, seguido de breve centrifugação para remover gotículas presentes no microtubo cônico. Em seguida, 630 µL desta solução foram adicionados à mini coluna com membrana de sílica "QIAamp Mini column", sobre um tubo coletor de 2 mL para que o filtrado possa ser obtido e descartado. Então, centrifugou-se a solução por 1 min a 6.000 x g, sendo o tubo coletor com o filtrado descartado e o tubo coletor recolocado na coluna, repetindo-se esta etapa até que todo o volume da amostra fosse passado pela mini coluna. Em seguida, foram adicionados 500 µL à mini coluna de "Buffer AW1". O tubo foi devidamente fechado e centrifugado a 6.000 x g durante 1 min e depois, o tubo coletor foi substituído por um tubo novo. Na sequência, adicionou-se 500 µL de "Buffer AW2" à mini coluna e esta foi centrifugada a 20.000 x g por 3 min. Para a etapa final, eluiu-se o RNA presente na coluna em um microtubo de 1,5 mL. Para tanto, foram realizadas duas eluições de 30 µL de tampão "AVE" à membrana de sílica da mini coluna e pré-incubadas por 1 min para posterior centrifugação a 6.000 x g por 1 min. Os eluídos foram então armazenados à -80 °C para posterior análise.

Após a extração do RNA do sobrenadante de cultivo seguiu-se com a técnica de RT-PCR utilizando-se protocolo *One Step*. Para tanto, foi preparado um mix contendo: 5,0 µL de 5 X buffer (Qiagen® CAT 210210), 1,0 µL de DNTP mix (10 mM, Qiagen® CAT 210210), 2,5 µL de cada um dos iniciadores, D1 (5' – TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG - 3'), TS1 (5' - GGTCTCAGTGATCCGGGGG - 3'), TS2 (5' - GGTCTCAGTGATCCGGGGG - 3'), TS3 (5' – TAACATCATCATGAGACAGAGC – 3'), TS4 (5' - CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'), todos a 5 pmol/µL, 1,0 µL de *Enzyme Mix* (Qiagen® CAT 210210), 0,125 µL de *RNase Out* (Qiagen® CAT 210210), e 2,8 µL de Água *RNase free* (Qiagen® CAT 210210). A adição destes gerou um volume de 22,5 µL, ao qual foram adicionados 2,5 µL do RNA extraído (como acima descrito), ou controles positivos para DENV-1/BR/90 (GenBank AF226685), DENV-2/BR/01-01 (GenBank JX073928), DENV-3/BR/97-04 (GenBank EF629368) e DENV-4/TVP/360 (GenBank KU513442). Para os controles positivos, foi feita a união na proporção 1:1 do RNA DENV-1 e -3 e DENV 2- e 4. Para o controle negativo foi utilizada água ultrapura no lugar do RNA.

Os microtubos foram incubados em termociclador (GeneAmp® PCRsystem 9700, ThermoFisher Scientific®) e a reação ocorreu como descrito na Fig. 3.1. Após seu término, preparou-se um gel de agarose 1% em tampão TBE 1x, com 1 µg/mL de brometo de etídio. Acrescentou-se glicerol (10% em PBS 1x) na proporção 1:10 às amostras, e essas foram aplicadas aos poços do gel. Além disso, foi adicionado um controle de peso molecular (1Kb ladder plus, Sigma Aldrich® CAT D0428 – 1VL) e a eletroforese foi realizada na configuração de 100 watts, 100 mA e 100 volts. Ao final da corrida, o gel foi analisado através da observação por transiluminador (L-PIX EX – Loccus®) e, de acordo com a posição das bandas do produto de RT-PCR, o sorotipo viral foi determinado (DENV-1 – 482 pb, DENV-2 - 119 pb, DENV-3 - 290 pb, DENV-4 - 389 pb).

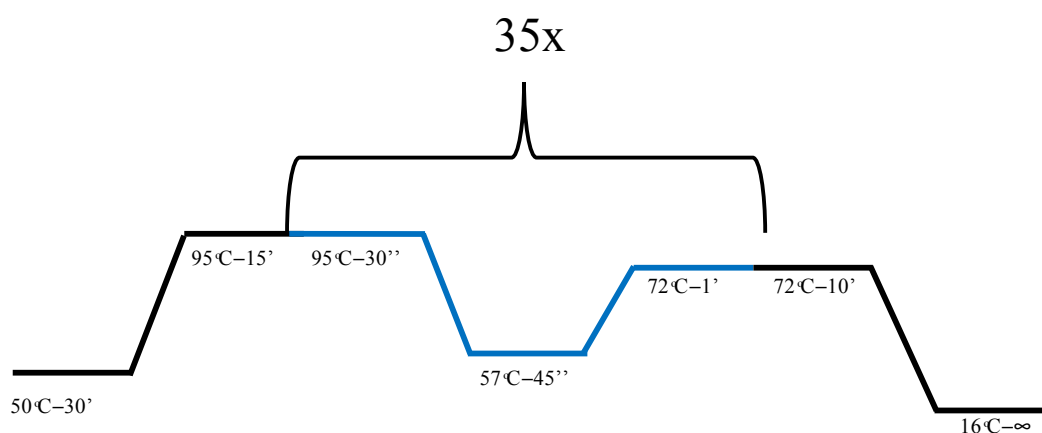


Fig. 3.1 Protocolo de ciclagem para determinação do sorotipo viral.

3.8 Sequenciamento do gene do envelope viral (E)

Para determinar a sequência nucleotídica do gene de envelope do DENV, o RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante do isolamento viral utilizando o kit "QIAamp® Viral RNA" conforme previamente descrito. A partir do RNA viral, foi realizada a etapa de transcrição reversa para conversão complementar em cDNA utilizando o oligonucleotídeo *random primer* (100 pmol/µL Promega® CAT – A3800). Inicialmente, foram adicionados a um microtubo de 1,5 mL *RNAse free* 5,6 µL de RNA viral extraído e 2,5 µL de *random primer* (100 pmol/µL Promega® CAT – A3800). Para o controle negativo, utilizou-se água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) no lugar do RNA viral. Esta mistura foi aquecida em um termobloco (ThermoStat Plus - Eppendorf®) por 5 min a 70 °C. Posteriormente, foi adicionado

11,9 μL da mistura de tampão e enzima composto da seguinte forma: 4,0 μL do 5 x buffer (Promega[®] CAT – A3800), 2,4 μL do MgCl_2 (25 mM, Promega[®] CAT – A3800), 4 μL DNTP (2,5 mM, Promega[®] CAT – A3800), 0,5 μL *RNAse out*, 1 μL RT IMPROM (Promega[®] CAT – A3800) ao RNA pré-incubado com o *random primer* e seguiu-se nova incubação em termobloco (ThermoStat Plus - Eppendorf[®]) durante 5 min a 25 °C e 42 °C durante 1 h.

Posteriormente, foi realizada a PCR com enzima de alta fidelidade (LongRange PCR, Qiagen[®] – Cat. 206402) para a amplificação do material genético do gene E viral visando seu posterior sequenciamento. Desta forma, foi preparado o mix de reação em microtubo *RNAse free* da seguinte forma: 5,0 μL LongRange PCR buffer 10x com Mg^{2+} (Qiagen[®] – Cat. 206402), 2,5 μL DNTP mix (10mM, Qiagen[®] – Cat. 206402) 4 μL do primer M5' (5' - GCGGATCCTCCGTGGCACTGGCCCCACAC - 3'), 4 μL do primer CN12 (5' - GCATCTCCTACAACCACTG - 3'), ambos os primers em concentração (5 pmol/ μL), 29,1 μL água *RNAse free* (Qiagen[®] – Cat. 206402) e 0,4 μL de *LongRange PCR enzyme mix* (Qiagen[®] – Cat. 206402), o que resultou em um mix com volume de 45 μL . Finalmente, adicionou-se 5 μL do cDNA previamente preparado ao mix em microtubo de 250 μL , seguido por uma incubação em termociclador (GeneAmp[®] PCRsystem 9700, ThermoFisher Scientific[®]) com reação descrita na Fig. 3.2. Após seu término, preparou-se um gel de agarose 0,8 % em tampão TBE, com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio. Acrescentou-se glicerol (10% em PBS 1x) na proporção 1:10 às amostras, e essas foram aplicadas aos poços do gel. Além disso, foi adicionado um controle de peso molecular (1Kb ladder plus, Sigma Aldrich[®] CAT D0428 – 1VL) e a eletroforese foi realizada à configuração de 100 watts, 100mA e 100 volts. Ao final da corrida, o gel foi analisado através da observação por transiluminador (L-PIX EX – Loccus[®]), gerando um produto de PCR de 1997 pares de base.

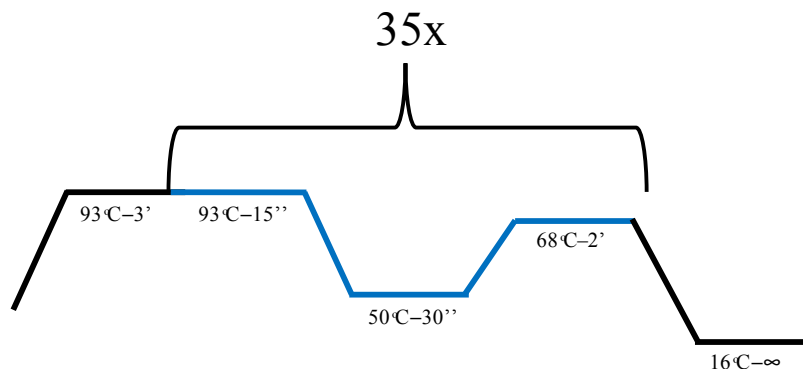


Fig. 3.2 Protocolo de ciclagem para a técnica LongRange.

Após a separação eletroforética em gel de agarose, o produto de PCR foi purificado com o *kit High Pure PCR* (Roche Life Science[®] - CAT 11732676001). Para a purificação, inicialmente foram adicionados 500 µL de *Binding buffer* a cada 100 µL de produto de PCR (caso o volume do produto seja menor, deve-se completar com água ultrapura) e esta mistura foi centrifugada à velocidade máxima através da coluna presente no *kit*. O filtrado foi descartado e a coluna realocada. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 1 min à 13.000 x g utilizando o *Wash Buffer*, descartando sempre o filtrado após cada lavagem. Por fim, foram adicionados de 25 a 50 µL de *Elution Buffer* à coluna (o volume de eluição foi determinado de acordo com a concentração do material genético e intensidade banda resultante da reação de PCR). Em seguida, a concentração do DNA foi determinada utilizando o espectrofotômetro de pequeno volume Nanodrop 1000 (ThermoScientific[®]). Finalmente, o DNA purificado, juntamente com os respectivos primers M5' (5' - GCGGATCCTCCGTGGCACTGGCCCCACAC - 3'), PhD17 (5' - GGGATCTTGCATGGTGC - 3'), D1Domb- (5' - TGCGGTACCGCTGCTTCCTTTCTTGAACCA - 3'), D1Domb+ (5' - ACGGGATCCGTGATGTGCACAGGCTCATTT - 3') e CN12 (5' - GCATCTCCTACAACCACTG - 3'), todos em concentração de 5 pmol/µL foram enviados para sequenciamento pela empresa Macrogen[®]. Realizou-se o sequenciamento de 10 sequências de Cambé, sendo 5 de 2014 e 4 de 2013 pela empresa Macrogen[®] através da técnica de dideoxinucleotídeo terminal de Sanger.

As sequências consenso foram montadas através do software Phred/Phrad/Consed (CodonCode[®]) para MAC OS X. Em seguida, estas sequências foram alinhadas e foram verificadas as diferenças aminoacídicas e nucleotídicas entre elas, pelo software BioEdit v 7.0.5 (CareData[®]) para Windows 10. A partir desta análise, foram descartadas 4 sequências idênticas, sendo que as 6 restantes seguiram para a análise filogenética. Para tanto, foram selecionadas amostras da América do Sul com identidade de até 95% e cobertura de 99%, em relação à amostra LRV 14 1166 de Cambé, além de representantes dos genótipos I, II, III e IV do DENV-1 e uma sequência de DENV-3 a partir do banco de dados do NCBI, gerando um dataset com 160 amostras. Em seguida, estas foram alinhadas pelo método *ClustalW* através do BioEdit v 7.0.5, e analisadas pelo método de máxima verossimilhança pelo programa PhyML 3.0, com modelo de substituição nucleotídica GTR e 1000 réplicas de *bootstrap*. A árvore resultante foi editada pelos programas Figtree v.1.4.3 e Adobe Illustrator CC 2018.

3.9 Determinação das citocinas e quimiocinas

Para a determinação da concentração das citocinas nas amostras de soro de pacientes com infecção confirmada por isolamento viral, foram utilizados os kits *Human Th1/Th2/Th17* (CAT – 560484 BD[®]), *Human IFN- γ Flex Set* (CAT – 560379 BD[®]) e *Human MCP-1 Flex Set* (CAT – 558287 BD[®]). A técnica baseia-se na captura entre a proteína solúvel (citocina) presente no soro dos pacientes através de anticorpos específicos ligados a esferas fluorescentes. Inicialmente, foi realizada para cada *kit* uma curva padrão de concentração conhecida das citocinas testadas (valores entre 20 pg/mL e 5000 pg/mL), conforme protocolo do fabricante. Em seguida, 50 μ L do soro dos pacientes (diluído 1:10 em PBS) e dos pontos da curva padrão foram transferidos para placas de 96 poços com fundo em U, seguido pela incubação por 3 h a T.A. em ambiente protegido da luz, com esferas fluorescentes recobertas com anticorpos específicos para as citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , IFN- α , TNF- α e MCP-1 β . Após a incubação, adicionou-se a cada poço 100 μ L de *Wash Buffer* seguido da centrifugação a 1500 x g por 2 min sendo o sobrenadante descartado, repetindo este procedimento mais duas vezes. As esferas foram recuperadas em 200 μ L de *Wash Buffer* para a leitura em citômetro. A obtenção dos dados de citometria foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD[®]). Em seguida, os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo V10 (Tree Star, Ashland, OR[®]), onde a intensidade média de fluorescência das amostras e dos pontos da curva foram extraídos. Com estes valores, foi determinada a curva padrão por Excel (Microsoft[®]) e, a partir desta, determinou-se a concentração das citocinas de cada amostra. Para as análises estatísticas, primeiramente foi verificada a distribuição normal das variáveis pelo método Kolmogorov-Smirnov através do GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA), para MAC OS X. Em seguida, foram realizados os testes de Mann-Whitney para avaliar as diferenças de produção de citocinas entre os grupos avaliados, e a correlação entre viremia e citocinas foi realizada por meio de coeficiente de *Spearman*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Epidemiologia

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes de Unidades de Pronto Atendimento (UPAs) do município de Cambé, região norte do Paraná (Fig. 4.1.1), coletadas entre janeiro de 2013 e dezembro de 2014. Durante o período de estudo, foram recebidas 888 amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue, sendo que a partir da avaliação sorológica (ELISA IgM/NS1) 264 destas (29,7% dos 888) foram classificados como com dengue em fase aguda de infecção (tabela 4.1.1).



Fig. 4.1.1 Localização da cidade de Cambé, no norte do Paraná. Mapa localizando o estado do Paraná no Brasil, e em maior detalhe, destacando a posição geográfica de Cambé (23° 16' 33" Sul, 51° 16' 40" Oeste).

Fonte: Abreu (2006)

Tabela 4.1.1: Distribuição das amostras suspeitas de infecção por dengue e os casos confirmados de infecção aguda (sorologia) nos anos de 2013 e 2014

Ano	Amostras suspeitas	Amostras positivas*	% total
2013	352	45	12,8
2014	536	219	46
Total	888	264	29,7

*NS1⁺/IgM⁺, NS1⁺/IgM⁻, ou ainda NS1⁻/IgM⁺

Com os testes de ELISA, a doença foi confirmada em 264 das 888 (29,7%) amostras de soro recebidas em ambos os anos. O diagnóstico de dengue a partir da detecção de antígeno viral (NS1) e anticorpos específicos (IgM/IgG) é considerado eficiente por diversos autores, especialmente nos primeiros 7 dias de doença (WANG & SEKARAN, 2010; ARYA, et al., 2011; HU, et al., 2011; ALCON et al., 2002). Desta forma, a confirmação da doença em aproximadamente 30% dos pacientes com suspeita de dengue não se deve necessariamente à eficiência do teste, mas provavelmente, devido a uma falha na distinção clínica da dengue com outras infecções. Segundo a OMS (2009), os pacientes que apresentam sintomatologia compatível à doença e vivem ou viajaram recentemente para regiões endêmicas, podem ser classificados como com suspeita de dengue. No entanto, devido à semelhança clínica da dengue com outras doenças, como enterovirose, *influenza*, hepatites virais e outras arboviroses, a confirmação da suspeita clínica se dá através de avaliação laboratorial específica, como com as técnicas de ELISA e RT-PCR (OMS, 2009; MS, 2016b).

Nota-se que, além do aumento na incidência da doença de 12,8% em 2013 para 46% em 2014, o número de casos se concentrou entre os meses de março e maio em ambos os anos (Fig 4.1.2). Sabendo que fatores ambientais podem influir diretamente a população de mosquito vetor, e conseqüentemente, a incidência da doença, avaliou-se as condições de temperatura média mensal e pluviosidade em ambos os anos de estudo a partir de informações do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) (Fig. 4.2) (PAULA et al., 2005; SOUTHWOOD et al., 1972; CHOWELL & SANCHEZ, 2006). Além disso, foi realizado o teste de correlação por meio do coeficiente de *Pearson* entre estas condições climáticas e o número de casos de dengue (Fig. 4.1.3).

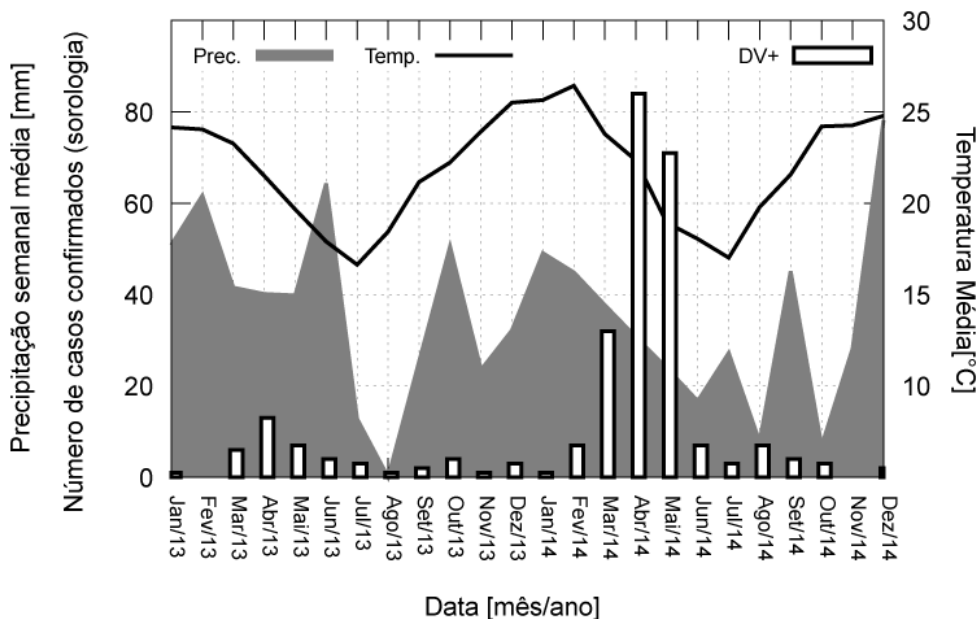


Fig. 4.1.2 Distribuição mensal das amostras positivas por sorologia, bem como dados da temperatura média (°C) e pluviosidade semanal média no mês (mm), durante os anos de 2013 e 2014 em Cambé. As amostras positivas no ELISA (IgM⁺ e ou/NS1⁺) estão representadas por barras brancas, com eixo à esquerda. Os dados de temperatura mensal média (°C) estão representados por uma linha contínua e com eixo à direita, enquanto a pluviosidade total mensal (mm) está em cinza ao fundo, com eixo à esquerda.

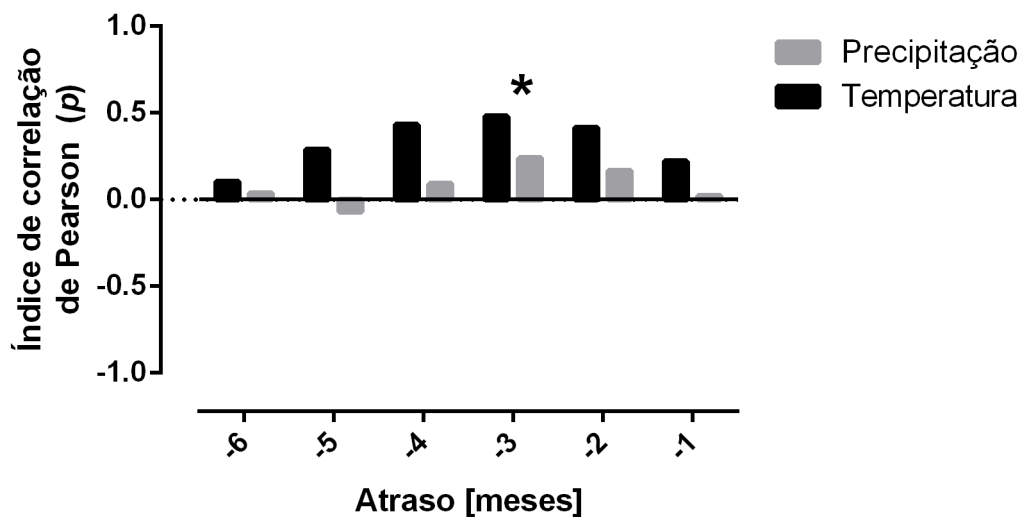


Fig. 4.1.3 Correlação entre precipitação, temperatura e casos de dengue. Esta figura representa o índice de correlação de *Pearson* entre os fatores climáticos (precipitação e temperatura) e o número de casos de dengue. Para esta avaliação, foi considerada a influência das condições climáticas com um atraso de até 6 meses. Assim, observa-se que o pico máximo de correlação ocorre em 3 meses de atraso para ambos os fatores ($p = 0,023$ e r de *Pearson* = 0,516 para precipitação, e $p = 0,38$ e r de *Pearson* = 0,217 para temperatura).

Com a avaliação de *Pearson* verificou-se que as variações climáticas (precipitação e temperatura) apresentam uma correlação positiva com os casos de dengue que ocorrem 3 e 4 meses depois (Fig. 4.1.3). A literatura mostra que a sazonalidade da dengue parece estar relacionada com variações climáticas, e estas flutuações estão intimamente relacionadas à população de mosquito vetor (PHAM et al., 2011; JOHANSSON et al. 2009; LIMKITTIKUL et al., 2014; IBARRA et al., 2013). No Brasil, o LIRAA (Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti*) é um programa implementado pelo Ministério da Saúde que avalia a infestação de *Aedes aegypti* em diferentes municípios (MS, 2013). Em Cambé, o índice LIRAA em janeiro de 2014 ficou em 4,2 (anexo F), sendo que, segundo o MS, índices de infestação acima de 4,0 representam um risco de surto de dengue (SESA, 2014). Assim, considerando estas informações, é possível sugerir uma possível relação entre o aumento da população de mosquito vetor com o aumento na incidência da dengue na região em 2014.

Ainda, estudos mostram que uma forma de prevenção de novos surtos de dengue se dá a partir do monitoramento e controle do seu mosquito vetor, *Aedes aegypti* (GOMEZ-DANTES et al., 1991; TAPIA-CONYER, et al., 2013). Desta forma, sabendo que os hábitos de alimentação, acasalamento e ovoposição do mosquito normalmente não ultrapassam um raio de 300m, avaliamos os endereços de residência dos pacientes com dengue analisados no estudo, a fim de verificar possíveis regiões de foco de infestação do mosquito (Fig 4.1.4) (RODRIGUES et al., 2015). Para tanto, os endereços residenciais dos pacientes foram retirados a partir das fichas SINAN (Sistema de Informação de Agravamento de Informação), preenchidas nas UPAs.

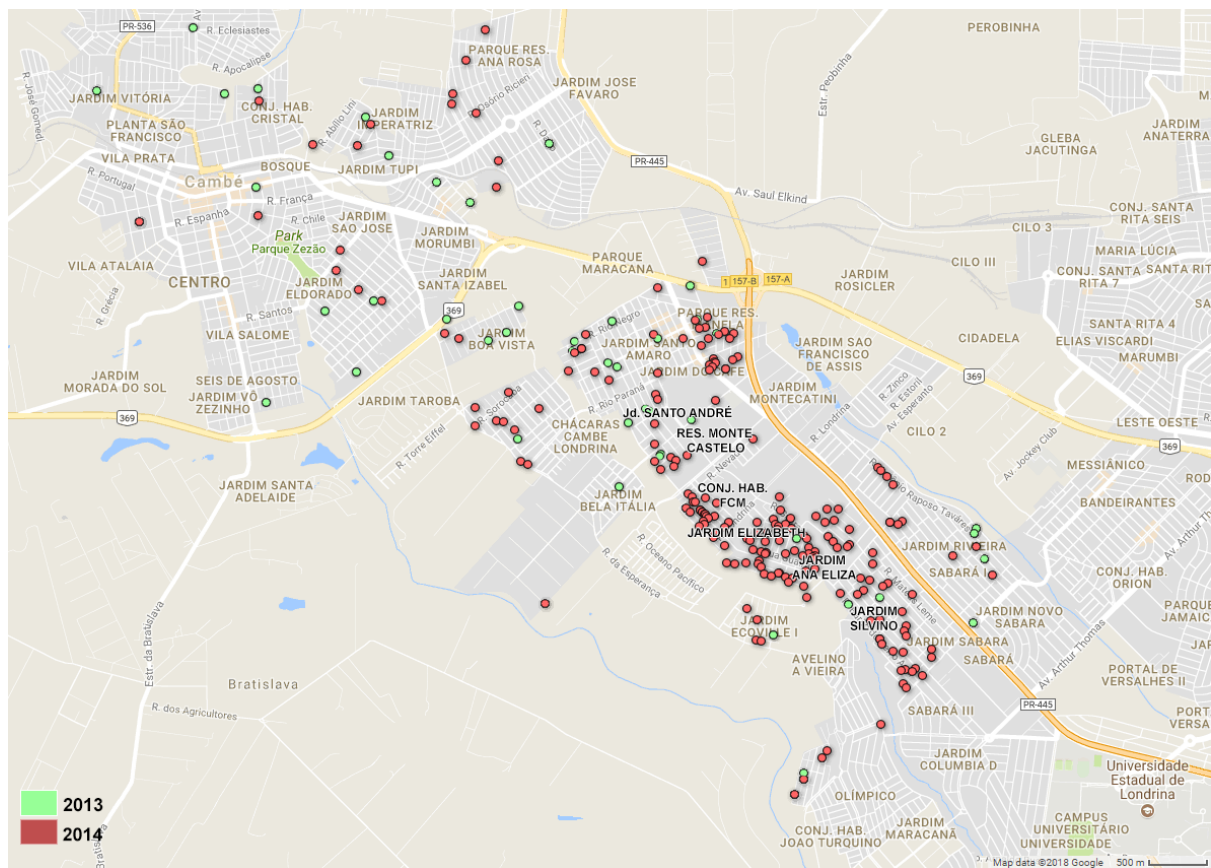


Fig. 4.1.4 Frequência de número de pacientes com dengue aguda por bairro em Cambé nos anos de 2013 e 2014. Para a construção da figura, foram inseridos os endereços de residência presentes nas fichas SINAN dos pacientes com dengue (NS1 e/ou IgM⁺) coletados nos anos de 2013 (verde, n = 45) e 2014 (vermelho, n= 212, sendo que 7 não apresentavam os endereços legíveis) na plataforma FusionTables fornecida pela Google[®]. No Adobe[®] Photoshop CS6, foram adicionados bairros que não estavam sendo representados, utilizando as informações disponibilizadas pela prefeitura de Cambé (2015).

Com esta avaliação, verificou-se que grande parte dos casos de dengue de 2014 se concentrou nos bairros Jardim Santo André, Residencial Monte Castelo, Conjunto Habitacional Fernando Collor de Mello, Jardim Elizabeth, Jardim Ana Eliza e Jardim Silvino, localizados na região mais ao sul do município. Desta forma, observa-se que as regiões que apresentaram incidência da doença são geograficamente próximas umas das outras e, além disso, encontram-se na divisa com a cidade vizinha, Londrina. Curiosamente, os surtos de dengue em Cambé e Londrina em 2013 e 2014 foram similares, com um aumento no número de casos no segundo ano. No entanto, no Paraná registrou-se o oposto, com uma redução da incidência da doença em 2014 (SESA, 2014). Assim, evidencia-se uma variação regional da doença englobando os dois municípios, que não necessariamente acompanha o restante do Estado. Estas variações regionais não são incomuns, e podem ocorrer devido a diversidade geográfica, variações climáticas e densidade populacional (TEIXEIRA et al, 2013).

Outro fator epidemiológico que pode influir na incidência na dengue são características populacionais, como gênero e cor autodeclarada. No Sri Lanka, por exemplo, foi visto que entre os anos de 1996 e 2005, a maioria das pessoas com mais de 15 anos infectadas com dengue eram homens (ANKER & ARIMA, 2011). Outros estudos mostram também que pacientes brancos são mais suscetíveis à dengue do que pacientes com pele negra (SIERRA et al., 2007; AZAMI et al., 2011; CARDOSO et al., 2011). Desta forma, as informações sobre a idade, gênero e cor autodeclarada dos pacientes foram obtidas a partir dos dados da ficha SINAN, e comparadas entre pacientes com sorologia positiva e negativa (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.2 Comparativo de características entre as populações Dengue – (NS1⁻ e IgM⁻) e Dengue + (NS1⁺ e/ou IgM⁺)

Parâmetros		Total	Dengue –	Dengue +	<i>p</i>
Pacientes		888 (100%)	624 (70%)	264 (30%)	
Idade média		28	26	33	<0,0001
Gênero	Feminino	460 (52%)	329 (52%)	131 (50%)	0,4193
	Masculino	428 (48%)	295 (47%)	133 (50%)	
Cor autodeclarada	Branca	498 (56%)	347 (56%)	151 (57%)	0,6072
	Parda	141 (16%)	104 (17%)	37 (14%)	
	Negra	53 (6%)	29 (5%)	18 (6%)	
	Amarela e Indígena	8 (<1%)	6 (<1%)	2 (<1%)	
	Não declarada	194 (22%)	138 (22%)	56 (22%)	

A literatura mostra que a incidência da doença de acordo com o gênero parece não seguir um padrão. Em três epidemias distintas de dengue em Cuba, a dengue afetou 1 homem para cada 5.4 mulheres em 1981; 1:1 em 1997 e 2 homens para cada 1 mulher entre 2001 e 2002 (GONZÁLEZ et al., 2005). Já em estudos realizados em São Luís do Maranhão, por Gonçalves-Neto e Rebêlo (2004), em Fortaleza, Ceará, por Vasconcelos e colaboradores (1998) e em Singapura, por Yew e colaboradores (2009), não houve diferença na incidência da doença entre os gêneros. Em nosso trabalho, também não foi observada uma incidência diferencial de dengue entre homens e mulheres. Sobre a cor de pele, os dados da literatura também se mostram contraditórios. Para alguns autores, a incidência de dengue parece ser

indiferente de acordo com a cor de pele, ou mais grave na população branca do que a negra (AZAMI et al., 2011; CARDOSO et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2005). No entanto, apesar da maior parte da população em Cambé se autodeclarar como branca, sabe-se que no Brasil existe uma grande diversidade na ancestralidade em sua população, e a avaliação fenotípica por si só não é o suficiente para esta caracterização devido à alta miscigenação da população (PENA, 2005). No estudo, a cor de pele autodeclarada não foi um fator diferencial para a incidência da doença. Por fim, a média da idade da população de estudo foi de 33 anos, e maior no grupo com dengue do que aqueles que apresentaram sorologia negativa (Tabela 4.1.2). Esta observação está de acordo com estudos realizados em Vitória e Espírito Santo, com 44,1% dos casos de dengue ocorrendo na população entre 20 a 39 anos (CARDOSO et al., 2011). Ainda, estudos de casos de dengue no Brasil entre os anos de 1998 e 2003 indicam que aproximadamente 50% da incidência da doença ocorreu na população entre 20 a 39 anos de idade (TEIXEIRA et al., 2009).

Em seguida, foi avaliada a sintomatologia presente nos pacientes com sorologia positiva (Fig. 4.1.5). Esta análise permite verificar a presença dos sintomas mais frequentes da doença na região, além da sua posterior correlação com dados de viremia e resposta inflamatória. Alguns estudos mostram que a carga viral circulante pode influenciar no agravamento dos sintomas (LIBRATY et al., 2002; VAUGHN et al., 2000). Além disso, é visto também que fatores imunológicos, como a produção de citocinas, podem correlacionar com a sintomatologia apresentada pelos pacientes (BOZZA et al., 2008; ABHISHEK et al., 2017; SERATNE et al., 2016).

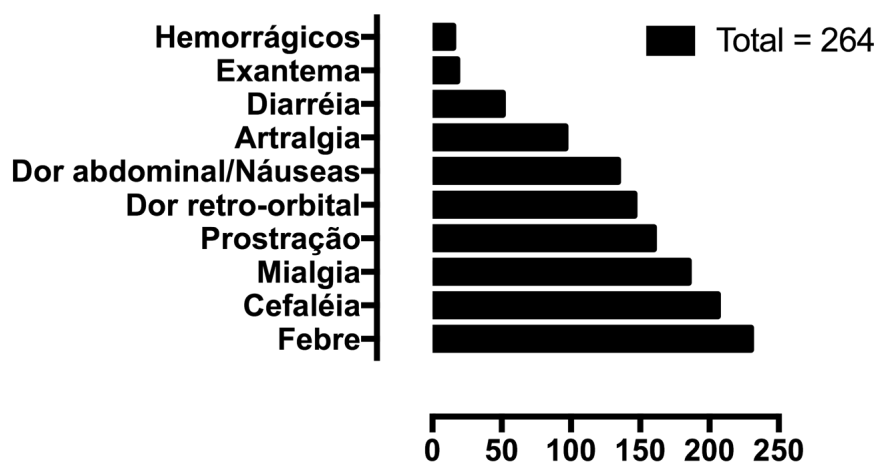


Fig. 4.1.5 Sintomatologia clínica de pacientes IgM e/ou NS1+. O gráfico representa a sintomatologia geral dos 264 pacientes considerados pelo estudo como positivos para dengue aguda (NS1+ e/ou IgM +). Vinte e quatro apresentaram febre e outros 6 sintomas inespecíficos, que podem incluir cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, diarréia, exantema, prostração, náuseas, dor na nuca e odinofagia. Cento e noventa e cinco pacientes apresentaram febre e outros 5 ou menos sintomas inespecíficos. Quinze dos 264 pacientes apresentaram febre e sinais hemorrágicos, que incluiu sintomas como prova do laço positivo (n = 11), petéquias (n = 2), sangramento gastrointestinal (n = 1) e gengivorragia (n = 1). Finalmente, 34 quatro pacientes não manifestaram febre, mas sim outros sintomas inespecíficos.

Desta forma, conclui-se que grande parte dos pacientes com dengue não desenvolveu sintomatologia grave, além de 34 destes (12,8%) não manifestarem um dos sintomas clássicos da dengue, a febre. A inexistência de febre não é incomum, como observado por Tukasan e colaboradores (2017). Neste estudo retrospectivo, conduzido em São José do Rio Preto, São Paulo, foi demonstrado que cerca de 3% dos 30.670 pacientes com dengue confirmada por sorologia e/ou PCR não apresentaram febre. Além disso, estes autores observaram uma alta frequência de sintomas inespecíficos e brandos, com apenas 4% dos pacientes apresentando alguma sintomatologia hemorrágica. Ainda, outros estudos revelam também a alta prevalência de sintomatologia branda em pacientes brasileiros (CARDOSO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2001). Além disso, o fato de que as amostras neste estudo foram obtidas a partir de UPAs, pode estar relacionado à baixa incidência de sintomas hemorrágicos (6%) nos pacientes analisados.

Segundo a literatura, fatores como infecções prévias por sorotipo heterólogo do dengue, idade, background genético, doenças crônicas e fatores intrínsecos ao vírus podem estar associados com uma maior probabilidade de agravamento da doença (HALSTEAD et al., 1970; SIQUEIRA et al., 2005; STEPHENS, 2010; HTUN et al., 2015; COLOGNA & RICO-HESSE, 2003). No entanto, apesar de extensamente discutidos na literatura, o papel de cada um destes

fatores no desenvolvimento de formas graves da dengue não está completamente claro. Assim, no estudo, foram analisadas características como gênero, idade e exposição prévia à dengue dos pacientes que apresentaram sintomatologia hemorrágica (tabela 4.1.3).

Tabela 4.1.3 Avaliação de parâmetros populacionais em pacientes IgG⁺, NS1⁺ e/ou IgM⁺ para dengue com sintomatologia branda ou hemorrágica.

Parâmetro		Dengue + (n = 249)	Dengue + Hemorrágico (n = 15)	<i>p</i>
Sexo	<i>Masculino</i>	125 (50%)	7 (47%)	<i>1</i>
	<i>Feminino</i>	124 (50%)	8 (53%)	
Média de Idade		33 anos	24 anos	<i>0,034</i>
IgG +		(84) 34%	(6) 41%	<i>0,78</i>

Diversos trabalhos mostram que fatores como idade e infecção prévia por um sorotipo heterólogo de DENV podem estar relacionados a um agravamento da doença (HALSTEAD et al., 1970; HALSTEAD, 1980; THAI et al., 2011). Quando avaliados os perfis clínicos e epidemiológicos de pacientes com dengue, alguns estudos mostram que não há uma diferença de idade entre os pacientes com sinais clínicos clássicos e graves (CAVALCANTI et al., 2010; MONTENEGRO et al., 2006). E, de forma contrária, outros trabalhos indicam haver diferença na idade dos pacientes graves quando comparado aos que apresentam dengue sem sinais de alarme (SIQUEIRA et al., 2005; SANGKAWIBHA et al., 1984). Com esta avaliação, verificou-se que, a média de idade dos pacientes com sinais hemorrágicos foi menor do que o da população total com dengue (24 e 33 anos, respectivamente), podendo ser um indicativo para o agravamento da doença; os resultados mostram também, que não houve diferença entre a incidência destes sintomas de acordo com o gênero, com a relação homem/mulher na dengue branda, mantendo-se na proporção 1:1.

Além disso, observou-se um aumento na incidência de sintomatologia hemorrágica nos pacientes com sorologia positiva para o teste ELISA IgG (de 34% para 41%). A presença de IgG anti-dengue nestas amostras, coletadas com até 7 dias após o início dos sintomas, é um forte indicativo de uma infecção prévia por dengue. Segundo Guzman e Kouri (2003), pacientes com infecções primárias de dengue apresentam anticorpos IgG específicos a partir de 5 a 7 dias após o início da febre, com seu pico de detecção ocorrendo depois de duas semanas. Em contrapartida, em uma infecção secundária, anticorpos da classe IgG são produzidos no início da infecção, mantendo-se em níveis elevados durante várias semanas, e decaindo posteriormente. Desta forma, a detecção de IgG durante a fase aguda da dengue

permite a diferenciação presuntiva entre infecções primárias e secundárias (GUZMAN & KOURI, 2002). Assim, os dados sugerem o papel de infecção prévia no desenvolvimento de sintomatologia hemorrágica na dengue. No entanto, a especificidade dos anticorpos da classe IgG teriam que ser testadas para confirmação de infecção prévia por sorotipo heterólogo.

Ainda, foi verificada a presença de anticorpo IgG anti-dengue no soro dos pacientes NS1⁺ e/ou IgM⁺, e estes resultados foram comparados com os dados fornecidos da ficha SINAN, onde os pacientes relatavam uma infecção prévia por dengue (tabela 4.1.4).

Tabela 4.1.4: Relação entre número de pacientes que declaram na ficha SINAN que já tiveram dengue, e a sua positividade no teste ELISA IgG.

	Total (n)	IgG ⁺ (%)	IgG ⁻ (%)	<i>p</i>
Dengue prévia	23	8 (35%)	15 (65%)	<i>1</i>
Dengue primária	241	84 (35%)	206 (65%)	

Com esta avaliação, verificou-se que 15 dos 23 (65%) pacientes que afirmaram já terem tido a doença apresentaram sorologia negativa para o teste ELISA IgG, enquanto 84 dos 241 (35%) que afirmaram não ter tido a doença, tiveram resultados positivos para o teste. Desta forma, observa-se que a caracterização clínica da doença parece ser pouco discriminativa para o diagnóstico da dengue. Para melhor evidenciar este fenômeno, foram analisadas as similaridades de manifestações clínicas entre os pacientes com dengue, e aqueles que tiveram resultado negativo para a sorologia, indicando uma doença febril não-dengue (tabela 4.5). Com uma sensibilidade conjunta de até 97,8%, os testes ELISA NS1 e IgM anti-dengue são capazes de discriminar de forma eficiente dengue de outras doenças febris (ANAND et al., 2016; CHUA et al., 2011; PAL et al., 2014). Os resultados da Tabela 4.1.5 mostram uma similaridade entre os sintomas apresentados por pacientes com dengue e com outras doenças febris em Cambé. Deste modo, urge a necessidade da implementação de testes rápidos e eficientes para a discriminação da dengue e outras doenças.

Tabela 4.1.5. Sintomatologia de pacientes com dengue aguda (NS1 e/ou IgM⁺) e com outras doenças febris agudas não-dengue (NS1 e/ou IgM⁻)

Sintomas	NS1 ⁺ e/ou IgM ⁺ (n = 264) n (%)	NS1 ⁻ e IgM ⁻ (n=624) n (%)
Hemorragicos	15 (6%)	56 (9%)
Febre	230 (87%)	505 (81%)
Cefaléia	206 (78%)	511 (82%)
Dor Retro-Orbital	146 (55%)	343 (55%)
Mialgia	185 (70%)	461 (74%)
Artralgia	96 (39%)	237 (38%)
Diarréia	51 (19%)	205 (33%)
Exantema	18 (7%)	49 (8%)
Prostração	160 (61%)	386 (62%)
Dor abdominal/Náuseas	134 (51%)	315 (50%)

4.2 Análises laboratoriais

Inicialmente, com a avaliação de ELISA, foram selecionadas 264 amostras com sorologia indicativa de dengue em fase aguda (NS1⁺ e/ou IgM⁺). Em seguida, com o intuito de detectar a partícula viral nestas amostras, utilizou-se a técnica de isolamento viral em C6/36 (TESH, 1979). Esta avaliação permite a posterior caracterização do sorotipo viral circulante em Cambé, bem como a determinação da viremia dos pacientes. Assim, com o isolamento viral, foi possível detectar a presença da partícula viral em 145 das 264 amostras de soro (55%) (Fig. 4.2.1). A técnica de isolamento-viral é considerada a padrão-ouro para a confirmação da dengue, porém, a sua sensibilidade pode diminuir de acordo com os dias após a infecção e com a produção de anticorpos específicos (PEELING, et al., 2010; BLACKSELL et al., 2008; WANG & SEKARAN et al., 2010; VAJPAYEE et al., 2001). Desta forma, para melhor avaliar as condições que favorecem o isolamento, relacionamos os resultados de sorologia e isolamento viral nas amostras analisadas (tabela 4.2.1).

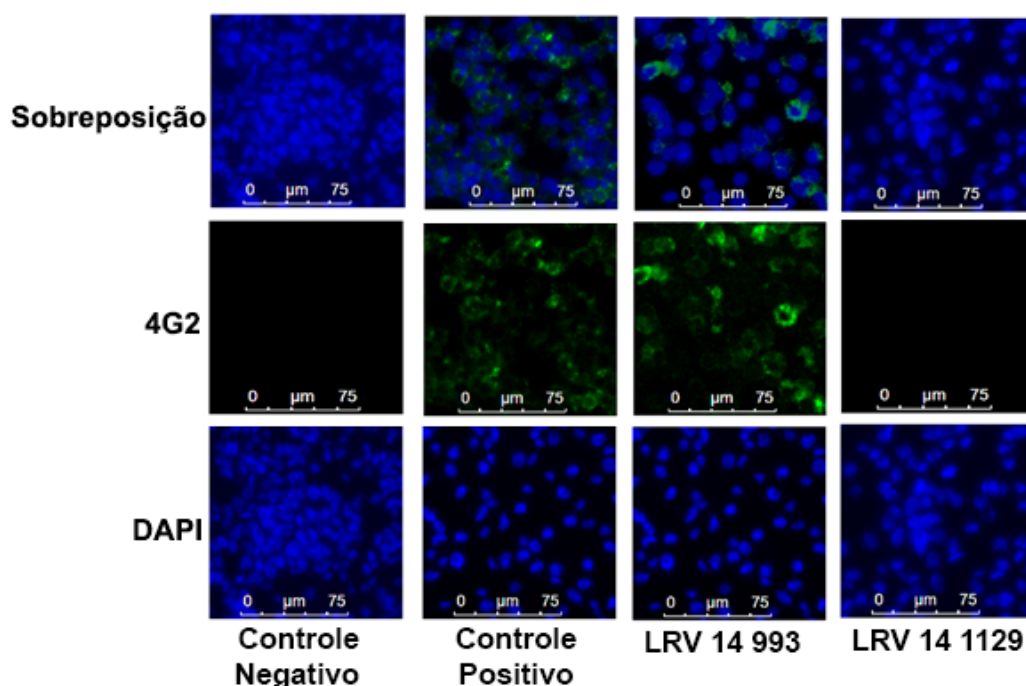


Fig. 4.2.1. Exemplo representativo de imunofluorescência indireta de amostras de pacientes positivos e negativos para a técnica. Fotomicrografia do controle negativo, controle positivo (DENV-4/TVP/360, MOI 0,1), além das amostras de pacientes com resultados negativo (LRV 14 1129) e positivo (LRV 14 993) no ensaio de imunofluorescência. Após 7-14 dias as células foram fixadas em metanol e imunomarcadas com DAPI (painel inferior), com anticorpo anti-flavivirus 4G2 + anti-camundongo conjugado com ALEXA 488 (painel do meio) e acima, a sobreposição dos dois filtros. Barra de escala: 75 µm. As imagens foram feitas em microscópio de fluorescência Nikon[®] Eclipse 80i.

Tabela 4.2.1. Correspondência entre os resultados das amostras nos ensaios de ELISA e de isolamento viral (IFI).

ELISA	ELISA Positivo (n)	Isolamento Positivo (n)	Correspondência (%)
NS1 ⁺ IgM ⁻	117	102	87,17%
NS1 ⁺ IgM ⁺	69	33	49,25%
NS1 ⁻ IgM ⁺	78	10	12,8%

Conforme a Tabela 4.2.1, pode-se observar que a presença de anticorpos da classe IgM específico contra DENV no soro dos pacientes parece reduzir a capacidade de isolar o vírus. Por outro lado, a detecção do antígeno NS1 correlaciona-se positivamente com o isolamento viral. Dentre as 186 amostras com presença de NS1 na sorologia, 135 (72%) delas apresentaram isolamento viral positivo. Ainda, em apenas 10 (12,8%) das amostras negativas para NS1 foi possível isolar o vírus. A NS1 é uma glicoproteína não-estrutural essencial para a replicação

viral (MACKENZIE et al., 1996). Adicionalmente, a correlação entre a presença da NS1 e a detecção da partícula viral já foi descrita por autores como Ahmed e Broor (2014), que observaram uma correspondência de 88,7% entre as duas técnicas. Em Cambé, nas amostras NS1⁺IgM⁻, foi verificada uma correspondência similar (87,17%). Em contrapartida, nas amostras positivas tanto para NS1 quanto para IgM, a eficiência do isolamento caiu para 49,25%. Assim, sugere-se que, conforme descrito por Jarman e colaboradores (2011), anticorpos IgM anti-DENV são capazes de se ligar às partículas virais infectivas, prevenindo a ligação e infecção das células de mosquito (neutralização viral). Ademais, o tempo de coleta da amostra é um fator importante a ser considerado nestas avaliações. Durante uma infecção aguda por DENV, a detecção de NS1 e da partícula viral normalmente ocorrem nas fases iniciais da doença, reduzindo consideravelmente após a produção de anticorpos específicos (ALCON et al., 2002). Por outro lado, em infecções por DENV, anticorpos IgM começam a ser detectados aproximadamente entre 3 a 5 dias após o início dos sintomas (VAUGHN et al., 1997; SA-NGASANG et al., 2006). Desta forma, a análise combinada dos dois testes (ELISA NS1 e IgM) é capaz de gerar diagnósticos presuntivos de dengue em diferentes estágios da doença (BLACKSELL et al., 2008; MS, 2016b; OMS, 2009).

Após a detecção da partícula viral, foram determinados os sorotipos de dengue circulantes em Cambé por meio de amplificação gênica. Alguns estudos sugerem que determinados sorotipos de dengue estão relacionados a diferentes manifestações da doença. Em Bangkok, por exemplo, Fried e colaboradores (2010) avaliaram que entre 1994 e 2006, as infecções causadas por DENV-2 tinham uma maior probabilidade de induzir casos graves de infecção quando comparado as infecções por DENV-1. De forma similar, Balsameda e colaboradores (2006) associaram o período de soroprevalência de DENV-2 na Nicarágua com o aumento de número de dengue grave e choque em crianças entre 1 a 9 anos. Além disso, esta caracterização é uma ferramenta epidemiológica importante, já que estudos mostram que a introdução de novos sorotipos em uma região pode resultar no aumento de casos de dengue e em um maior número de casos graves da doença (SANGKAWIBHA et al., 1984; NISALAK et al., 2003; GUZMÁN & KOURI, 2003). Assim, para a caracterização dos sorotipos circulantes em Cambé durante o período de estudo, utilizou-se o procedimento de RT-PCR *One Step* (Fig. 4.2.2). A técnica de RT-PCR com *primers* de regiões conservadas para DENV para diferenciação sorotípica foi inicialmente descrita por Lanciotti e colaboradores (1992). Desta forma, obtêm-se produtos de amplificação viral para os quatro sorotipos de DENV (482pb para DENV-1, 119 pb para DENV-2, 290 pb para DENV-3 e 389 pb pra DENV-4).

Para este estudo, foi utilizado o protocolo adaptado de forma *One Step*, ou seja, com a geração do cDNA e amplificação por PCR ocorrendo em uma única reação (MISHRA, et al., 2011).

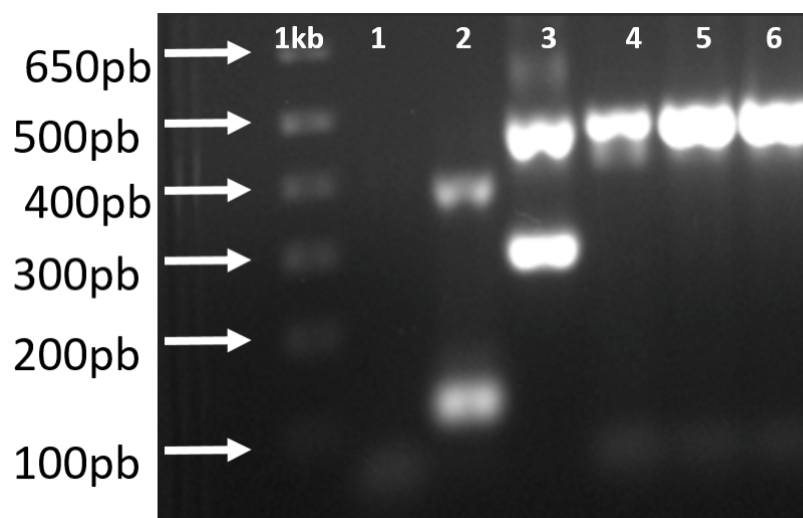


Fig. 4.2.2 Resultado da reação de RT-PCR *One-Step* para sorotipagem das amostras com isolamento viral positivo. Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em TBE) apresentando os resultados de amplificação do controle negativo (Água (1)), e dos controles positivos DENV 4-2 (2) (mistura de RNA controle de DENV-2/BR/01-01 e DENV-4/TVP/360, 119pb e 389, respectivamente) e DENV 1-3 (3) (mistura de RNA de DENV-1/BR/90 e DENV-3/BR/97-04, 482pb e 290pb, respectivamente). Adicionalmente, três amostras positivas para DENV-1 estão representadas no gel de agarose (LRV 14 1173 (4), LRV 14 1180 (5) e LRV 14 1166 (6)). Como controle de massa molecular foi utilizado o ladder 1Kb Plus (1 kb) (ThermoFisher Scientific[®]).

A amplificação gênica por RT-PCR *One Step* permitiu definir o sorotipo viral em 138 das 145 amostras positivas no isolamento viral. Tendo em vista que as 7 amostras negativas apresentaram sorologia compatível à dengue e também foram positivas no isolamento viral, estas passaram pela técnica de PCR com *primers* que detectam infecções por *Flavivirus*, conduzido pelo Laboratório de Referência em Virologia (ICC/FIOCRUZ), seguido por sequenciamento realizado pela empresa Macrogen[®]. Estes novos ensaios permitiram confirmar 2 das 7 amostras como sendo DENV-1. Ainda, para as cinco amostras restantes, novos testes serão realizados para se definir o vírus ou sorotipo infectante. Desta forma, os resultados mostram a soroprevalência do DENV-1 na região de Cambé, com 137 amostras positivas para este sorotipo viral, e 1 para o DENV-4. Estes dados confirmam os resultados apresentados pelo Ministério da Saúde (2015), cujo boletim epidemiológico evidenciou que no ano de 2014, 98,9% das amostras de dengue que tiveram o sorotipo viral determinado pelos Laboratórios Centrais do Paraná eram DENV-1, enquanto 1,1% eram DENV-4. Notavelmente, no Estado do Paraná, desde a primeira epidemia de dengue registrada em 1995, já foi registrada a

circulação de DENV-1, DENV-2 e DENV-4, mas sempre com predominância do sorotipo 1 (PAULA, 2005, MELO et al., 2014).

Adicionalmente, com a confirmação de uma infecção por DENV-4, foi realizado o sequenciamento do genoma inteiro deste vírus, seguido por análises filogenéticas. Assim, foi possível determinar que o isolado é pertencente ao genótipo 2, e apareceu na região 5 anos após o registro da entrada deste sorotipo e genótipo no nordeste brasileiro (KUCZERA, et al., 2016). Além disso, este paciente apresentava sintomas clássicos de dengue, bem como sintomatologia hemorrágica, incluindo petéquias e gengivorragia, e uma viremia maior do que a média detectada ($3,4 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL para o paciente, sendo que nos 137 pacientes infectados com DENV-1 a viremia média foi de $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL) (KUCZERA, et al., 2016). A viremia na dengue parece ser um preditor de gravidade, e estudos que utilizam técnicas moleculares para medir a carga viral plasmática evidenciam que pacientes com sinais hemorrágicos podem apresentar maior viremia do que pacientes com sintomatologia branda (LIBRATY et al., 2002; VAUGHN et al., 2000). Sabendo disso, após a confirmação das amostras com isolamento viral positivo, foi realizada a quantificação da viremia no soro dos pacientes. Para tanto, realizou-se a técnica de titulação viral por imunodeteção de unidades formadoras de foco em células de *Aedes albopictus* C6/36, determinando a viremia dos 138 pacientes positivos nas técnicas de isolamento viral e RT-PCR *One Step* (Fig. 4.2.3).

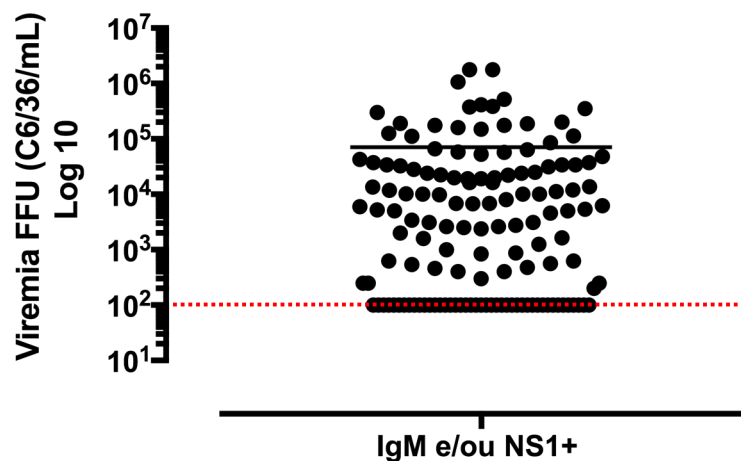


Fig. 4.2.3: Quantificação da viremia nos pacientes com isolamento viral positivo. A técnica de titulação por imunodeteção de foco de infecção foi utilizada para determinar a viremia no soro dos pacientes positivos para as técnicas de isolamento viral e RT-PCR *One Step*. Para este ensaio, o limite de detecção foi de 100 FFU_{C6/36}/mL, indicado pela linha vermelha no gráfico. Assim, 42 das 138 amostras apresentaram viremia menor ou igual a 100 FFU_{C6/36}/mL. Com esta avaliação, determinou-se que a viremia média dos pacientes ficou em $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL.

Segundo dados obtidos a partir da técnica de titulação viral, a viremia média dos pacientes foi de $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL (Fig. 4.2.3). Em humanos, a viremia na dengue pode partir desde níveis quase indetectáveis pela técnica (10^3), quando medida por 50% de dose infectante para mosquitos (MID₅₀), a até $10^{8.5}$ MID₅₀ (ROSEN & GUBLER, 1974; GUBLER et al., 1981). Além da determinação da viremia média dos pacientes, observou-se a cinética desta conforme os dias após o início dos sintomas (Fig. 4.2.4). Para tanto, foram utilizadas as informações obtidas a partir das fichas SINAN, onde os pacientes informaram há quantos dias os sintomas apresentados se iniciaram. No entanto, devido a ausência desta informação em algumas fichas, apenas 95 amostras de pacientes foram consideradas para esta análise. Assim, verificou-se que 74% dos pacientes entre 0 e 3 dias após início dos sintomas apresentaram viremia maior que 100 FFU_{C6/36}/mL (Fig. 4.2.4). Neste período, a viremia média ficou em $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL, diminuindo para $1,3 \times 10^3$ FFU_{C6/36}/mL nos dias seguintes, no entanto, esta queda não foi significativa estatisticamente. A literatura mostra tanto em modelo murino imunodeficiente, quanto pela observação de pacientes, que os títulos virais se encontram elevados no início da doença, e reduzem entre três a quatro dias após o início dos sintomas, especialmente devido ao surgimento da resposta imunológica mediada por anticorpos (SCHUL et al., 2007; DUYEN et al., 2011).

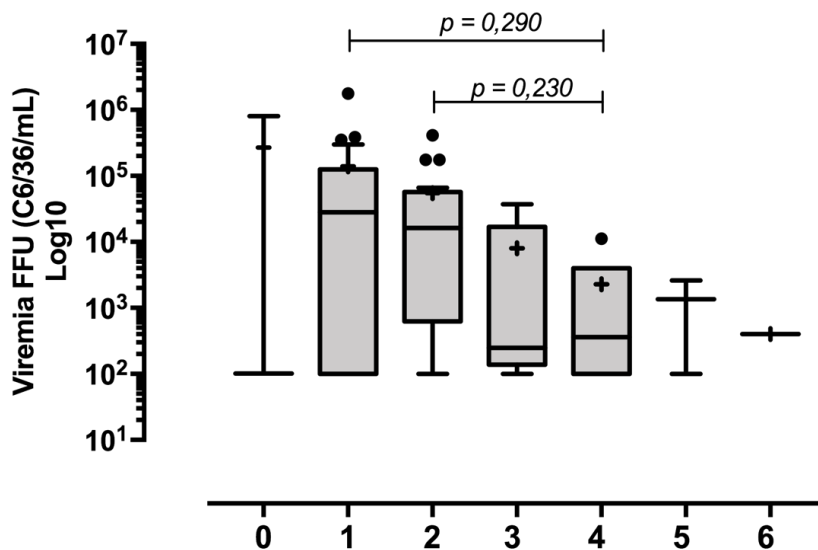


Fig. 4.2.4 Viremia dos pacientes com isolamento viral positivo com relação ao tempo (dias) após o início dos sintomas. A técnica de titulação tem para esta determinação o limite de detecção de 100 FFU_{C6/36}/mL. As amostras deste gráfico não foram obtidas através de coleta seriada, sendo que cada ponto indica um único paciente (n=95). A análise estatística foi realizada a partir do teste Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). “+” representa a média e o traço, a mediana, e os *outliners* estão representados por pontos.

Uma das teorias sobre a imunopatogênese da dengue correlaciona o aumento da gravidade em casos de dengue secundária por sorotipo heterólogo com o fenômeno ADE (HALSTEAD et al., 1970). Segundo a teoria de ADE, os anticorpos de memória de uma infecção prévia por sorotipo heterólogo podem apresentar capacidade subneutralizante e favorecer a entrada do novo sorotipo viral na célula. Desta forma, o vírus é internalizado e, como não foi neutralizado, é capaz de replicar-se, aumentando a carga viral circulante (HALSTEAD et al., 1970). Ainda, alguns autores sugerem que este aumento da replicação viral é capaz de resultar em uma maior ativação celular, o que pode provocar uma resposta inflamatória desregulada e danosa (KATZELNICK et al., 2017; UBOL et al., 2010). Deste modo, avaliou-se a carga viral de pacientes com dengues primária e secundária, sendo definidos como pacientes com dengue secundária aqueles que apresentavam sorologia indicativa de dengue em fase aguda (NS1 e/ou IgM⁺), acompanhada de sorologia positiva para IgG, até 4 dias após o início dos sintomas. Este critério foi definido a partir de revisão de literatura, e baseou-se especialmente no que foi observado por Vasquez e colaboradores (2007), durante a epidemia de 2001 em Cuba, os quais determinaram que os níveis de IgG em infecções primárias só eram detectáveis a partir de 5 dias após o início dos sintomas, e a partir do primeiro dia em infecções secundárias (LIMA, et al., 2012; CUZZUBO, et al., 1999; SA-NGASANGA et al., 2005) (Fig. 4.2.5).

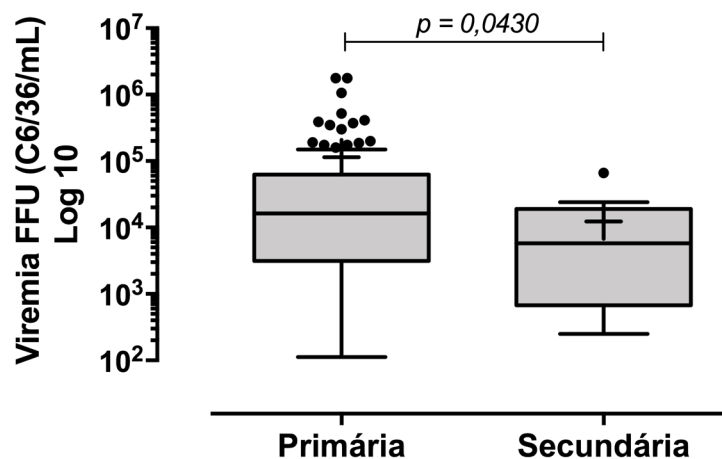


Fig. 4.2.5. Carga viral no soro de pacientes com dengue aguda (NS1 e/ou IgM⁺) primária ou secundária. A partir da viremia do soro de pacientes classificados pelo estudo como positivos para infecções por dengue aguda, verificou-se uma diferença significativa entre aqueles IgG negativos (infecção primária; n=84), quando comparado aos pacientes IgG positivos, com até 4 dias de sintomas (infecção secundária; n=12). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). “+” representa a média e o traço, a mediana, e os *outliners* estão representados por pontos.

O papel da viremia na dengue secundária e no agravamento da doença ainda não é bem definido. Alguns autores sugerem que a gravidade da doença vista em infecções secundárias por sorotipo heterólogo é resultado de um aumento da viremia, favorecido pelo fenômeno ADE (VAUGHN et al., 2000; WANG et al., 2006). No entanto, outros autores já observaram tanto em modelo de infecção por DENV em chimpanzés, quanto em pacientes naturalmente infectados, que infecções secundárias heterólogas resultam na redução na carga viral circulante (SCHERER et al., 1978; DUYEN et al., 2011; SABIN et al., 1950). Os resultados obtidos aqui mostram uma redução na viremia dos pacientes que apresentaram o anticorpo IgG até 4 dias após o início dos sintomas (dengue secundária). No entanto, como não foi realizado um ensaio de soroneutralização, é impossível afirmar se este anticorpo é proveniente de uma infecção prévia por sorotipo heterólogo ou homólogo. Além disso, na dengue, a infecção por um determinado sorotipo pode promover uma proteção cruzada transiente a infecções seguintes, sendo dependente da concentração sérica do anticorpo, fator que também não foi avaliado neste estudo (ANDERSON et al., 2014; KATZELNICK et al., 2016; OLKOWSKI et al., 2013). Ademais, Duyen e colaboradores (2011) sugerem cautela na interpretação deste tipo de análise, já que o ADE pode ocorrer antes mesmo do início dos sintomas, com o pico de viremia anterior à fase febril.

A dengue apresenta um amplo espectro de sintomatologia, sendo que os casos graves da doença são caracterizados por extravasamento plasmático, trombocitopenia e hemorragia (OMS, 2009). Os fatores envolvidos no agravamento da doença ainda não estão bem esclarecidos, no entanto, a resposta imunológica do hospedeiro parece apresentar um papel importante para o seu desenvolvimento. Isto é evidenciado por estudos que mostram que o extravasamento plasmático observado nos casos de dengue grave pode ser consequência de uma disfunção endotelial provocada por mediadores inflamatórios (NIMMANNITYA, 1987; BHAMARAPRAVATI, 1989; KURANE & ENNIS, 1994). Desta forma, diversos trabalhos procuram correlacionar a ativação imunológica provocada pela infecção por DENV com o prognóstico da doença (GUERRERO, et al., 2013; BRAISIER, et al., 2012; MALAVIGNE, et al., 2013).

A literatura indica que as citocinas produzidas por células T CD4⁺ de perfil Th1 podem estar associadas a um perfil protetor na dengue, enquanto a troca para o perfil Th2 pode correlacionar-se a um agravamento da patologia (CHATUVERDI, 2009; GREEN et al., 1999b). O perfil Th1 está envolvido na resposta à patógenos mediada por células, e é caracterizado pela presença das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (CHEN et al., 2005; DE

LA CRUZ HERNÁNDEZ et al., 2014; KUMAR et al., 2012). Já a resposta de perfil Th2 é mediada predominantemente por anticorpos, e é caracterizada pelos mediadores IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (BRAISIER et al., 2012; BUTTHEP et al., 2012; CHEN et al., 2005). Além disso, as células T CD4⁺ também podem gerar um padrão de inflamação neutrofilico, o qual distingue-se pela produção de IL-17, classificado como Th17 (PELLETIER et al., 2010). Na dengue, este perfil parece estar associado com casos mais graves da doença, e correlaciona-se com efusão pleural e problemas respiratórios em crianças e adultos infectados pelo DENV (FURUTA et al., 2012; JAIN et al., 2013). O IFN- α , um dos pilares da resposta imune inata em infecções virais, é um mediador-chave para controle da replicação e proteção na dengue, visto que camundongos *knockout* para os receptores IFN α / β desenvolvem casos graves da doença após o desafio com DENV (JOHNSON & ROEHRIG, 1999; SHRESTA et al., 2004). Além disso, quimiocinas também podem apresentar um papel importante no prognóstico da doença. A MCP-1, por exemplo, é um fator quimiotático para monócitos, e, em infecções pelos vírus chikungunya e dengue, pode correlacionar-se positivamente com extravasamento plasmático e gravidade da doença (DESHMANE et al., 2009; SILVA et al., 2016; LEE et al., 2006).

Deste modo, para a caracterização da resposta inflamatória em pacientes com dengue em Cambé, analisamos a produção de algumas citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) e Th17 (IL-17A), bem como de resposta imune inata (IFN- α) e quimiocina (MCP-1) em amostras de soro de pacientes com dengue que tiveram a viremia determinada (138 pacientes). Além disso, a dosagem destes mediadores foi mensurada em pacientes que apresentaram sorologia negativa, mas com sintomatologia compatível à dengue (classificados como com doença febril não-dengue, ou DFND, n = 20), e de voluntários com sorologia negativa para os testes ELISA NS1 e IgM que não apresentavam sintomatologia (“saudáveis”, n=20) (Fig 4.2.6). Adicionalmente, para evidenciar em quais momentos da infecção as diferenças de produção ocorreram, os níveis de citocinas foram estratificados de acordo com os dias após o início dos sintomas (Fig. 4.2.7, 4.2.8, 4.2.9). Para esta avaliação, foram utilizados os dados da ficha SINAN, assim, devido a falta de informação em algumas fichas, apenas 95 amostras de dengue foram analisadas, enquanto para DFND, foram consideradas 17 amostras.

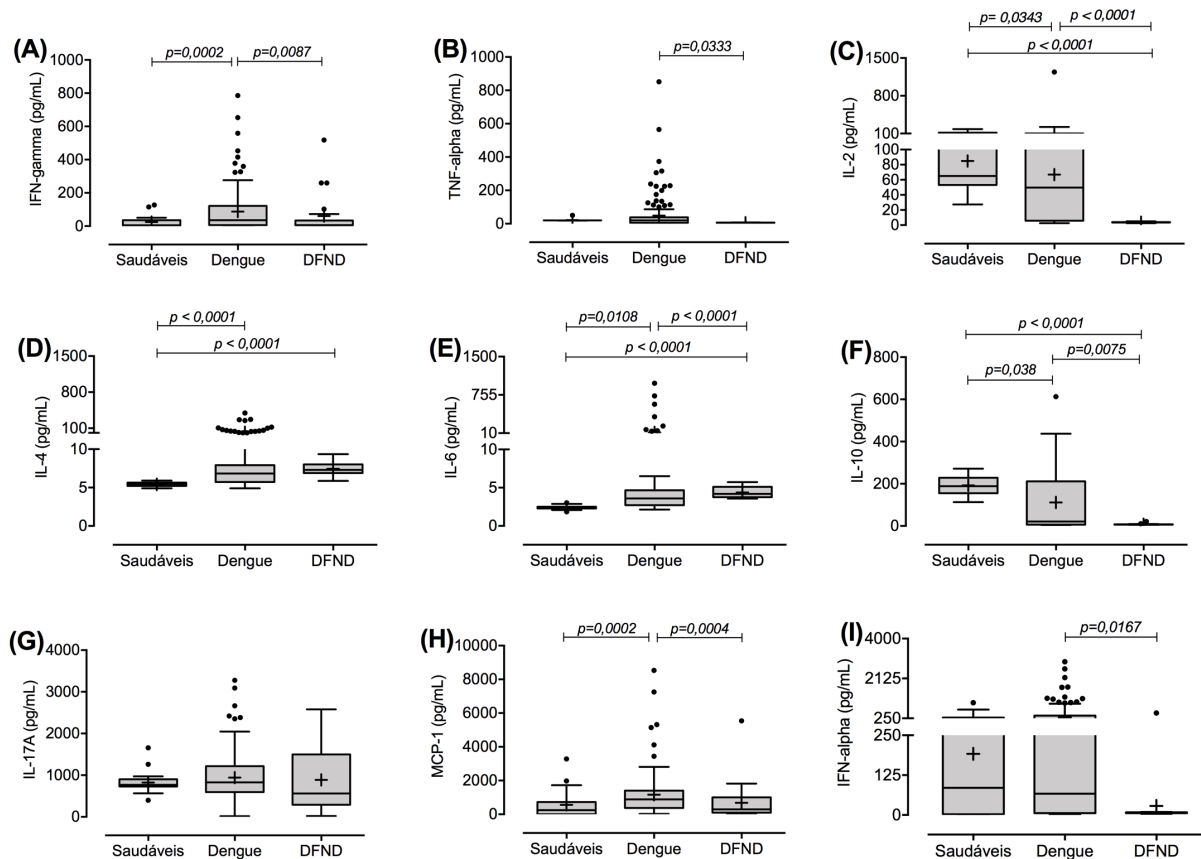


Fig. 4.2.6 Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1 e IFN- α em pacientes com dengue, voluntários saudáveis e pacientes com outras doenças febris não-dengue (DFND). Para esta análise, foram dosadas as citocinas no soro de pacientes com isolamento viral positivo (n = 138), de voluntários saudáveis, com sorologia negativa (NS1 e IgM), e que não apresentavam sintomatologia compatível (n = 20), bem como de pacientes com suspeita clínica de dengue, mas com sorologia negativa (NS1 e IgM) (n = 20). A produção das citocinas IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IL-17A (G), MCP-1 (H) e IFN- α (I) foi analisada pela técnica de *cytometry bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir do teste Mann-Whitney pelo GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). “+” representa a média e o traço, a mediana, e os *outliners* estão representados por pontos.

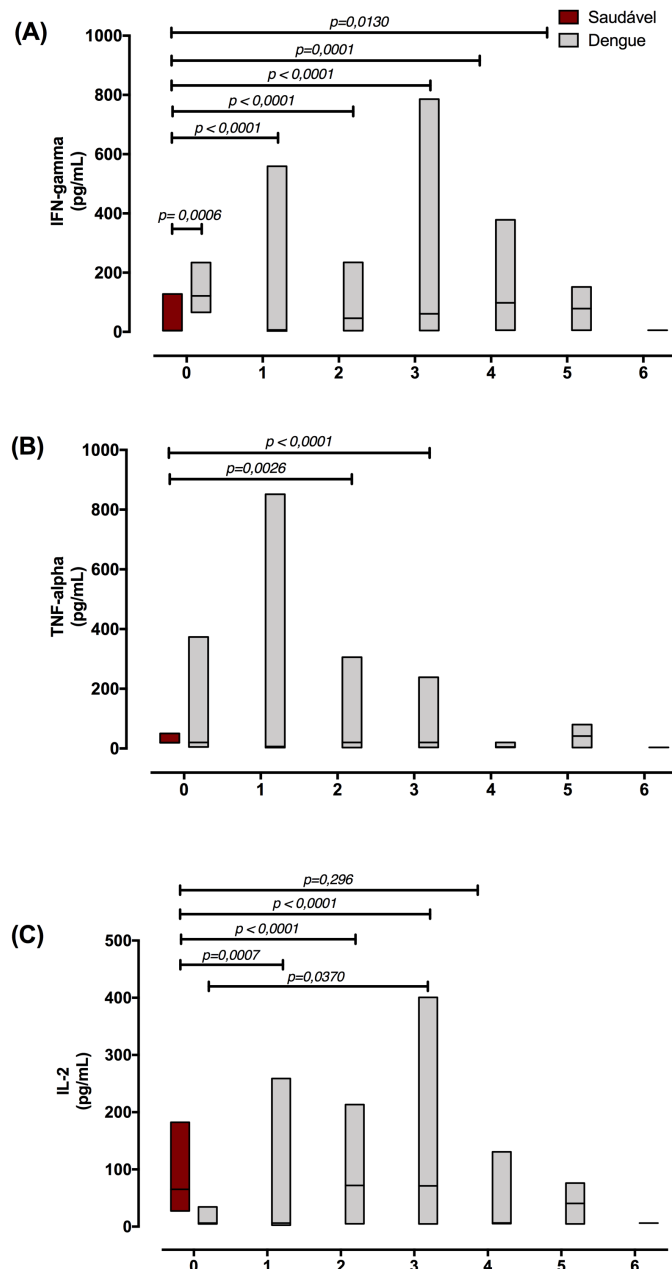


Fig. 4.2.7. Produção de citocinas de perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-2) em voluntários saudáveis, pacientes com dengue e pacientes com doença febril não-dengue de acordo com o tempo pós-início de sintomas. Para esta análise, foram dosadas as citocinas no soro de pacientes com dengue confirmada por isolamento e com ficha SINAN completa (n = 95), voluntários saudáveis (n = 20). A barra violeta à esquerda representa a dosagem de voluntários saudáveis, enquanto as barras cinza representam a dosagem de citocinas dos pacientes com dengue conforme os dias de sintomas (0 a 6 dias), sendo que as linhas negras representam a mediana. A produção de IFN- γ (A), TNF- α (B) e IL-2 (C) foi analisada pela técnica de *cytometric bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir do teste Mann-Whitney através do programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). O traço nas barras representa a mediana.

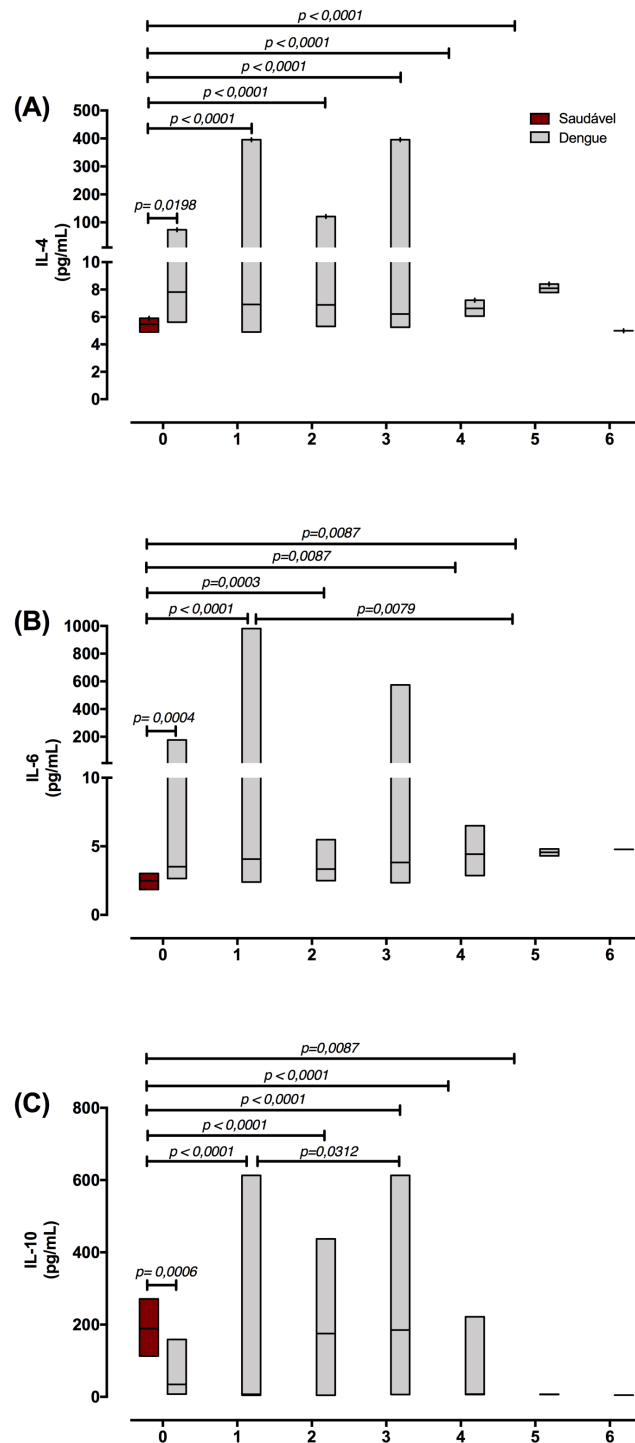


Fig. 4.2.8. Produção de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) em voluntários saudáveis, pacientes com dengue e pacientes com doença febril não-dengue. Para esta análise, foram dosadas as citocinas no soro de pacientes com dengue confirmada por isolamento e com ficha SINAN completa (n = 95), voluntários saudáveis (n = 20). A barra violeta à esquerda representa a dosagem de voluntários saudáveis, enquanto as barras cinza representam a dosagem de citocinas dos pacientes com dengue conforme os dias de sintomas (0 a 6 dias), sendo que as linhas negras representam a mediana. A produção de IL-4 (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) foi analisada pela técnica de *cytometric bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir do teste Mann-Whitney através do programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). O traço nas barras representa a mediana.

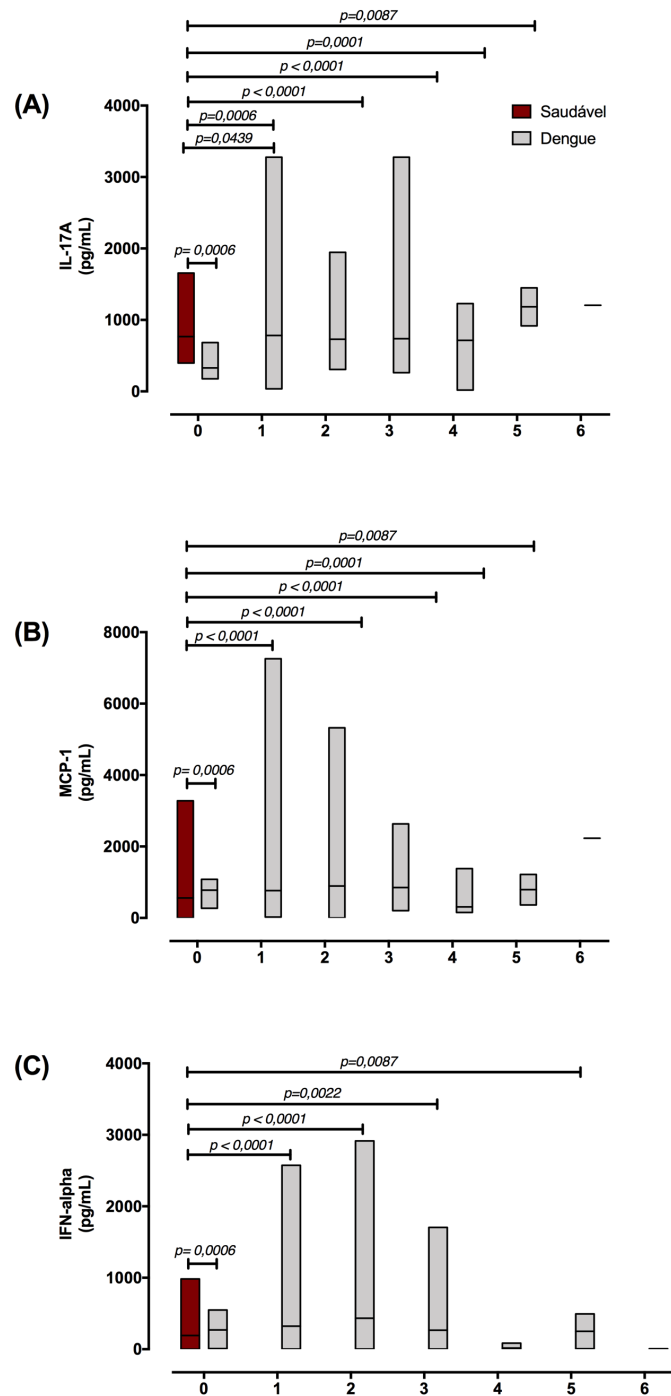


Fig. 4.2.9. Produção de citocina de perfil Th17 (IL-17A), quimiocina (MCP-1) e resposta imune inata (IFN- α), em voluntários saudáveis, pacientes com dengue e pacientes com doença febril não-dengue. Para esta análise, foram dosadas as citocinas no soro de pacientes com dengue confirmada por isolamento e com ficha SINAN completa (n = 95), voluntários saudáveis (n = 20). A barra violeta à esquerda representa a dosagem de voluntários saudáveis, enquanto as barras cinza representam a dosagem de citocinas dos pacientes com dengue conforme os dias de sintomas (0 a 6 dias), sendo que as linhas negras representam a mediana. A produção de IL-17A (A), MCP-1 (B) e IFN- α (C) foi analisada pela técnica de *cytometric bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir do teste Mann-Whitney através do programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). O traço nas barras representa a mediana.

Desta forma, foram observadas diferenças na dosagem sérica de diferentes citocinas entre pacientes com dengue e voluntários saudáveis. O IFN- γ , por exemplo, apresentou flutuações na sua produção durante o curso da doença, mas, de forma geral, encontrou-se significativamente elevado em pacientes com dengue quando comparado a voluntários saudáveis (Fig. 4.2.6 A e 4.2.7 A). A resposta mediada por IFN- γ é essencial para a ação contra infecções intracelulares, e este mediador pode ser produzido tanto por células NK quanto por células T CD8+ e CD4+ de perfil Th1 (SCHOENBORN & WILSON, 2007). Na dengue, sua produção normalmente é elevada, tanto em casos brandos quanto graves (CHATUVERDI, et al., 1999; RESTREPO, et al., 2008; BRAISIER et al., 2011). Já a dosagens de TNF- α entre os pacientes e voluntários saudáveis foram similares, enquanto para a IL-2, foi observada uma menor produção desta naqueles com a doença (Fig. 4.2.6 B e C). O TNF- α apresenta uma atividade antiviral importante, e o seu papel envolve o recrutamento e ativação de APCs e células NK (HERBEIN & O'BRIEN, 2000). A infecção por DENV normalmente estimula a sua produção; no entanto, quando em excesso, o TNF- α é capaz de provocar dano endotelial mediado por óxido nítrico (HOBBER et al., 1996; INYOO et al., 2017; YEN et al., 2008). A IL-2 é descrita como um fator estimulatório para o desenvolvimento e diferenciação de células T, e é produzida predominantemente por este tipo celular (TANIGUCHI et al., 1983). Na dengue, níveis elevados de IL-2, especialmente em suas fases iniciais, podem estar relacionados à gravidade da doença (SENARATNE et al., 2016; GREEN et al., 1999a).

Já para as citocinas de perfil Th2, tanto a IL-4, quanto a IL-6, encontraram-se elevadas em pacientes com dengue (Fig 4.2.6 D e E). Estas diferenças são especialmente evidenciadas nos primeiros 2 dias de doença, sendo que no quarto, as dosagens reduzem a níveis próximos aos encontrados nos voluntários saudáveis (Fig 4.2.8 A e B). A IL-6 é produzida por diversos tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T e B, neutrófilos e células endoteliais (AKIRA et al., 1993). Ainda, devido a sua característica pirogênica, a IL-6 é normalmente encontrada na fase inicial da dengue (PINTO et al., 1999; HOBBER et al., 1993). Porém, caso os níveis de IL-6 mantenham-se altos, ela pode correlacionar-se ao agravamento da doença (HOBBER et al., 1993; JUFFRIE et al., 2001; RESTREPO et al., 2008). A IL-4 é a citocina-chave para o direcionamento da resposta Th2, e é capaz de contra-regular a resposta inflamatória estimulada pelo perfil Th1 (YOSHIMOTO & WE et al., 1994; FERRICK et al., 1995). Seu papel na dengue ainda não é bem definido, podendo encontrar-se associada ou não a casos de dengue grave (CHATUVERDI et al., 2000; GREEN et al., 1999b).

Adicionalmente, a produção de IL-10 foi maior nos voluntários saudáveis do que nos pacientes com dengue (Fig. 4.2.6 F). A IL-10 apresenta atividade anti-inflamatória e, a sua produção exacerbada em infecções por DENV pode reduzir a capacidade de controle da replicação viral, resultando em um agravamento da doença (GREEN, et al., 1999b; ABHISHEK, et al., 2017).

Finalmente, foram dosadas também citocinas de perfil Th17 (IL-17A), de resposta imune inata (IFN- α) e quimiocina (MCP-1) nos diferentes grupos avaliados (Fig. 4.2.6 G, H e I e Fig. 4.2.9). Para a IL-17A e o IFN- α não foram observadas produções diferenciais entre os pacientes com dengue e voluntários saudáveis (Fig. 4.2.6 G e I). Por outro lado, houve um aumento na produção do MCP-1 nos pacientes com dengue quando comparada à dosagem de voluntários saudáveis (Fig. 4.2.6 H). O MCP-1 é um quimioatrativo de macrófagos/monócitos, e é produzido por diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, fibroblastos, e células de microglia (GU et al., 1997; BROWN et al., 1992; DOUGLAS et al., 1997; YOSHIMURA & LEONARD, 1990). Assim, devido a esta função, a produção deste mediador é essencial para a vigilância imunológica tecidual e controle de infecções virais (SIERRA et al., 2010).

Além das avaliações entre pacientes com dengue e voluntários saudáveis, foram consideradas também as dosagens de citocinas entre pacientes com dengue e com DFND. Notavelmente, em nosso estudo, foi observada uma maior produção de IL-2, IL-10 e IFN- α nos pacientes com dengue (Fig. 4.2.6 C, D, E, F e I). Isto sugere que a infecção por DENV pode gerar uma ativação imunológica distinta ao de outras infecções febris. No entanto, o nosso estudo apresenta limitações, por exemplo, o pequeno número de pacientes avaliados com DFND e a não determinação do agente etiológico destas infecções.

Adicionalmente, alguns autores sugerem que a expressão diferencial de mediadores inflamatórios na dengue pode resultar em diferentes manifestações da doença (KUMAR et al., 2012; ABHISHEK et al., 2017; BRAISIER et al., 2010; BOZZA et al., 2008). Desta forma, em nosso trabalho, foram avaliadas a produção de citocinas entre pacientes com manifestações hemorrágicas ou não (Fig. 4.2.10), além da expressão de mediadores pirogênicos (TNF- α e IL-6) nos pacientes que apresentaram ou não febre (4.2.11).

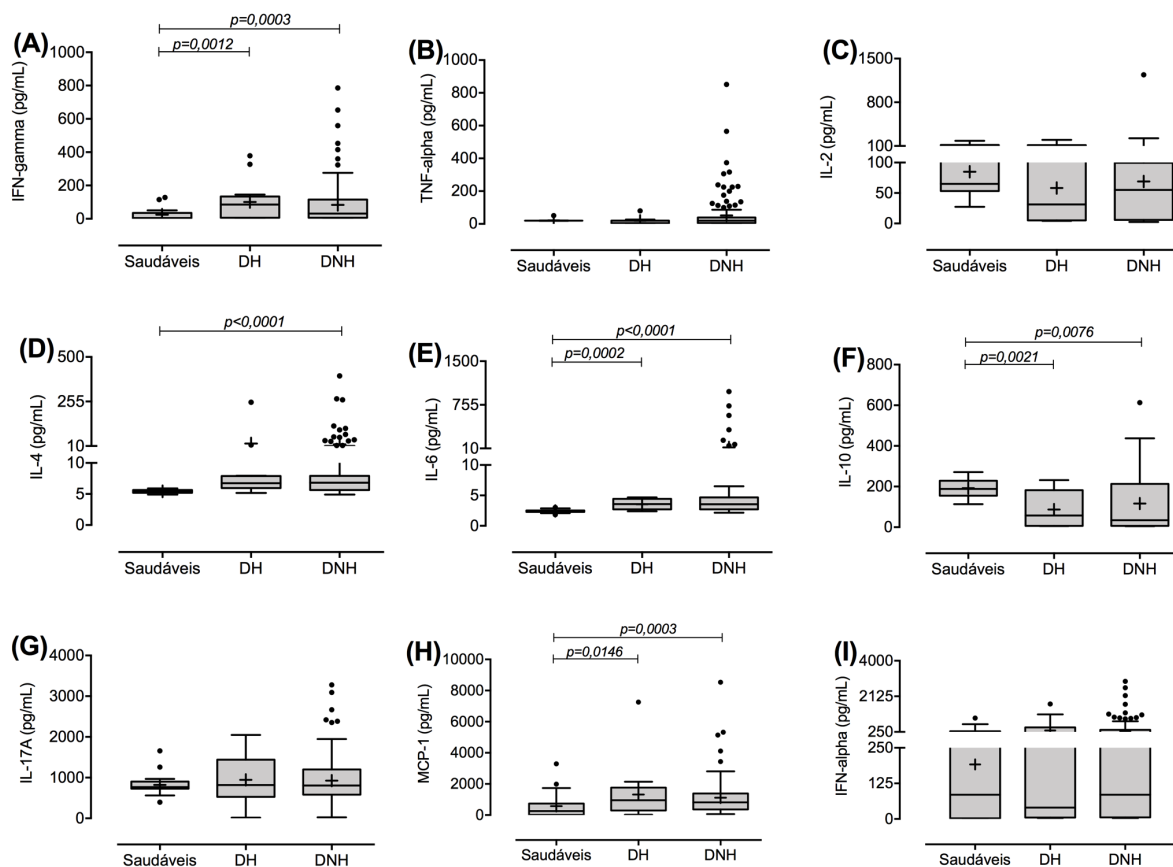


Fig. 4.2.10. Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1 e IFN- α entre voluntários saudáveis e pacientes com dengue que apresentaram ou não sintomatologia hemorrágica. Para esta análise, foram dosadas as pacientes saudáveis, com sorologia negativa (NSI⁻ e IgM⁻) e que não apresentavam sintomatologia compatível (n = 20), bem como pacientes com suspeita de dengue, mas com sintomatologia hemorrágica (n = 16), e sem sintomatologia hemorrágica (n = 122). A produção das citocinas IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IL-17A (G), MCP-1 β (H) e IFN- α (I) foram analisadas pela técnica de *cytometry bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir Mann-Whitney pelo programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). “+” representa a média e o traço, a mediana, e os *outliners* estão representados por pontos.

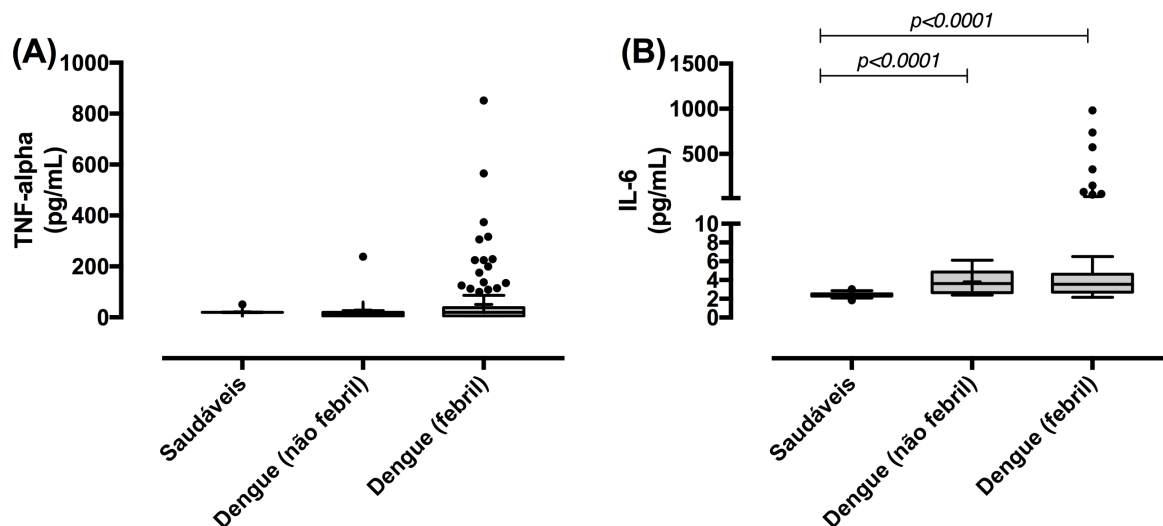


Fig. 4.2.11 Produção de TNF- α e IL-6 entre voluntários saudáveis e pacientes com dengue que apresentaram ou não a febre. Para esta análise, foram dosadas as citocinas de voluntários saudáveis, com sorologia negativa (IgM⁻ e NS1⁻) e sem sintomatologia compatível (20), pacientes com dengue que não apresentaram quadro febril (14), bem como de pacientes com dengue febris (124). A produção das citocinas TNF- α (A) e IL-6 (B) foram analisadas pela técnica de *cytometry bead array* em citômetro FACSCanto II da (BD[®]). A análise estatística foi feita a partir do teste *t' students unpaired* pelo programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA). “+” representa a média e o traço, a mediana, e os *outliners* estão representados por pontos.

Assim, para os pacientes com diferentes apresentações clínicas, dengue com ou sem sinais hemorrágicos, não foi observada uma produção diferencial entre as citocinas analisadas (Fig. 4.2.11). Este fenômeno pode ter sido consequência do baixo número de pacientes com sinais hemorrágicos (n=15), associado à variação de produção de citocinas observada neste grupo. De forma complementar, em nosso estudo, foi observado um perfil misto Th1/Th2 nos pacientes com dengue, marcado pela produção elevada dos mediadores-chave IFN- γ e IL-4 (Fig. 4.2.7). A citocina IL-4, de perfil Th2, inibe a expressão de citocinas Th1, e de forma contrária, o IFN- γ reduz a expressão de citocinas de perfil Th2 (MANEEKAN et al., 2013). Alguns autores destacam que uma resposta exacerbada direcionada ao perfil Th1, principalmente nos primeiros dias de sintomas, resulta em um estímulo pró-inflamatório desregulado capaz de gerar manifestações graves na dengue (KURANE et al., 1993; KURANE et al., 1991). Assim, conclui-se que, apesar do papel protetor das citocinas de perfil Th1 nas infecções por DENV, o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 podem ser essenciais para o não desenvolvimento da imunopatologia, vide que grande parte dos pacientes com dengue de nosso estudo apresentaram sintomatologia branda.

Em relação à febre, as citocinas mais bem caracterizadas com ação pirogênica são TNF- α , IL-6 e IL-1 β , sendo que a última não foi avaliada neste trabalho (CARTMELL et al., 2000; LESNIKOV et al., 1991; DINARELLO et al., 1986). A febre é um sintoma frequente em infecções de diferentes etiologias, e estudos mostram que o aumento de temperatura pode elevar substancialmente o potencial fagocítico de células dendríticas, bem como aumentar a produção de IFN- α em resposta a infecções virais (MANZELLA & ROBERTS, 1979; KNIPPERTZ et al., 2011). Nos pacientes analisados neste estudo, foi observada uma tendência a uma menor produção de IL-6 e TNF- α em pacientes que não manifestaram a febre, mas que não foi significativa estatisticamente. Ainda, estes dados confirmam a associação destas citocinas, com a febre em pacientes com dengue.

Finalmente, analisou-se a correlação de *Pearson* entre a viremia e a resposta inflamatória dos indivíduos com dengue (Fig. 4.12). Para tanto, foram selecionados apenas os pacientes com viremia acima do limite de detecção da técnica (n = 96), as quais foram correlacionadas com cada uma das citocinas/quimiocina analisada.

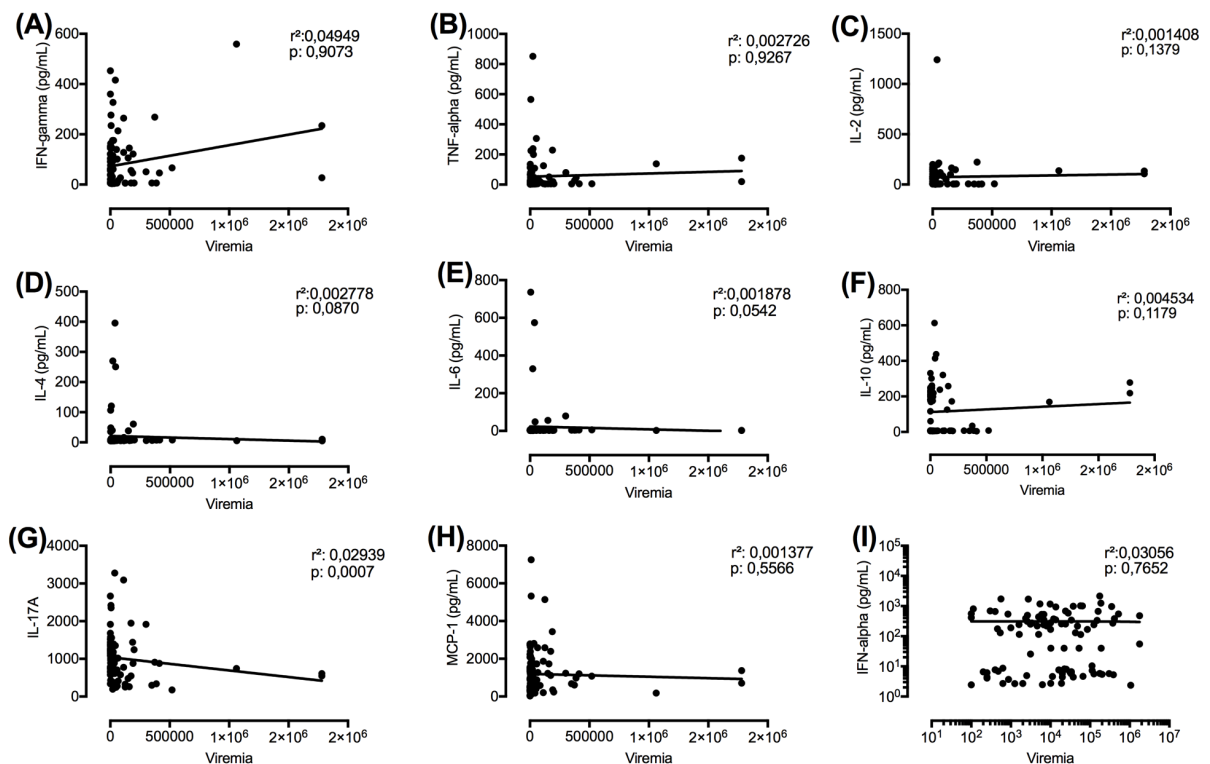


Fig. 4.2.12. Correlação entre viremia e as citocinas IFN- γ , TNF- α IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1 e IFN- α . Para esta análise, foram correlacionadas a viremia dos pacientes acima do limite de detecção (n= 96) e as citocinas IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-2 (C), IL-4 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), IL-17A (G), MCP-1 β (H) e IFN- α (I). Para tanto, utilizou-se a análise estatística de *Spearman* pelo programa GraphPad[®] Prism (San Diego, EUA).

Apesar de diversos trabalhos implicarem a correlação entre a carga viral de DENV e a resposta inflamatória, este fenômeno não está bem esclarecido (VAUGHN et al., 2000; WANG et al., 2006; DUYEN et al., 2011). Autores como Tang e colaboradores (2010) encontraram uma correlação positiva entre a viremia de pacientes com DENV e a produção IFN- α , no entanto, trabalhos que efetuam este tipo de análise ainda são escassos. Dentre as 9 citocinas avaliadas no estudo, verificou-se que apenas a IL-17 apresentou uma correlação positiva com a viremia de acordo com o valor de p (Fig. 4.2.12 G, p : 0,0007 e r^2 : 0,02939). A resposta Th17 é induzida a partir da ativação via TCR (receptor de célula T, do inglês, *T cell receptor*) na presença de citocinas que ativam STAT-3, como a IL-6, IL-21 e IL-23 (MURANSKI & RESTIFO, 2013). Esta é uma classe linfocitária que está envolvida na resposta a patógenos extracelulares, incluindo bactérias e vírus (SONNENBERG et al., 2010). Na dengue, o seu papel ainda não é bem esclarecido, mas sabe-se que a IL-17 pode induzir a resposta imune inata em células epiteliais frente à infecção, devido a seu padrão neutrofílico (JAIN et al., 2013; MALAVIGNE et al., 2012). Assim, de acordo com o resultado observado na Fig. 4.2.12, sugere-se uma correlação positiva entre a carga viral do DENV e a produção de IL-17, evidenciando um possível papel no controle da infecção por esta citocina, fato que ainda não está bem definido. Adicionalmente, foram realizadas análises de correlação por métodos de *Pearson* através do programa GraphPad Prism (San Diego, EUA) entre viremias abaixo e acima de 10^5 FFU_{C6/36}/mL, e de acordo com os dias de doença. No entanto, estas avaliações não foram estatisticamente significativas.

4.3 Sequenciamento e filogenia

A produção de citocinas na patogênese da dengue ainda não é bem definida, e estudos mostram que esta pode variar de acordo da idade da população, gênero, *background* genético, infecção prévia por sorotipo heterólogo e cepa viral (HALSTEAD et al., 1970; SIQUEIRA et al., 2005; STEPHENS, 2010; HTUN et al., 2015; COLOGNA & RICO-HESSE, 2003). Além disso, em diferentes surtos da doença pelo mundo, foi observada uma associação entre virulência de cepas e manifestações clínicas (COLOGNA & RICO-HESSE, 2003; GUBLER et al., 1978). Estas mudanças na virulência podem surgir a partir de mutações pontuais no genoma viral, como evidenciado por Cologna & Rico-Hesse (2003). Estes autores demonstraram que trocas de nucleotídeos nas regiões 5' e 3' não codificantes e de um

aminoácido (E₃₉₀) foram capazes de reduzir a replicação de clones infecciosos em culturas de células dendríticas humanas primárias. Ademais, a introdução de novos sorotipos e genótipos em uma região podem gerar novas epidemias da doença (ANDRADE et al., 2016). A falta de imunidade da população aos novos sorotipos de DENV favorece o aumento de número de casos brandos e graves, como observado no Brasil com a introdução do sorotipo 3, em 2002, e sorotipo 4, em 2010 (ANDRADE et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2005).

Assim, visando analisar as características intrínsecas das cepas de DENV, bem como caracterizar os sorotipos e linhagens circulantes nos anos de 2013 e 2014 em Cambé, foi realizado o sequenciamento nucleotídico do gene do envelope viral. A proteína viral E é uma proteína estrutural que se encontra na superfície da partícula viral (CHAMBERS et al., 1990). Por encontrar-se exposta, ela é um dos principais alvos da imunidade mediada por anticorpo, podendo sofrer pressões seletivas a partir desta interação (PARAMESWARAN et al., 2017; CHAMBERS et al., 1990). Ademais, a partir da análise desta região do genoma, é possível realizar avaliações filogenéticas e estabelecer padrões de dispersão do DENV (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2015; CUNHA et al., 2016; DRUMOND et al., 2016). Desta forma, para o estudo das amostras de Cambé, foi realizado o sequenciamento da região codificadora da proteína E de 9 amostras de dengue (quatro de 2013, e cinco de 2014), escolhidas de forma aleatória. Inicialmente, estas sequências foram montadas e alinhadas (Anexos G e H). O resultado deste alinhamento identificou 4 substituições sinônimas de aminoácidos: E₂₂₂ (T → S), E₃₉₄ (R → K), E₄₂₈ (V → L) e E₄₃₆ (V → I) (Tabela 4.3.1). Foi observada também uma substituição não-sinônima, com troca de serina (hidrofílico) por leucina (hidrofóbico) na posição E₃₃₈ (Tabela 4.3.1). O alinhamento entre as cepas sequenciadas, evidenciando estas substituições, está disponível no anexo E.

Tabela 4.3.1 Substituições aminoacídicas observadas nas cepas de Cambé.

Cepa	Envelope					Linhagem
	Domínio II	Domínio III				
	E ₂₂₂	E ₃₃₈	E ₃₉₄	E ₄₂₈	E ₄₃₆	
LRV 13/369	S	S	R	V	V	1b
LRV 14/467	S	S	R	V	V	1b
LRV 14/893	T	S	R	V	V	1b
LRV 14/1139	S	L	K	L	I	2
LRV 14/1166	S	L	K	L	I	2
LRV 14/993	S	L	K	L	I	2
LRV 13/350	S	L	K	L	I	2
LRV 13/341	S	L	K	L	I	2
LRV 13/412	S	L	K	L	I	2

Nota: A conservação entre as diferentes classes de aminoácidos está evidenciada pelos diferentes tons de cinza. Polares não-carregados (hidrofilico): S e T; alifáticos não-polares (hidrofóbico): L, I e V; polares carregados positivamente (hidrofilico): R e K.

Sabe-se que mutações que geram trocas de aminoácidos podem resultar em mudanças conformacionais de proteínas virais e, conseqüentemente, mudanças funcionais; por exemplo, Silveira e colaboradores (2016) demonstraram que mutações pontuais no domínio helicase da proteína NS3 foram capazes de aumentar a capacidade replicativa DENV em células dendríticas. Outros trabalhos do grupo mostram também, que mutações pontuais nos domínios NS3 e E podem gerar um fenótipo neurovirulento em camundongos (BORDIGNON et al., 2007). Por outro lado, algumas mutações podem ser deletérias, como evidenciado por Roehrig e colaboradores (2013), que identificaram mutações nucleotídicas na região codificadora do envelope viral que tornavam o DENV incapaz de se replicar *in vitro* em células Vero.

A proteína de envelope apresenta 3 domínios estruturais (I, II e III), constituídos principalmente por estruturas em forma de barril- β (REY et al., 1995). A região central é constituída pelo domínio I (MUKHOPADHYAY et al., 2005). O domínio II contém uma região hidrofóbica altamente conservada entre os *Flavivirus* em sua porção distal, que constitui o peptídeo de fusão (MODIS et al., 2004). Este é o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-flavivirus (4G2) utilizado nos ensaios de IFI (Fig 4.2.1). Já o domínio III parece estar envolvido na ligação ao receptor celular (MODIS et al., 2004). Conforme mencionado anteriormente, foram evidenciadas 5 substituições de aminoácido nas amostras sequenciadas. Uma ocorreu no domínio II (E₂₂₂), e quatro, no domínio III (E₃₃₈, E₃₉₄, E₄₂₈ e E₄₃₆), sendo que a E₃₃₈ foi a única substituição não-sinônima (Tabela 4.3.1). As trocas sinônimas, quando pontuais, normalmente não resultam em diferenças na estrutura

tridimensional da proteína (TEOH et al., 2013). No entanto, substituições com troca de polaridade, como a observada no domínio III, podem estar associadas à virulência de certas cepas, e também podem alterar a imunogenicidade da partícula viral (LEITMEYER et al., 1999; BUTRAPET et al., 2011). Porém, avaliando a sintomatologia dos pacientes cujas cepas foram isoladas, observou-se que nenhum deles desenvolveu sintomas graves. Além disso, quatro dessas substituições aminoacídicas (E₃₃₈, E₃₉₄, E₄₂₈ e E₄₃₆) observadas em Cambé foram descritas também por Bruycker-Nogueira e colaboradores (2015), e não parecem estar relacionadas à patogenicidade da dengue, mas associadas à diferenciação das distintas linhagens do genótipo V.

Em seguida, a partir dos dados de alinhamento, foram montadas matrizes de identidade nucleotídica e aminoacídica das sequências de Cambé (Tabelas 4.3.2 e 4.3.3). Desta forma, foi observado que a identidade nucleotídica entre as amostras de Cambé ficou entre 95,1 % e 100%, enquanto a identidade aminoacídica manteve-se entre 99% e 100%. Assim, observa-se que, apesar de existirem diferenças nucleotídicas entre as sequências, estas não necessariamente resultam em uma substituição de aminoácido.

Tabela 4.3.2 Matriz de identidade nucleotídica entre as 9 amostras de Cambé.

Sequência	LRV 13/369	LRV 14/467	LRV 14/893	LRV 14/1139	LRV 14/1166	LRV 14/993	LRV 13/350	LRV 13/341	LRV 13/412
LRV 13/369	100,0%	100,0%	99,7%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	95,3%
LRV 14/467	100,0%	100,0%	99,7%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	95,4%	95,3%
LRV 14/893	99,7%	99,7%	100,0%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,3%	95,1%
LRV 14/1139	95,4%	95,4%	95,3%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,7%	99,6%
LRV 14/1166	95,4%	95,4%	95,3%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,7%	99,6%
LRV 14/993	95,4%	95,4%	95,3%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,7%	99,6%
LRV 13/350	95,4%	95,4%	95,3%	99,7%	99,7%	99,7%	100,0%	99,8%	99,6%
LRV 13/341	95,4%	95,4%	95,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,8%	100,0%	99,6%
LRV 13/412	95,3%	95,3%	95,1%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%	100,0%

Tabela 4.3.3 Matriz de identidade aminoacídica entre as 9 amostras de Cambé.

Sequência	LRV 13/369	LRV 14/467	LRV 14/893	LRV 14/1139	LRV 14/1166	LRV 14/993	LRV 13/350	LRV 13/341	LRV 13/412
LRV 13/369	100,0%	100,0%	99,8%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%
LRV 14/467	100,0%	100,0%	99,8%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%
LRV 14/893	99,8%	99,8%	100,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%	99,0%
LRV 14/1139	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
LRV 14/1166	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
LRV 14/993	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
LRV 13/350	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
LRV 13/341	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
LRV 13/412	99,2%	99,2%	99,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Os quatro sorotipos de dengue são geneticamente relacionados, apresentando uma identidade de aminoácidos na proteína de envelope entre 72,3% a 80,4%, mas são antigenicamente distintos (KUNO et al., 1998). Os sorotipos também podem ser subdivididos filogeneticamente em genótipos, definidos por até 6% de divergência na sequência nucleotídica da região codificadora da proteína E (HOLMES & TWIDDY, 2003). O DENV-1 apresenta 5 genótipos distintos, o genótipo I (sudeste asiático, China e leste africano), genótipo II (Tailândia), genótipo III (Malásia), genótipo IV (Pacífico sul) e genótipo V (Américas/África) (THU et al., 2005; RICO-HESSE, 1990). Abaixo do genótipo, pode existir outro nível taxonômico não-oficial denominado como “linhagem”, que se baseia na distribuição dos clados e suas relações temporais e geográficas (MENDEZ et al., 2010).

O sequenciamento da região codificadora E permite a classificação dos vírus da dengue em sorotipos, genótipos e linhagens. Conforme demonstrado por Bruycker-Nogueira e colaboradores (2015), a análise filogenética a partir do gene E leva a resultados equivalentes à análise do genoma viral completo. Sendo assim, foi realizada a análise filogenética das cepas de DENV circulantes em Cambé nos surtos de 2013 e 2014. Para esta análise, é necessário remover informações redundantes e não-informativas. Desta forma, das 9 amostras sequenciadas, 3 foram removidas por possuírem 100% de identidade nucleotídica com outras amostras (Tabela 4.3.2). A seleção das demais amostras incluídas na análise, foi realizada com auxílio da ferramenta BLAST. Os critérios para inclusão foram: 99% de cobertura e no mínimo, 95% de identidade em relação a sequência de Cambé utilizada para realizar essa busca (LRV 14/1166), e disponibilidade de informações sobre o local e ano de isolamento (Brasil e América

do Sul). Aquelas que não apresentavam estas informações, ou que se mostraram idênticas, foram removidas da avaliação.

Conforme ilustrado na Fig. 4.3.1, observou-se a co-circulação de duas linhagens (1b e 2) nos anos 2013 e 2014 em Cambé. A nomenclatura utilizada para classificação das linhagens baseou-se em Bruycker-Nogueira e colaboradores (2015). A identidade nucleotídica entre as linhagens 1b e 2 de Cambé (95,1% e 95,4%) foi similar à vista por Bruycker-Nogueira e colaboradores (2015) (95,2% e 96,2%). Além disso, as substituições de aminoácidos na proteína E que diferenciam as linhagens 1b e 2 também foram evidenciadas nas amostras de Cambé (anexo D). Estas substituições são: E₃₃₈ (S → L), E₃₉₄ (R → K), E₄₂₈ (V → L) e E₄₃₅ (V → I) (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2015).

Nas Américas, já foi descrita a circulação de diversas linhagens de DENV-1 genótipo V. Análises filogenéticas identificaram a circulação de uma linhagem nas Américas Central e Norte entre 2005 e 2008 (MUNOZ-JORDÁN et al., 2013), duas linhagens distintas na Colômbia entre os anos 1978 a 2005 (MENDEZ et al., 2010) e três linhagens na Argentina (2000), México (1980-2007) e Porto Rico (1986-2010) (TITTARELLI et al., 2014; CARRILLO-VALENZO et al., 2010; ANEZ et al., 2012).

A co-circulação de diferentes linhagens de genótipo V de DENV-1 tem sido descrita no Brasil nos últimos anos (DOS SANTOS et al., 2011; DRUMOND et al., 2016; BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2015). Em trabalho recente, Bruycker-Nogueira e colaboradores (2015) avaliaram a circulação de DENV-1 entre 1986 e 2011. Através do sequenciamento e análise da região codificadora da proteína de envelope, foram detectadas 2 linhagens circulantes do genótipo V (linhagem 1, subdividida em a e b, e linhagem 2), sendo que a linhagem 1 encontrava-se mais próxima às cepas da América Latina, enquanto a linhagem 2 relacionava-se mais às cepas Asiáticas. E, apesar da baixa divergência genética das cepas circulantes no Brasil, a co-circulação de diferentes linhagens de DENV pode contribuir para o aumento da diversidade genética e para a seleção de cepas com uma maior virulência (DRUMOND et al., 2016; LEE et al., 2011). Neste sentido, Nunes e colaboradores (2016), durante um surto de dengue no Rio de Janeiro em 2008, correlacionaram o aumento de casos graves à substituição da linhagem de DENV-2 circulante. Assim, conclui-se que o acompanhamento da introdução de novas linhagens e sorotipos em uma região é uma importante ferramenta epidemiológica.

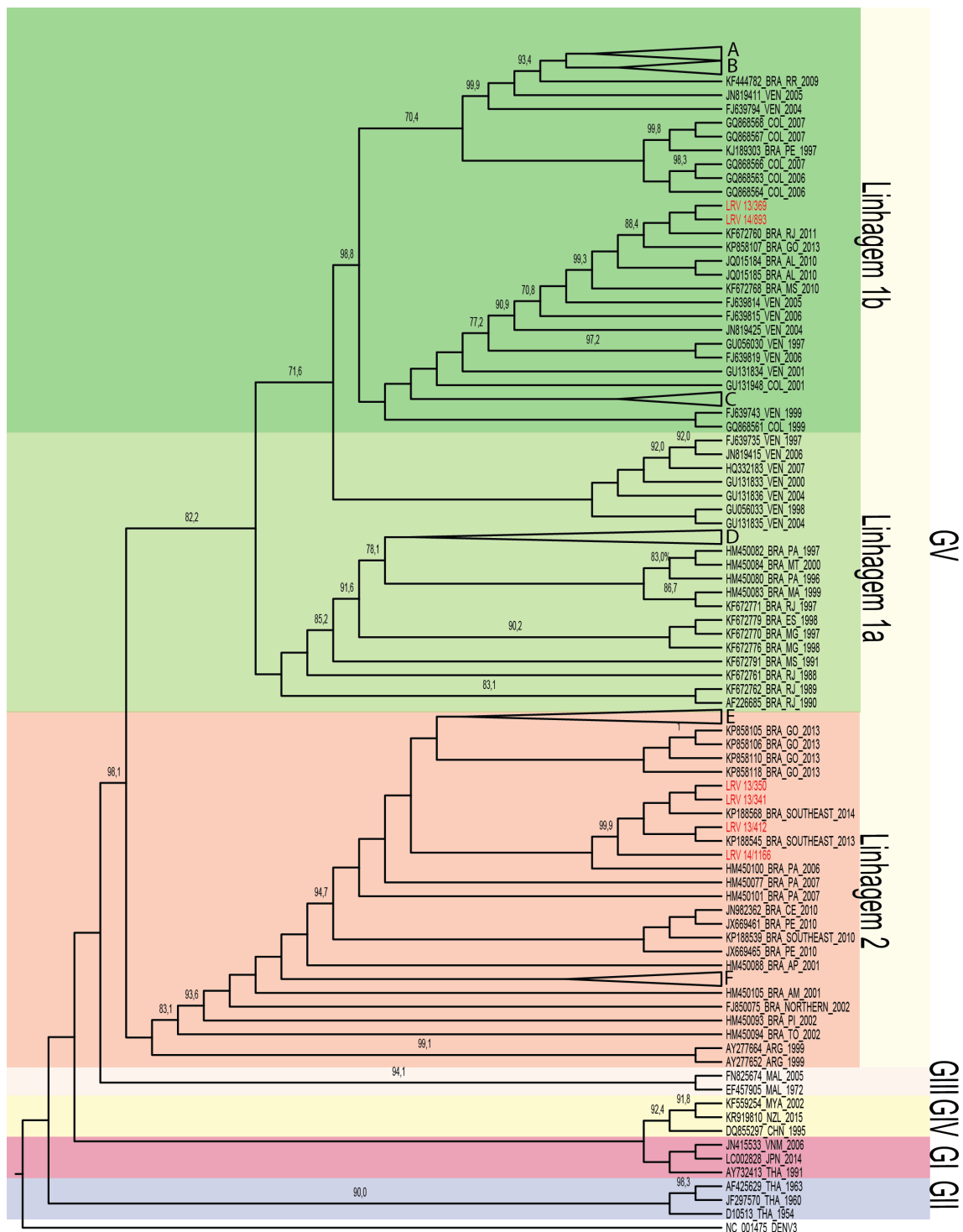


Fig. 4.3.1. Análise filogenética da sequência codificadora do envelope de isolados de DENV-1 de Cambé. A árvore foi inferida através da metodologia de máxima verossimilhança utilizando o *software* PhyML 3.0, com base no modelo GTR +G+I. Os números à esquerda dos nodos representam os valores de *bootstrap* > 70 (1000 réplicas). A árvore foi enraizada utilizando como grupo externo um DENV-3 (NC 001475) e o comprimento dos ramos não representa a distância evolutiva. Além disso, clados com suporte inferior a 10% foram colapsados para melhor resolução da imagem, ocultando 88 cepas de DENV-1 (maior detalhamento destas cepas está no Anexo I). As cepas estão nomeadas de acordo com o número de acesso no GenBank/código indicativo da região/ano do isolamento.

CONCLUSÕES

A partir da avaliação dos casos de dengue em Cambé nos anos de 2013 e 2014, foram obtidos dados epidemiológicos e laboratoriais que permitem concluir que:

- Observou-se um aumento na incidência da doença em 2014 (12,8% em 2013 e 46% em 2014), que pode ter sido influenciada pelo aumento na densidade populacional de mosquito vetor;
- Os surtos da doença ocorreram entre os meses de março a junho em ambos os anos, sendo que estes correlacionam-se de forma positiva às chuvas e ao aumento de temperatura observados 4 meses antes dos surtos;
- A média de idade dos pacientes com dengue foi de 33 anos, e não houve diferença na incidência da doença por gênero e cor autodeclarada;
- Em 55% dos casos de dengue confirmados por sorologia (NS1⁺ e/ou IgM⁺) foi isolado o vírus na amostra de soro. A eficiência do isolamento apresentou correlação positiva com a presença do antígeno NS1 e negativa com a presença de anticorpos anti-dengue IgM;
- Os ensaios de sorotipagem por RT-PCR demonstraram soroprevalência do DENV-1 na região de Cambé, com apenas uma amostra sendo positiva para DENV-4;
- A viremia média observada nos pacientes foi de $1,0 \times 10^5$ FFU_{C6/36}/mL, mantendo-se elevada entre o dia 1-3 pós-início dos sintomas e decaindo na sequência da doença;
- Não houve diferenças na produção de citocinas entre pacientes com sinais hemorrágicos e com dengue branda;
- Foi verificada uma tendência a uma maior produção de TNF- α e IL-6 nos pacientes que apresentaram febre, quando comparados àqueles que não apresentaram esta sintomatologia;
- Observou-se também uma correlação positiva entre a viremia e a produção de IL-17;
- A partir das análises de sequenciamento do gene do envelope viral de 9 cepas (quatro de 2013 e cinco de 2014), foram verificadas 5 mudanças aminoacídicas, sendo que, segundo a literatura nenhuma destas mutações resultam em mudança na virulência;
- Finalmente, foi observada a co-circulação de duas linhagens (1b e 2) de DENV-1 genótipo V em Cambé, no período de estudo;

PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho temos:

- Analisar a produção de citocinas de pacientes com dengue estratificando-os por gênero, idade e infecção secundária;
- Avaliar a produção de citocinas e a viremia entre os pacientes com dengue deste estudo e pacientes com dengue grave ou que evoluíram à óbito;
- Realizar o sequenciamento nucleotídico de um maior número de isolados virais objetivando caracterizar outras linhagens de DENV-1 genótipo V na região, ou ainda, outros genótipos de DENV-1;
- Analisar nos pacientes positivos para IgG antes do quarto dia de sintomas (provável infecção secundária) a capacidade neutralizante destes anticorpos para os quatro sorotipos de DENV;
- Criar bancos de amostras de soro e vírus para o surgimento de novos estudos.

REFERÊNCIAS

ABHISHEK, K. S., CHAKRAVARTI, A., BAVEJA, C. P., KUMAR, N., SIDDIQUI, O., KUMAR. Association of interleukin-2, -4 and -10 with dengue severity. **Indian J. Pathol. Microbiol.** v. 60, n. 1, p. 66-69, 2017.

ABREU, R. L. D. Paraná Município Cambé. 2006. Disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Cambé#/media/File:Parana_Municip_Cambe.svg>, último acesso em 18/04/2018.

AHMED, N. H., BROOR, S. Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. **J Vector Borne Dis.** v. 51, n. 3, p. 194-199, 2014.

AKIRA, S., TAGA, T., KISHIMOTO, T. Interleukin-6 in biology and medicine. **Adv. Immunol.** v. 54, p. 1-78, 1993.

ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V., FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, n. 2, p. 376-391, 2002.

ANAND, A. M., SISTLA, S., DHODAPKAR, R., HAMIDE, A., BISWAL, N., SRINIVASAN, B. Evaluation of NS1 Antigen Detection for Early Diagnosis of Dengue in a Tertiary Hospital in Southern India. **J. Clin. Diagn. Res.** v. 10, n. 4, p. 1-4, 2016.

ANDERSON, K. B., GIBBONS, R. V., CUMMINGS, D. A., NISALAK, A., GREEN, S., LIBRATY, D. H., JARMAN, D. H., SRIKIATKHACHORN, A., MAMMEN, M. O., DURANEE, B., YOON, I. K., ENDY, T. P. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. **J. Infect. Dis.** v. 209, n. 3, p. 360-368, 2014.

ANDRADE, E. H. P., FIGUEIREDO, L. B., VILELA, A. P. P., ROSA, J. C. C., OLIVEIRA, J. G., ZIBAOU, H. M., ARAÚJO, V. E. M., MIRANDA, D. P., FERREIRA, P. C. P., ABRAHÃO, J. S., KROON, E. G. Spatial-Temporal Co-Circulation of Dengue Virus 1, 2, 3, and 4 Associated with Coinfection Cases in a Hyperendemic Area of Brazil: A 4-Week Survey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 94, n. 5, p. 1080-1084, 2016.

ANEZ, G., HEISEY, D. A., ESPINA, L. M., STRAMER, S. L., RIOS, M. Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 4 circulating in Puerto Rico and Key West, Florida, during 2010 epidemics. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 87, n. 3, p. 548-553, 2012.

ANKER, M., ARIMA, Y. Male-female differences in the number of reported incident dengue fever cases in six Asian countries. **Western Pacific Surveillance and Response Journal.** v. 2, n.2, p. 17-23, 2011.

ARIAS J., VALERO N., MOSQUERA J., MONTIEL M., REYES E., LARREAL Y., ALVAREZ-MON M. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. **Virology**. v. 486, p. 42-51, 2014.

ARYA, S. C., ARGAWAL, N., PARIKH, S. C., AGARWAL, S. Simultaneous Detection of Dengue NS1 Antigen, IgM plus IgG and Platelet Enumeration during an Outbreak. **Sultan Qaboos Univ Med J**. v. 11, n. 4, p. 470-476, 2011.

ASHOUR, J., LAURENT-ROLLE, M., SHI, P. Y., GARCÍA-SASTRE, A. NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. *J. Virol.* v. 83 (11). p. 5408-5418. 2009.
AVIRUTNAN, P., HAUHART, R. E., SOMNUKE, P., BLOM, A. M., DIAMOND M. S., ATKINSON, J. P. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **J. Immunol.** v. 187, n. 1, p. 424-433, 2011.

AVIRUTNAN, P., MALASIT, P., SELIGER, B., BHAKDI, S., HUSMANN, M. Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Leads to Chemokine Production, Complement Activation, and Apoptosis. *The Journal of Immunology*. v. 161, p. 6338-6346, 1998.

AZAMI, N. A. M., SALLEH, S. Z., NEOH, H-M., ZAKARIA, S. Z. S., JAMAL, R. Dengue epidemic in Malaysia: Not a predominantly urban disease anymore. **BMC Research Notes**. v. 4, n. 216, p. 1-4, 2011.

BAILEY, S. R., NELSON, M. H., HIMES, R. A., LI, Z., MEHROTA, S., PAULOS, C. M. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Front. Immunol.** v. 5, n. 276, p. 1-13, 2014.

BALSITIS, S. J., COLOMA, J., CASTRO, G., ALAVA, A., FLORES, D., MCKERROW, J. H., BEATTY, P R., HARRIS, E. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 80, n. 3, p. 416-424, 2009.

BHAMARAPRAVATI, N. Hemostatic defects in dengue hemorrhagic fever. **Rev. Infect. Dis.** v. 11, n. 4, p. 826-829, 1989.

BHATT, S., GETHING, P. W., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., FARLOW, A. W., MOYSES, C. L., DRAKE, J. M., BROWNSTEIN, J. S., HOEN, A. G., SANKOH, O., MYERS, M. F., GEORGE, D. B., JAENISCH, T., WINT, G. R., SIMMONS, C. P., SCOTT, T. W., FARRAR, J. J., HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**. v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BLACKSELL, S. D., MAMMEN, M. P., THINGPASEUTH, S., GIBBONS, R. V., JARMAN, R. G., JENJAROEN, K., NISALAK, A., PHETSHOUVAHN, R., NEWTON, P. N., DAY, N. P. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 60, n. 1, p. 43-49, 2008.

BORDIGNON, J., STROTTMANN, D. M., MOSIMANN, A. L. P., PROBST, C. M., STELLA, V., NORONHA, L., ZANATA, S. M., DUARTE DOS SANTOS, C. N. Dengue neurovirulence in mice: Identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **Journal of Medical Virology**. v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.

BOZZA, F. A., CRUZ, O. G., ZAGNE, S. A., AZEREDO E. L., NOGUEIRA, R. M., ASSIS, E. F., BOZZA, P. T., KUBELKA, C. F. Multiplex Cytokine Profile from Dengue Patients: MIP-1beta and IFN-gamma as Predictive Factors For Severity. **BMC Infect Dis.** v. 8, p. 2334-23348, 2008.

BRAISIER, A. R., JU, H., GARCIA, J., SPRATT, H. M., VICTOR, S. S., FORSHEY, B. M., HALSEY, E. S., COMACH, G., SIERRA, G., BLAIR, P. J., ROCHA, C., MORRISON, A. C., SCOTT, T. W., BAZAN, I., KOCHER, T. J., A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 86, n. 2, p. 341-348, 2012.

BROERE, F., APASOV, S. G., SITKOVSKY, M. V., VAN EDEN, W. T cell subsets and T cell-mediated immunity. Principles of Immunopharmacology. **Principles of Immunopharmacology.** Ed. Springer, p. 15-27, 2011.

BROWN, Z., STRIETER, R. M., NEILD, G. H., THOMPSON, R. C., KUNKEL, S. L., WESTWICK, J. IL-1 Receptor Antagonist Inhibits Monocyte Chemotactic Peptide 1 Generation by Human Mesangial Cells. **Kidney International.** v. 42, p. 99-101, 1999.

BRUYCKER-NOGUEIRA, F., MIR, D., DOS SANTOS, F. B., BELLO, G. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. **Infect. Genet. Evol.** v. 45, p. 454-460, 2016.

BURKE-GAFFNEY, A., KEENAN, A. K. Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 alpha/beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. **Immunopharmacology.** v. 25, n.1, p. 1-9, 1993.

BUTRAPET, S., CHILDERS, T., MOSS, K. J., ERB, S. M., LUY, B. E., CALVERT, A. E., BLAIR, C. D., ROEHRIG, J. T., HUANG, C. Y. H. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. **Virology.** v. 413, n. 1, p. 118-127, 2011.

BUTTHEP, B., CHUNHAKAN, S., YOKSAN, S. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Pediatr. Infect. Dis. J.** v. 31, n. 12, 2012.

CARDOSO, I. M., CABIDELLE, A. S. A., BORGES, P. C. L., LANG, C. F., CALENTI, F. G., NOGUEIRA, L. O., ALOISO, F., JUNIOR, C. C. Dengue: clinical forms and risk groups in a high incidence city in the southeastern region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 44, p. 430-435, 2011.

CARRILLO-VALENZO, E., DANIS-LOZANO, R., VESCO-HERNÁNDEZ, J. X., SÁNCHEZ-BURGOS, G., ALPUCHE, C., LÓPEZ, I., ROSALES, C., BARONTI, C., DE LAMBALLERIE, X., HOLMES, E. C., RAMOS-CASTANEDA, J. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. **Arch. Virol.** v. 155, n. 9, p. 1401-1412, 2010.

CARTMELL, T., POOLE, S., TUMBULL, A. V., ROTHWELL, N. J., LUHESHI, G. N. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. **J. Physiol.** v. 526, p. 653-661, 2000.

CAVALCANTI, L. P. G., COELHO, I. C. B., VILAR, D. C. L. F., HOLANDA, S. G. S., ESCÓSSIA, K. N. F., SOUZA-SANTOS, R. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 43, n. 4, 2010.

CHAMBERS, T.J. et al. Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. **Annual Reviews of Microbiology.** v. 44, p. 649-688, 1990.

CHATUVERDI, U. C., RAGHUPATHY, R., PACSA, E. A., ELBISHBISHI, R., AGARWAL, R., MISRA, S., KAPOOR, R., MUKERJEE, R., MATHUR, A., KHAN, M. A. Y., AZIZIEH, F. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. **Curr. Sci. Ass.** v 76, n. 1, p. 63-69, 1999.

CHATUVERDI, U. C., AGARWAL, R., EIBISHBISHI, E. A., MUSTAFA, A. S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v 28, n. 30, p. 183-188, 2000.

CHATUVERDI, U. C. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. **Indian J. Med. Res.** v. 129, n. 1, p. 1-3, 2009.

CHEN, R. F., LIU, J. W., YEH, W. T., WANG, L., CHANG, J. C., YU, H. R., CHENG, J. T., YANG, K. D. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 44, n. 1, p. 43-50, 2005.

CHEN, Y., MAGUIRE, T., MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of Virology.** v. 70, p. 8765-8772, 1996.

CHEN, Y., MAGUIRE, T., HILEMAN, R. E., FROMM, J. R., ESKO, J. D., LINHARDT, R. J., MARKS, R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.** v. 3, n. 8, p. 886-871, 1997.

CHENG, Y., KING, N. J., KESSON, A. M. The role of tumor necrosis factor in modulating responses of murine embryo fibroblasts by flavivirus, West Nile. **Virology.** v. 329, n., 2, p. 361-370, Virology, 2004.

CHOWELL, G., SANCHEZ, F. Climate-based descriptive models of dengue fever: the 2002 epidemic in Colima, Mexico. **J. Environ. Health.** v. 68, n. 10, p. 40-44, 2006.

CHUA, K. B., MUSTAFA, B., ABDUL, W. A. H., CHEM, Y. K., KHAIRUL, A. H., KUMARASAMY, V., MARIAM, M., NURHASHMIMI, H., ABDUL, R. K. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. **Malays. J. Pathol.** v. 33, n. 1, p. 13-20, 2011.

COFFEY, L. L., MERTENS, E., BREHIN, A. C., FERNANDEZ-GARCIA, M. D., AMARA, A., DESPRÉS, P., SAKUNTABHAI, A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes Infect.** v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.

COLOGNA, R. & RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. **J. Virol.** v. 77, n. 7, p. 3929-3938, 2003.

COLOGNA, R., ARMSTRONG, P. M., RICO-HESSE, R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitoes. **J. Virol.** v. 79, n. 2, p. 853 – 859, 2005.

COSTA-PEREIRA, A. P., WILLIAMS, T. M., STROBL, B., WATLING, D., BRISCOE, J., KERR, I. M. The Antiviral Response to Gamma Interferon. **J. Virol.** v. 76, n. 18, p. 9060-9068, 2002.

CUNHA M. P., GUIMARÃES, V. N., SOUZA, M., DE PAULA CAROSO, D., DE ALMEIDA, T. N., DE OLIVEIRA, T. S., FIACCADORI, F. S. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. **Infect. Gent. Evol.** v. 43, p. 130-134, 2016.

DE LA CRUZ HERNÁNDEZ, S. I., PUERTA-GUARDO, H., FLORES-AGUILAR, H., GONZÁLEZ-MATEOS, S., LÓPEZ-MARTINEZ, I., ORTIZ-NAVARRETE, V., LUDERT, J. E., DEL ANGEL, R. M. A strong interferon response correlates with a milder dengue clinical condition. **J. Clin. Virol.** v. 60, n. 3, p. 196-199, 2014.

DE-OLIVEIRA PINTO, L. M., MARINHO, C. F., POVOA, T. F., De AZEREDO, E. L., DE SOUZA, L. A., BARBOSA, L. D. R., ... & DA CUNHA, R. V. (2012). Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. **PloS One.** v. 7, n. 7, 2012.

DESHMANE, S. L., KREMLEV, S., AMINI, S., SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research.** v. 29, n. 6, p. 313-326, 2010.

DICK, O. B., MARTÍN, J. L. S., MONTOYA, S. M., DIEGO, J. D., ZAMBRANO, B., DAYAN, G. H. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **Am J Trop Med Hyg.** v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

DINARELLO, C. A., CANNON, J. F., WOLFF, S. M., BERNHEIM, H. A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I. S., PALLADRINO, M. A., O'CONNOR, J. V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J. Exp. Med.** v. 163, n. 6, p. 1433-1450, 1986.

DOS SANTOS, F. B., MARIZE, P. M., NOGUEIRA, R. M. R., EDGIL, D., SCHATZMAYS, H. G., RILEY, L. W., HARRIS, E. Complete Nucleotide Sequence Analysis of a Brazilian Dengue Virus Type 2 Strain. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 7, p. 991-995, 2002.

DOS SANTOS, F. B., NOGUEIRA, F. B., CASTRO, M. G., NUNES, P. C. G., FILIPPIS, A. M. B., NIELI, R. C. F., SIMÕES, J. B. S., SAMPAIO, S. A., SANTOS, C. R., NOGUEIRA, R. M. R. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virol. J.** v. 8, n. 387, p. 1-4, 2011.

DOUGLAS, M. S., ALI, S., RIX, D. A., ZHANG, J. G., KIRBY, J. A. Endothelial production of MCP-1: modulation by heparin and consequences for mononuclear cell activation. **Immunology,** v. 92, n. 4, p. 512-518, 1997.

- DRUMOND, B. P., FAGUNDES, L. G. S., ROCHA, R. P., FUMAGALLI, M. J., ARAKI, C. S., COLOMBO, T. E., NOGUEIRA, M. L., CASTILHO, T. E., SILVEIRA, N. J. F., MALAQUIAS, L. C. C., COELHO, F. L. Phylogenetic analysis of Dengue virus 1 isolated from South Minas Gerais, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v. 47, n. 1, p. 251-258, 2016.
- DUANGCHINDA, T., DEJNIRATTISAI, W., VASANAWATHANA, S., LIMPITIKUL, W., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., MALASIT, P., MONGKOLSAPAYA, J., SCREATON, G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 107, n. 39, p. 16922-16927, 2010.
- DUQUE, J. E. L., DA SILVA, R. V., KUWABARA, E. F., NAVARRO-SILVA, M. A. Dengue no Estado do Paraná, Brasil: distribuição temporal e espacial no período 1995-2007. **Rev. Univ. Ind. Stantander.** v. 42, n. 2, p. 113-122, 2010.
- DUYEN, H. T. L., NGOC, T. V., HA, D. T., HANG, V. T. T., KIEU, N. T. T., YOUNG, P. R., FARRAR, J. J., SIMMONS, C. P., WOLBERS, M., WILLS, B. A. Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status. **J. Infect. Dis.** v. 203, n. 9, p. 1292-1300, 2011.
- EDELING, M. A., DIAMOND, M. S., FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 111, n. 11, p. 4285-4290, 2014.
- EHRENKRANZ, N. J., VENTURA, A. K., CUADRADO, R. R., POND, W. L., PORTER, J. E. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States—past, present and potential problems. **N. Engl. J. Med.** v. 285, p. 1460-1469, 1971.
- FALGOUT, B., CHANOCK, R., LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **J. Virol.** v. 63, n. 5, p. 1852-1860, 1989.
- FERRICK, D. A., SCHRENZEL, M. D., MULVANIA, T., HSIEH, B., FERLIN, W. G., LEPPER, H. Differential production of interferon- gamma and interleukin-4 in response to TH1-stimulating and TH2-stimulating pathogens by gamma-delta T-cells in vivo. **Nature.** v. 373, p. 255-257, 1995.
- FRIED, J. R., GIBBONS, R. V., KALAYANAROOJ, S., THOMAS, S. J., SRIKIATKHACHORN A., YOON, I. K., JARMAN, R. G., GREEN, S., ROTHMAN A. L., CUMMINGS, D. A. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 4, n. 3, 2010.
- FURUTA, T., MURAO, L. A., LAN, N. T., HUY, N. T., HUONG, V. T., THUY, T. T., THAM, V. D., NGA, C. T. HA, T. T., OHMOTO, Y., KIKUCHI, M., MORITA, K., YASUNAMI, M., HIRAYAMA, K., WATANABE, N. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 2, 2012.
- GOMEZ-DANTES, M. C. El Dengue en las Américas. Un Problema de Salud Regional. **Salud Pública de México.** v. 33, n. 4, p. 347-355, 1991.

GONÇALVES-NETO, V. S. & REBÊLO J. M. M. Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luis, Maranhão, Brasil, 1997-2002. **Cad. Saúde Pública.** v. 20, p. 1424-1431, 2004.

GONÇALVEZ, A. P., ENGLE, R. E., ST CLAIRE, M., PURCELL, R. H., LAI, C. J. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 104, n. 22, p. 9422-9427, 2007.

GONZÁLEZ, D., CASTRO, O. E., KOURI, G., PEREZ, K., MARTINEZ, E., VAZQUEZ, S., ROSÁRIO, D., CANCIO, R., GUZMÁN, M. G. Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. **Infectious Diseases.** v. 9, p. 280-285, 2005.

GREEN, S., PICHYANGKUK, S., VAUGHN, D. W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., KURANE, I., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A. Early CD69 Expression on Peripheral Blood Lymphocytes from Children with Dengue Hemorrhagic Fever. **J. Infect. Dis.** v. 180, n. 5, p. 1429-1435, 1999a.

GREEN, S., VAUGHN, D. W., KALAYANAROOJ, S., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., NISALAK, A., LEW, R., INNIS, B. L., KURANE, I., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A. Early Immune Activation in Acute Dengue Illness is Related to Development of Plasma Leakage and Disease Severity. **J. Infect. Dis.** v. 179, n. 4, p. 755-762, 1999b.

GU, L., RUTLEDGE, B., FIORILLO, J., ERNST, C., GREWAL, I., FLAVELL, R., GLADUE, R., ROLLINS, B. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. **J. Leukoc. Biol.** v. 62, n. 5, p. 577-580, 1997.

GUBLER, D. J., REED, D., ROSEN, L., HITCHCOK JR. J. C. Epidemiologic, Clinical, and Virologic Observations on Dengue in the Kingdom of Tonga. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 27, n. 3, p. 581-589, 1978.

GUBLER, D. J. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bull. World Health Organ.** v. 59, n. 4, p. 623-630, 1981.

GUBLER, D. J. & CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerg. Infect. Dis.** v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases. **Novartis Foundation Symposium.** v. 27, p. 3-16, 2006.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Trop. Med. Health.** v. 4, p. 3-11, 2011.

GUERRERO C. D., ARRIETA A. F., RAMIREZ D. D., RODRÍGUES L. S., VEGA R., RODRÍGUES J. A., NARVÁEZ C. F., SALGADO D. M. High plasma levels of soluble ST2

but not its ligand IL-33 is associated with severe forms of pediatric dengue. **Cytokine**. v. 61, n. 3, p. 766-771, 2013.

GUZMÁN, M. G. & KOURI, G. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Lessons and Challenges. **J. Clin. Virol.** v. 27, n. 1, p. 1-13, 2003.

GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSHOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., HUNSPERGER, E., KROEGER, A., MARGOLIS, H. S., MARTÍNEZ, E., NATHAN, M. B., PELEGRINO, J. L., SIMMONS, C., YOKSAN, S., PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 8, p. 7-16, 2010.

HALES, S., WEINSTEIN, O., SOUARES, Y., WOODWARD, A. El Niño and the dynamics of vectorborne disease transmission. **Environ. Health Perspect.** v 108, n. 2, p. 99-102, 1999.

HALSTEAD S. B., NIMMANNITYA S., COHEN, S. N. Observations Related to Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. IV. Relation of Disease Severity to Antibody Response and Virus Recovered. **Yale J. Biol. Med.** v 42, n. 5, p. 311-328, 1970.

HALSTEAD, S. B. Dengue Haemorrhagic Fever – A Public Health Problem and a Field Research. **Bull World Health Organ.** v. 58, n. 1, p. 1-21, 1980.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science.** v. 239, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Revista Panamericana de Salud Pública.** v. 6, p. 407-415, 2006.

HENCHAL, E. A. GENTRY, M. K. MCCOWN, J. M., BRANDT, W. E. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 31, n. 4, p. 830-836. 1982

HENCHAL, E. A., PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HERBEIN, G., O'BRIEN, W. A. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 223, n. 3, p. 241-257, 2000.

HOBER, D., POLI, L., ROBLIN, B., GESTAS, P., CHUNGUE, E., GRANIC, G., IMBERT, P., PECARERE, J. L., VERGEZ-PASCAL, R., WATTRE, P. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 48, n. 3, p. 324-331, 1993.

HOBER, D., DELANNOY, A. S., BENYOUCEF, S., DE GROOTE, D., WATTRE, P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. **Microbiol. Immunol.** v. 40 n. 8, p. 569-572, 1996.

HOLMES E. C., TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Inf. Genetics Evol.** v. 3, p. 19-28, 2003.

- HTUN, N. S., ODERMATT, P., EZE, I. C., BOILLAT-BLANCO, N., DACREMONT, V., PROBST-HENSCH, N. Is diabetes a risk factor for a severe clinical presentation of dengue?-review and meta-analysis. **PLOS Negl. Trop. Dis.** v. 9, n. 4, 2015.
- HU, D., DI, B., DING, X., WANG, Y., CHEN, Y., PAN, Y., WEN, K., WANG, M., CHE, X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virol. J.** v. 8, p. 1-4, 2011.
- IBARRA, S. A. M., LOWE, R. Climate and non-climate drivers of dengue epidemics in southern coastal ecuador. **Am J Trop Med Hyg.** v. 88(5). p. 971-981. 2013.
- IGLESIAS, N. G., FILOMATORI, C. V., GAMARNIK, A. V. The F1 Motif of Dengue Virus Polymerase NS5 Is Involved in Promoter-Dependent RNA Synthesis. **J. Virol.** v. 85, n. 12, p. 5745-5756, 2011.
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.** v. 40, n. 3, p. 531-544, 1978
- INYOO, S., SUTTITHEPTUMRONG, A., PATTANAKITSAKUL, S. N. Synergistic Effect of TNF- α and Dengue Virus Infection on Adhesion Molecule Reorganization in Human Endothelial Cells. **Jpn. J. Infect. Dis.** v.70, n. 2, p. 186-191, 2017.
- JAIN, A., PANDEY, B., GARG, R. K., KUMAR, R. IL-17 level in patients with Dengue virus infection & its association with severity of illness. **J. Clin. Immunol.** v. 33, n. 3, p. 612-618, 2013.
- JARMAN, R. G., NISALAK, A., ANDERSON, K. B., KLUNGTHONG, C., THAISOMBOONSUK, B., KANEECHIT, W., KALAYANAROOJ, S., GIBBONS, R. V. Factors Influencing Dengue Virus Isolation by C6/36 Cell Culture and Mosquito Inoculation of Nested PCR-Positive Clinical Samples. **Am J Trop Med Hyg.** v. 84, n. 2, p. 218 – 223, 2011.
- JENSEN, S. & THOMSEN, A. R. Sensing of RNA Viruses: a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. **J. Virol.** v. 86, n. 6, p. 2900-2910, 2012.
- JOHANSSON, M. A., CUMMINGS, D. A. T., GLASS, G. E. Multiyear Climate Variability and Dengue—El Niño Southern Oscillation, Weather, and Dengue Incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A Longitudinal Data Analysis. **PLoS Medicine.** v. 6, n. 11, 2009.
- JOHNSON, A. J. & ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **J. Virol.** v. 73, n. 1, p. 783-786, 1999.
- JONES, M., DAVIDSON, A., HIBBERT, L., GRUENDWALD, P., SCHLAAK, J., BALL, S., FOSTER, G. R., JACOBS, M. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **J. Virol.** v. 79, n. 9, p. 5414-5420, 2005.
- JUFFRIE, M., MEER, G. M., HACK, C. E., HAASNOOT, K., VEERAN, A. J., THIJS, L. G. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase. **Am J Trop Med Hyg.** v. 65, n. 1, p. 70-75. 2001.

KASSIM, F. M., IZATI, M. N., TGROGAYAH, T. A., APANDI, Y. M., SAAT, Z. Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**. v. 42, n. 3, p. 562-569, 2011.

KATZELNICK, L. C., GRESH, L., HALLORAN, M. E., MERCADO, J. C., KUAN, G., GORDON, A., BALMASEDA, A., HARRIS, E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**. p. 1-11, 2017.

KING, C. A., MARSHALL, J. S., ALSHURAF, H., ANDERSON, R. Release of Vasoactive Cytokines by Antibody-Enhanced Dengue Virus Infection of a Human Mast Cell/Basophil Line. **J. Virol**. v. 74, n. 15, p. 7146-7150, 2000.

KNIPPERTZ, I., STEIN, M. F., DORRIE, J., SCHAFT, N., MULLER, I., DEINZER, A., STEINKASSERER, A., NETTELBECK, D. M. Mild hyperthermia enhances human monocyte-derived dendritic cell functions and offers potential for applications in vaccination strategies. **Int. J. Hyperthermia**. v. 27, 6, p. 591-603, 2011.

KUCZERA, D., BAVIA, L., MOSIMANN, A. L. P., KOISHI, A. C., MAZZAROTTO, G. A. C. A., AOKI, M. N., MANSANO, A. M. F., TOMELERI, E. I., JUNIOR, W. L. C., MIRANDA, M. M., SARZI, M. L., PAVANELLI, W. R., CONCHON-COSTA, I., DOS SANTOS, C. N. D., BORDIGNON, J. Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. **J. Virol**. v. 13, n. 93, p. 1-8, 2016.

KULARATNE, S. A. Dengue Fever. **BMJ**. v. 351. 2015.

KUMAR, Y., LIANG, C., BO, Z., RAJAPAKSE, J. C., OOI, E. E., TENNENBAUM, S. T. Serum Proteome and Cytokine Analysis in a Longitudinal Cohort of Adults with Primary Dengue Infection Reveals Predictive Markers of DHF. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v. 6, n. 11, 2012.

KUNO, G., GWONG-JEN J., CHANG, K., TSUCHIYA, R., KARABATSOS, N., CROPP, C. B. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. **J. Virol**. v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998.

KURANE, I., MEAGER, A., ENNIS, F. A. Induction of Interferon Alpha and Gamma from Human Lymphocytes by Dengue Virus-infected Cells. **J. Gen. Virol**. v. 67, p. 1653-1661, 1986.

KURANE, I., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., NISALAK, A., MEAGER, A., JANUS, J., ENNIS, F. A. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. **J. Clin. Invest**. v. 88, n. 5, p. 1473-1480, 1991.

KURANE, I., INNIS, B. L., NIMMMANNITYA, S., NISALAK, A., MEAGER, A., ENNIS, F. A. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v. 48, n. 2, p. 222-229, 1993.

- LAMAS, S., MICHEL, T., COLLINS, T., BRENNER, B. M., MARSDEN, P. A. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. **J. Clin. Invest.** v. 90, n. 3, p. 879-887, 1992.
- LANCIOTTI, R. S., CALISHER, C. H., GUBLER, D. J., CHANG, G. J., VORNDAM, A. V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, n. 3, p. 545-551.,1992.
- LE GOFF, G., REVOLLO, J., GUERRA, M., CRUZ, M., BARJA SIMON, Z., ROCA, Y., VARGAS FLORÈS, J., HERVÉ, J. P. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. **Parasite.** v. 18, n. 3, p. 277-280, 2011.
- LEE, K. S., LO, S., TAN, S. S. Y., CHUA, R., TAN, L. K., XU, H., NG, L. C. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and *in situ* evolution. **Infect. Genet. Evol.** v. 12, n. 1, p. 77-85, 2011.
- LEE, Y. R., LIU, M. T., LEI, H. Y., LIU, C. C., WU, J. M., TUNG, Y. C., LIN, Y. S., YEH, T. M., CHEN, S. H., LIU, H. S. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. **J. Gen. Virol.** v. 87, p. 3624-3630, 2006.
- LEITMEYER, K. C., VAUGHN, D. W., WATTS, D. M., ROSALBA, S., DE CHACHON, I. V., RAMOS, C., RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **J. Virol.** v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.
- LESNIKOV, V. A., EFREMOV, O. A., KORNEVA, E. A., DAMME, V. J., BILLIAU, A. Fever produced by intrahypothalamic injection of interleukin-1 and interleukin-6. **Cytokine.** v. 3, n. 3, p. 195-198, 1991.
- LIBRATY, D. H., YOUNG, P. R., PICKERING, D., ENDY, T. P., KALAYANAROOJ, S., GREEN, S., VAUGHN, D. W., NISALAK A., ENNIS, F.A., ROTHMAN, A. L. High Circulating Levels of The Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate With The Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **J. Infect. Dis.** v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.
- LIMA, J. R. C., ROUQUAYROL, M. Z., CALLADO, M. R. M., GUEDES, M. I. F., PESSOA, C. Interpretation of the presence of IgM and IgG antibodies in a rapid test for dengue: analysis of dengue antibody prevalence in Fortaleza City in the 20th year of the epidemic. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 45, 2, p. 163-167, 2012.
- LIMKITTIKUL, K., BRETT, J., LAZOU, M. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Thailand (2000–2011): A Systematic Literature Review. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 8, n. 11, 2014.
- LINDENBACH, B. D. & RICE, C. M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature.** v. 436, p. 933-938, 2005.

LITTAUA, R., KURANE, I., ENNIS, F. A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Immunol.* v. 144, n. 8, p. 3183-3186, 1990.

LOO, Y. M., FORNEK, J., CROCHET, N., BAJWA, G., PERWITASARI, O., MARTINEZ-SOBRIDO, L., AKIRA, S., GILL, M. A., GARCÍA-SASTRE, A., KATZE, M. G., GALE, M. JR. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J. Virol.* v. 82, n. 1, p. 335-45, 2008.

MACKENZIE, J. M., JONES, M. K., YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* v. 220, n. 1, p. 232-240, 1996.

MALAVIGE G. N., GOMES L., ALLES L., CHANG T., SALIMI M., FERNANDO S., NANAYAKKARA K. D., JAYARATNE S., OGG G. S. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. *BMC Infect. Dis.* v. 13, n. 341, p. 1-7, 2013.

MALAVIGNE, G. N. & OGG, G. S. T Cell Responses in Dengue Viral Infections. *J. Clin. Virol.* v. 58, n. 4, p. 605-611, 2013.

MANEEKAN, P., LEAUNGWUTIWONG, P., MISSE, D., LUPLERTLOP, N. T helper (Th) 1 and Th2 cytokine expression profile in dengue and malaria infection using magnetic bead-based bio-plex assay. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* v. 44, n. 1, p. 31-36. 2013.

MANGIONE, J. N. A., HUY, N. T., LAN, N. T. P., MBANEFO, E. C., HA, T. T. N., BAO, L. Q., NGA, C. T. P., TUONG, V. T., DAT, T. V., THUY, T. T., TUAN, H. M., HUONG, V. T. Q., HIRAYAMA, K. The Association of Cytokines with Severe Dengue in Children. *Trop. Med. Health.* v. 42, n. 4, p. 137-144, 2014.

MANZELLA, J. P., ROBERTS, N. J. Human macrophage and lymphocyte responses to mitogen stimulation after exposure to influenza virus, ascorbic acid, and hyperthermia. *J. Immunol.* v. 123, n. 5, p. 1940-1944, 1979.

MELO, A. L. A., PAULINO, R. C., CASTRO, E. A., SOCCOL, V. T., SOCCOL, C. R. Distribuição espacial da dengue no estado do Paraná, Brasil, 2009-2012. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.* v. 4, 4, p. 223-228, 2014.

MENDEZ, J. A., USME-CIRO, J. A., DOMINGO, C., REY, G. J., SANCHEZ, J. A., TENORIO, A., GALLEGO-GOMEZ, J. C. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol. J.* v 7, n. 226, p. 1-12, 2010.

MENDONÇA, F. A., SOUZA, A. V., DUTRA, D. A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Soc. Nat.* v. 21, n. 3, p. 257-269, 2009.

Ministério da Saúde, 2013. **Levantamento Rápido de Índices para Aedes Aegypti – LIRAA – Para Vigilância Entomológica do Aedes Aegypti no Brasil. Metodologia para avaliação dos índices de Breteau e predial e tipo de recipientes.** Brasília – DF. Disponível em < http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_liraa_2013.pdf >, último acesso em 20/04/2018.

Ministério da Saúde, 2015. **Boletim Epidemiológico Volume 46. Nº 1 - 2015**. Disponível em < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2014-042-ok-50.pdf>>, último acesso em 19/06/2017

Ministério da Saúde, 2016a. **Boletim Epidemiológico. v. 47**. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/17/2016-019.pdf>>, último acesso em: 18/04/2018.

Ministério da Saúde, 2016b. **Dengue. Diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. Ed. 5. Brasília- DF. Disponível em < <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>>, último acesso em 18/04/2018.

Ministério da Saúde, 2017. **Casos de Dengue, Brasil, Grande Regiões e Unidades Federadas, de 1990 a 2016**. Disponível em < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classica-ate-2016.pdf>>, último acesso em 18/04/2018.

MISHRA, B., SHARMA, M., PUJHARI, S. K., RATHO, R. K., GOPAL. D. S., KUMAR, C. N., SARANGI, G., CHAYANI, N., VARMA, S. C. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.** v. 71, n. 2, p. 118-125. 2011.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S. C. Structure of the Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. **Nature.** v. 427, p. 313-319, 2004.

MONGKOLSAPAYA, J., DEJNIRATTISAI, W., XU, X.N., VASANAWATHANA, S., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., CHAIRUNSRI, A., SAWASDIVORN, S., DUANGCHINDA, T., DONG, T., ROWLAND-JONES, S., YENCHITSOMANUS, P.T., MCMICHAEL, A., MALASIT P., SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat. Med.** v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MONGKOLSAPAYA, J., DUANGCHINDA, T., DEJNIRATTISAI, W., VASANAWATHANA, S., AVIRUTNAN, P., JAIRUNGSRI, A., KHEMNU, N., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., CHOTIYARNWONG, P., SAE-JANG, K., KOCH, M., JONES, Y., MCMICHAEL, A., XU, X., MALASIT, P., SCREATON, G. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **J. Immunol.** v. 176, n. 6, p. 3821-3829, 2006.

MONTENEGRO, D., RAMOS, L. H., MACIEL, L. T., CORREIA, O. D. S., ANTUNES, L. A. F., BEZERRA, M. J., VASCONCELOS, P. G. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol. 39, p. 9-13, 2006.

MORRISON, J., AGUIRRE, S., FERNANDEZ-SESMA, A. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. **Viruses.** v. 4, n. 3, p. 397-413, 2012.

MORRISON, J. & GARCÍA-SASTRE, A. STAT2 signaling and dengue virus infection. **JAKSTAT.** v. 3, n. 1, p. 1-6, 2014.

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. J. & ROSSMAN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

MULLBACHER, A., LOBIGS, M., HLA, R. T., TRAN, T., STEHLE, T., SIMON, M. M. Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis. **J. Immunol.** v. 168, n. 1, p. 145-150, 2002.

MUNOZ-JORDÁN, J. L., SÁNCHEZ-BURGOS, G. G., LAURENT-ROLLE, M. GARCÍA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

MUNOZ-JORDÁN, J. L., SANTIAGO, G. A., MARGOLIS, H., STARK, L. Genetic relatedness of dengue viruses in Key West, Florida, USA, 2009-2010. **Emerg. Infect. Dis.** v. 19, n. 4, p. 652-654, 2013.

MURRAY, N. E. A., QUAM, M. B., WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin. Epidemiol.** v. 5, p. 299-309, 2013.

NASIRUDEEN, A. M., WONG, H. H., THIEN, P., XU, S., LAM, K. P., LIU, D. X. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 5, 1, 2011.

NIMMANNITYA, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. **Southeast Asian J. Trop. med. Public Health.** v. 18, n. 3, p. 392-397, 1987.

NISALAK, A., ENDY, T. P., NIMMANNITYA, S., KALAYANAROOK, S., THISAYAKORN, W., SCOTT, R. M., BURKE, D. S., HOKE, C. H., INNIS, B. L., VAUGHN, D. W. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NOGUEIRA, R. M., MIAGOSTOVICH, M. P., LAMPE, E., SOUZA, R. W., ZAGNE, S. M., SCHATZMAYR, H. G. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol. Infect.** v. 111, n. 1, p. 163-170, 1993.

NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., FILIPPIS, A. M. B., PEREIRA, M. A. P., SCHATZMAYR, H. G. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NORIS, M., REMUZZI, G. Overview of Complement Activation and Regulation. **Seminars in Nephrology.** v. 33, n. 6, p. 479-492, 2013.

NUNES, P. C., SAMPAIO, S. A., DA COSTA, N. R., DE MENDONÇA, M. C., LIMA, R., ARAÚJO, S. E., DOS SANTOS, F. B., SIMÕES, J. B., GONÇALVES, S., NOGUEIRA, R. M., FILIPPIS, A. M. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. **J. Med. Virol.** v. 88, n. 7, p. 1130-1136. 2016.

OKAMURA, H., KASHIWAMURA, S., TSUTSUI, H., YOSHIMOTO, T., NAKANISHI, K. Regulation of interferon-gamma production by IL-2 and IL-18. **Curr. Opin. Immunol.** v. 10, p. 259-264, 1998.

OLKOWSKI, S., FORSHEY, B. M., MORRISON, A. C., ROCHA, C., VILCARROMERO, S., HASEY, E. S., KOCHER, TY. J., SCOTT, T. W., STODDARD, S. T. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. **J. Infect. Dis.** v. 208, n. 6, p. 1026-1033, 2013.

Organização Mundial da Saúde. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** 2009. Disponível em < <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>, último acesso em 18/04/2018.

Organização Mundial da Saúde, 2016. **Dengue Control.** Disponível em < <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>> último acesso em 18/04/2018.

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

PAL, S., DAUNER, A. L., MITRA, I., FORSHEY, B. M., GARCIA, P., MORRISON, A. C., HALSEY, E. S., KOCHER, T. J., WU, S. J. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. **PLoS One.** v. 9, n. 11, 2014.

PANDEY, N., JAIN, A., GARG., R. K., KUMAR, R., AGRAWAL, O. P., LAKSHAMANA, R. P. V. Serum levels of IL-8, IFN γ , IL-10, and TGF β and their gene expression levels in severe and non-severe cases of dengue virus infection. **Arch, Virol.** v. 160, n. 6, p. 1463-1475, 2015.

PANG, J., SALIM, A., LEE, V. J., HIBBERD, M. L., CHIA, K. S., LEO, Y. S., LYE, D. C. Diabetes with hypertension as risk factors for adult dengue hemorrhagic fever in a predominantly dengue serotype 2 epidemic: a case control study. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 5, 2012.

PARAMESWARAN, P., WANG, C., TRIVEDI, S. B., ESWARAPPA, M., MONTOYA, M., BALMASEDA, A., HARRIS, E. Intrahost Selection Pressures Drive Rapid Dengue Virus Microevolution in Acute Human Infections. **Cell Host Microbe.** v. 22, n. 3, p. 400-410, 2017.

PAULA, E. V. **Evolução espaço-temporal da dengue e variação termo-pluviométrica no Paraná: Uma abordagem geográfica.** Editora UFPR, n. 10, p 33-48, 2005.

PEELING, R. W., ARTSOB, G., PELEGRINO, J. L., BUCHY, P., CARDOSA, M. J., DEVI, S., ENRIA, D. A., FARRAR, J., GUBLER, D. J., GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. C., HUNSPERGER, E., KLIKS, S., MARGOLIS, H. S., NATHANSON, C. M., NGUYEN, V., C., RIZZO, N., VÁZQUEZ, S., YOKSA, S. Evaluation of diagnostic testes: dengue. **Nat. Rev. Microbiology.** v. 8, p. 30-37, 2010.

PELLETIER, M., MAGGI, L., MICHELETTI, A., LAZZERI, E., TAMASSIA, N., CONSTANTINI, C., COSMI, L., LUNARDI, C., ANNUNZIATO, F., ROMAGNANI, S.,

CASSATELLA, M. A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**. v. 115, n. 2, p. 335-343, 2010.

PENA, S. D. J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **Hist. Cienc. Saúd. Manguinhos**. v. 12, n. 1, p. 321-346, 2005.

PERERA, R. & KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

PHAM, H. V., DOAN, H. T. M., PHAN, T. T. T., MINH, N. N. T. Ecological factors associated with dengue fever in a central highlands Province, Vietnam. **BMC. Infect. Dis.** v. 11, n. 172, p. 1-6, 2011.

PINTO, L. M., OLIVEIRA, S. A., BRAGA, E. L., NOGUEIRA, R. M., KUBLEKA, C. F. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 94, n. 3, p. 387-394, 1999.

PONG, W. L., HUANG, Z. S., TEOH, P. G., WANG, C. C. WU. H. N. RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins. **FEBS Lett.** v. 585, n. 16, p. 2575-2581, 2011.

PUERTA-GUARDO, H., GLASNER, D. R., HARRIS, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. **PLoS Pathog.** v. 12, n. 7, 2016.

RAGHUPATHY, R., CHATURVEDI, U.C., AL-SAYER, H., ELBISHBISHI, E.A, AGARWAL, R., NAGAR, R., KAPOOR, S., MISRA, A., MATHUR, A., NUSRAT, H., AZIZIEH, F., KHAN, M.A., MUSTAFA, A.S. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **J. Med. Virol.** v. 56, n. 3, p. 280-285, 1998.

RAJAPAKSE, S., RODRIGO, C., RAJAPAKSE, A. Treatments of Dengue Fever. **Infect. Drug. Resist.** v. 5, p. 103-112, 2012.

RESTREPO, B. N., ISAZA, D. M., SALAZAR, C. L., RAMÍREZ, R., ORPINA, M., ALVAREZ, L. G. Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama in infants with and without dengue. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, n. 1, p. 6-10, 2008.

REY, F. A., HEINZ, F. X., MANDI, C., KUNZ, C., HARRISON, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**. v. 377, p. 668-675, 1995.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**. v. 174, n. 2, p. 479-493, 1990.

RODHAIN, F. & ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Cambridge: Ed. University Press**. p. 45-61, 1997.

RODRIGUES, M. M., MARQUES, G. R. A. M., SERPA, L. L. N. S., ARDUINO, M. B., VOLTOLINI, J. C., BARBOSA, G. L., ANDRADE, V. R., LIMA, V. L. C. Density of *Aedes*

aegypti and *Aedes albopictus* and its association with number of residents and meteorological variables in the home environment of dengue endemic area, São Paulo, Brazil. **Parasit Vectors**. v. 8, p. 1-9, 2015.

ROEHRIG, J. T., BUTRAPET, S., LISS, N. M., BENNET, S. L., LUY, B. E., CHILDERS, T., BOROUGHS, K. L., STOVALL, J. L., CALVERT, A. E., BLAIR, C. D., HUANG, C. Y. H. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. **Virology**. v 442, n, p 114-125, 2013.

ROSEN, L., GUBLER, D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 23, 6, p. 1153-1160, 1974.

SA-NGASANG, A., ANANTAPREECHA, S., A-NUEGOONPIPAT, A., CHANAMA, S., WIBULWATTANAKIL, S., PATTANAKIL, K., SAWANPANYAKERT, P., KURANE, I. Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Epidemiol. Infect.** v. 134, n. 4, p. 820-825, 2006.

SABIN, A. B. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriol. Rev.** v. 14, n. 3, p. 225-232, 1950.

SANGKAWIBHA N., ROHANASUPHOT, S., AHANDRIK, S., VIRIYAPONGSE, S., JATANASEN, S., SALITUL, V., PHATHUMACHINDA, B., HALSTEAD, S. B. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. **Am. J. Epidemiol.** v 120, n. 5, p. 653-669, 1984.

SCHATZMAYR, H. G., NOGUEIRA, R. M. R., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 81, n. 2, 1986.

SCHERER, W. F., RUSSEL, P. K., ROSEN, L., CASALS, J., DICKERMAN, R. W. Experimental infection of chimpanzees with dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 27, n. 3, p. 590-599, 1978.

SCHNEIDER, J., DROLL, D. **A Time Line for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First Occurrences.** Washington, DC: Pan American Health Organization. v. 87, n. 4, p. 584-593, 2001.

SCHOENBORN, J. R., WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv. Immunol.** v. 96, p. 41-101, 2007.

SCHUL, W., LIU, W., XU, H. Y., FLAMAND, M., VASUDEVAN, S. G. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. **J. Infect. Dis.** v. 195, n. 5, p. 665-674, 2007.

SCREATON, G. MONGKOLSAPAYA, J., YACOUB, S. ROBERTS, C. New Insights into The Immunopathology and Control of Dengue Virus Infection. **Nat. Rev. Immunol.** v.15, p. 745-759, 2015.

SENARATNE, T., CARR, J., NOORDEEN, F. Elevation in liver enzymes is associated with increased IL-2 and predicts severe outcomes in clinically apparent dengue virus infection. **Cytokine** v. 83, p. 182-188, 2016.

SESA Paraná, 2014. **Situação da Dengue no Paraná. 2013-2014. Informe Técnico 18 – Período 2013/2014 – Semana 31/2013 a 30/2014.** Disponível em <http://www.dengue.pr.gov.br/arquivos/File/Dengue_Informe_Tecnico18_2013_2014_SE_30_ATUALIZACAO.pdf>, último acesso em 18/04/2018.

SHEPARD, D. S., UNDURRAGA, E. A., HALASA, Y. A. Economic and Disease Burden of Dengue in Southeast Asia. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7, n. 2, 2013.

SHRESTA, S., KYLE, J. L., SNIDER, H. M., BASAVAPATNA, M., BEATTY, P. R., HARRIS, E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **J. Virol.** v. 78, n. 6, p. 2701-2710, 2004.

SIERRA, B., KOURÍ, G., GUZMÁN, M. G. Race: A risk factor for dengue hemorrhagic fever. **Arch. of Virol.** v. 153, p. 533-542, 2007.

SIERRA, B., PEREZ, A. B., VOGT, K., GARCIA, G., SCHMOLKE, K., AGUIRRE, E., ALVAREZ, M., VOLK, H. D., GUZMAN, M. G. MCP-1 and MIP-1 α expression in a model resembling early immune response to dengue. **Cytokine** v. 52, n. 3, p. 175-183, 2010.

SILVA, R. M., ENDE-METSELAAR, V. D. H., MULDER, H. L., SMIT, J. M., RODENHUIS-ZYBERT, I. A. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. **Sci. Rep.** v. 6., p. 1-9, 2016.

SINGLA, M., KAR, M., SETHI, M., KABRA, S. K., LODHA, R., CHANDELE, A. MEDIGESHI, G. R. Immune Response to Dengue Virus Infection in Pediatric Patients in New Delhi, India—Association of Viremia, Inflammatory Mediators and Monocytes with Disease Severity. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 10, n. 4, 2016.

SIQUEIRA, J. B. JR., MARTELLI, C. M., COELHO, G. E., SIMPLICIO, A. C., HATCH, D. L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg. Infect. Dis.** v. 11, n. 1, p. 48-53, 2005.

SMIT, J. M., MOESKER, B., RODENHUIS-ZYBERT, I., WILSCHUT, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses.** v. 3, n. 2, p. 160-171, 2011.

SOUTHWOOD, T. R., MURDIE, G., YASUNO, M., TONN, R. K., READER, P. M. Studies on the life budget of *Aedes aegypti* in Wat Samphaya, Bangkok, Thailand. **Bull World Health Organ.** v. 46, n. 2, p. 211-226, 1972.

STEPHENS, H. A. HLA and other gene associations with dengue disease severity. **Curr. Top Microbiol. Immunol.** v. 338, p. 99-114, 2010.

- STORMER, K. A., MORRISON, T. E. Complement and viral pathogenesis. **Virology**. v. 411, n. 2, p. 362-373, 2011.
- SUHARTI C., VAN GORP E. C., DOLMANS W. M., SETIATI T. E., HACK C. E., DJOKOMOELJANTO R., van der MEER J. W. Cytokine Patterns During Dengue Shock Syndrome. **Eur Cytokine Netw**. v. 14, n. 3, p. 172-177, 2003.
- TANG, Y., KOU, Z., ZHANG, F., YAO, X., LIU, S., MA, J., ZHOU, Y., ZHAO, W., TANG, X., JIN, X. Both Viremia and Cytokine Levels Associate with the Lack of Severe Disease in Secondary Dengue 1 Infection among Adult Chinese Patients. **PLoS One**. v. 5, n. 12, 2010.
- TANIGUCHI, T., MATSUI, H., FUJITA, T., TAKAOKA, C., KASHIMA, N., YOSHIMOTO, R., HAMURO, J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**. v. 302. p. 305-10. 1983.
- TAPIA-CONYER, R., BETANCOURT-CRAVIOTO, M., MÉNDEZ-GALVAN, J. Dengue: an escalating public health problem in Latin America. **Paediatr Int Child Health**. v. 32. 2012.
- TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., BARRETO, M. L., BARRETO, F. R. Epidemiologia do dengue em Salvador-Bahia, 1995-1999. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. v. 34, n. 3, p. 269-274, 2001.
- TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N. C., BARRETO, M., BARRETO M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Public. Health**. v. 25, n. 1, p. 7-18, 2009.
- TEIXEIRA, M. G., SIQUEIRA, J. B. JR., FERREIRA, G. L., BRICKS, L., JOINT, G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v. 7, n. 12, 2013.
- TEMPORÃO, J.G., PENNA G. O., CARMO, E. H., COELHO, G. E., SILVA, D. S. A. R., NUNES, T. M. R., VASCONCELOS, D. C. P. F. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis**. v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.
- TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v. 28, n. 6, p. 1053-1059, 1979.
- THAI, K. T. D., NISHIURA, H., HOANG, P. L., TRAN, N. T. T., PHAN, G. T., LE, H. Q., TRAN, B. Q., NGUYEN, N. V., VRIES, P. J. Age-Specificity of Clinical Dengue during Primary and Secondary Infections. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v. 5, n. 6, 2011.
- THIELENS, N. M., TACNET-DELORME, P., ARLAUD, G. J., Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. **Immunobiology**. v 205, p. 563-574, 2002.
- THU, H. M., LOWRY, K., MYNT, T. T., SHWE, T. N., HAN, A. M., KHIN, K. K., THANT, K. Z., THEIN, S., AASKOV, J. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. **Emerg. Infect. Dis**.v. 10, n. 5, p. 584-597, 2004.

- TISONCIK, J. R., KORTH, M. J., SIMMONS, C. P., FARRAR, J., MARTIN, T. R., KATZE, M. G. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 76, n. 1, p. 16-32, 2012.
- TITTARELLI, E., MISTCHENKO, A. S., BARRERO, P. R. Dengue virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: towards local spread. **PLoS One**. v. 9, 2014.
- TUKASAN, C., FURLAN, N. B., ESTOFOLETE, C. F., NOGUEIRA, M. L., SILVA, N. S. Evaluation of the importance of fever with respect to dengue prognosis according to the 2009 WHO classification: a retrospective study. **BMC Infect. Dis**. v. 17, p. 1-6, 2017.
- UBOL, S., PHUKLIA, W., KALAYANAROOJ, S., MODHIRAN, N. Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. **J. Infect. Dis**. v. 201, n. 6, p. 923-935, 2010.
- VAJPAYEE, M., SINGH, U. B., SETH, P., BROOR, S. Comparative evaluation of various commercial assays for diagnosis of dengue fever. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**. v. 32, n. 3, p. 472-475, 2001.
- VASCONCELOS, P. F. C., LIMA, J. W. O., AMÉLIA, P. A., TRAVASSOS DA ROSA, TIMBÓ, M. J., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., LIMA, H. R., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: Inquérito soropidemiológico aleatório. **Rev. Saúde Pública**. v. 32, n. 5, p. 447-454, 1998.
- VAUGHN, D. W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A., NISALAK, A. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **J. Infect. Dis**. v 176, n. 2, p. 322-330, 1997.
- VAUGHN, D. W., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., INNIS, B. L., NIMMANNITYA, S., SUNTAYAKORN, S., ENDY, T. P., RAENGSAKULRACH, B., ROTHMAN, A. L., ENNIS, F. A., NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J. Infect. Dis**. v. 181, n. 1, p. 2-9. 2000.
- VAZQUEZ, S., CABEZAS, S., PÉREZ, A. B., PUPO, M., RUIZ, D., CALZADA, N., BERNARDO, L., CASTRO, O., GONZÁLEZ, D., SERRANO, T., SANCHEZ, A., GUZMÁN, M. G. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. **Int. J. Infect. Dis**. v. 11, n. 3, p. 256-262, 2007.
- WANG, S. M., SEKARAN, S. D. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IgM, and IgG. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v 83, n. 3, p. 690-695. 2010
- WANG, W-K., CHEN, H. L., YANG, C-F., HSIEH, S.-C., JUAN, C.-C., CHANG, S.-M., YU, C.-C., LIN, L.-H., HUANG, J.-H., KING, C.-C. Slower Rates of Clearance of Viral Load and Virus-Containing Immune Complexes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Infectious Diseases**. v. 43, n. 8, p. 1023-1030, 2006.

WARRINGTON, R., WATSON, W., KIM, H. L., ANTONETTI, F. R. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy Asthma Clin. Immunol.** v. 7, p. 1-8, 2011.

WINKLER, G., MAXWELL, S. E., RUEMMLER, C., STOLLAR, V. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology.** v. 171, n. 1, p. 302-305. 1989.

WU, S. J., GROUARD-VOGEL, G., SUN, W., MASCOLA, J. R., BRACHTEL, E., PUTVATANA, R., LOUDER, M. K., FILGUEIRA, L., MAROVICH, M. A., WONG, H. K., BLAUVELT, A., MURPHY, G. S., ROBB, M. L., INNES, B. L., BIRX, D. L., HAYES, C. G., FRANKEL, S. S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat. Med.** v. 6, n. 7, p. 816-820. 2000.

YAMADA, Y., MEAGER, A., YAMADA, A., ENNIS, F. A. Human Interferon Alpha and Gamma Production by Lymphocytes During the Generation of Influenza Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes. **J. Gen. Virol.** v 6, p. 2325-2334, 1986.

YEN, Y-T., CHEN, H.-C., LIN, Y.-D., SHIEH, C.-C., HSIEH, B. A. W. Enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha of Dengue Virus-Induced Endothelial Cell Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Species Is Key to Hemorrhage Development. **J. Virol.** v 82, n. 24, p. 12312-12324, 2008.

YEW, Y. W., YE, T., ANG, L. W., NG, L. C., YAP, G., JAMES, L., CHEW, S. K., GOH, K. T. Seroepidemiology of dengue virus infection among adults in Singapore. **Ann. Acad. Med. Singapore.** v. 38, n. 8, p. 667-675.

YOSHIMOTO, T., WE, P. CD4pos, NK1.1pos T-cells promptly produce Interleukin-4 in response to in-vivo challenge with anti-CD3. **J. Exp. Med.** v. 179, p. 1285-1295, 2000.

YOSHIMURA, T. & LEONARD, E. J. Secretion by human fibroblasts of monocyte chemoattractant protein-1, the product of gene JE. **The Journal of Immunology.** v. 144, n. 6, p. 2377-2383, 1990.

YU, I. M., HOLDAWAY, H. A., CHIPMAN, P. R., KUHN, R. J., ROSSMANN, M. G., CHEN, J. Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. **J. Virol.** v. 83, n. 23, p. 12101-12107, 2009.

ZAMREE, I., DRAKES, N., ROHANI, A., LEE, H. L. Sensitivity of Aedes albopictus C6/36 cells line for the detection and infectivity titration of dengue virus. **Trop. Biomed.** v. 22, n. 2, p. 217-219. 2005

ZHAO, Y., SOH, T. S., ZHENG, J., CHAN, K. W., PHOO, W. W., LEE, C. C., TAY, M. Y., SWAMINATHAN, K., CORNVIK, T. C., LIM, S. P., SHI, P. Y., LESCAR, J., VASUDEVAN, S. G., LUO, D. A crystal structure of the Dengue virus NS5 protein reveals a novel inter-domain interface essential for protein flexibility and virus replication. **PLoS Pathog.** v. 11, 3, 2015.

ZOU, J., XIE, X., WANG, Q. Y., DONG, H., LEE, M. Y., KANG, C., YUAN, Z., SHI, P. Y. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. **J. Virol.** v. 89, n. 7, p. 3455-3470. 2015.

ZUST, R., TOH, Y.X., VALDÉS, I., CERNY, D., HEINRICH, J., HERMIDA, L., MARCOS, E., GUILLÉN, G., KALINKE, U., SHI, P. Y., FINK, K. Type I interferon signals in macrophages and dendritic cells control dengue virus infection: implications for a new mouse model to test dengue vaccines. **J. Virol.** v. 88, n. 13, p. 7276-7285, 2014.

ANEXO A

Protocolo *Panbio Dengue Early Elisa*

Para esta avaliação, são disponíveis os seguintes materiais:

1. Placas de ELISA (12 x 8 poços) recobertas por anticorpo anti-NS1 e com antígenos IgG para os quatro sorotipos;
2. Solução Anti-NS1 MAb HRP conjugada: uma garrafa de 15 mL;
3. *Wash Buffer* (20x): uma garrafa de 60 mL;
4. *Sample Diluent*: uma garrafa com 22 mL;
5. Cromógeno (TMB): uma garrafa, 15 mL;
- 6; Controle positivo: uma via de 1,2 mL;
7. Calibrador: duas vias de 1,5 mL;
8. Controle negativo: uma via de 1,2 mL
9. *Stop Solution*

Primeiramente, deve-se retirar o número de poços que vão ser utilizados para a avaliação, e montar a placa de ELISA. São necessários 5 poços para os controles positivo, negativo e o calibrador em triplicata. Em seguida, os controles, o calibrador e as amostras devem ser diluídas utilizando 75 µL do *Sample Diluent*, e 75 µL da amostra. Agite bem. Em seguida, adicione 100 µL das amostras e controles em seus respectivos poços. Cubra a placa e incube durante 1 hora a 37°C ± 1°C. Depois do período de incubação, a placa deve ser lavada 6 vezes com o *Wash Buffer* previamente diluído em água destilada. Garanta que a placa esteja bem seca, e adicione 100 µL do cromógeno em cada poço, incube por 10 min à temperatura ambiente, contando o tempo a partir da administração deste na primeira amostra. Nesta etapa, a cor dos poços deve ficar azul. Após, adicione 100 µL de *Stop Solution* nos poços na mesma sequência da adição do cromógeno e incube à temperatura ambiente durante 10 min. A cor previamente azul mudará para amarelo, e dentro de 30 min leia a absorbância em 450 nm.

Para a avaliação dos resultados, primeiramente é realizado o cálculo do *index value* (abaixo), sendo a, b e c os resultados da leitura dos calibradores.

$$\frac{\text{absorbância da amostra}}{\left(\frac{a \cdot b \cdot c}{3}\right) \cdot y}$$

A partir do *index value*, os resultados da análise podem ser considerados como negativos, indeterminados e positivos, conforme a tabela abaixo:

Index Value relacionados quanto à positividade

Valor Index	Resultado
<0.9	Positivo
0.9-1.1	Inconclusivo
>1.1	Negativo

Fonte: Adaptado do protocolo Panbio[®]

ANEXO B

Protocolo *Dengue IgM Capture ELISA*

Para esta avaliação, são disponíveis os seguintes materiais:

1. Placas de ELISA (12 x 8 poços) recobertas por anticorpo anti-IgM humano;
2. Antígenos Dengue 1-4 (recombinantes): uma via de 150 µL
3. *Wash Buffer* (20x): uma garrafa de 60 mL;
4. *Sample Diluent*: duas garrafas com 50 mL;
5. *Antigen Diluent*: uma garrafa com 50 mL;
6. *HRP Conjugated Monoclonal Antibody Tracer*: uma garrafa, 7 mL;
7. Cromógeno (TMB): uma garrafa, 15 mL;
8. Controle positivo: uma via de 200 µL;
7. Calibrador: uma via de 400 µL;
8. Controle negativo: uma via de 200 µL;
9. *Stop Solution*: uma garrafa de 15 mL.

Primeiramente, deve-se retirar o número de poços que vão ser utilizados para a avaliação, e montar a placa de ELISA. São necessários 5 poços para os controles positivo, negativo e o calibrador em triplicata. Em seguida, dilua o antígeno em 1/250 utilizando o *Antigen Diluent* e depois dilua esta solução na proporção 1:1 com a solução *antigen-MAb Tracer*, deixando esta solução em temperatura ambiente até o uso. Em seguida, adicione 100 µL das amostras e controles em seus respectivos poços. Cubra a placa e incube durante 1 hora a 37°C ± 1°C. Depois do período de incubação, a placa deve ser lavada 6 vezes com o *Wash Buffer* previamente diluído em água destilada. Garanta que a placa esteja bem seca, e adicione 100 µL da solução com *antigen-MAb tracer* previamente preparada em cada poço, incube por 1 h a 37°C ± 1°C. Lave a placa 6x com *Wash Buffer* e em seguida administre 100 µL do cromógeno aos poços, incubando durante 10 min à temperatura ambiente, contando o tempo a partir da administração deste na primeira amostra. Nesta etapa, a cor dos poços deve ficar azul. Após, adicione 100 µL de *Stop Solution* nos poços na mesma sequência da adição do cromógeno e incube à temperatura ambiente durante 10 min. A cor previamente azul mudará para amarelo, e dentro de 30 min leia a absorbância em 450 nm.

Para a avaliação dos resultados, primeiramente é realizado o cálculo do *index value* (abaixo), sendo a, b e c os resultados da leitura dos calibradores.

$$\frac{\text{absorbância da amostra}}{\left(\frac{a \cdot b \cdot c}{3}\right) \cdot y}$$

A partir do *index value*, os resultados da análise podem ser considerados como negativos, indeterminados e positivos, conforme a tabela abaixo:

Index Value relacionados quanto à positividade

Valor Index	Resultado
<0.9	Positivo
0.9-1.1	Inconclusivo
>1.1	Negativo

Fonte: Adaptado do protocolo Panbio[®]

ANEXO C

Protocolo Dengue IgG Indirect ELISA

Para esta avaliação, são disponíveis os seguintes materiais:

1. Placas de ELISA (12 x 8 poços) recobertas por anticorpo anti-IgG humano;
2. *Wash Buffer* (20x): uma garrafa de 60 mL;
3. *Sample Diluent*: duas garrafas com 50 mL;
4. *HRP Conjugated Anti-Human IgG*: uma garrafa, 15 mL;
7. Cromógeno (TMB): uma garrafa, 15 mL;
- 8; Controle positivo: uma via de 200 µL;
7. Calibrador: uma via de 400 µL;
8. Controle negativo: uma via de 200 µL;
9. *Stop Solution*: uma garrafa de 15 mL.

Primeiramente, deve-se retirar o número de poços que vão ser utilizados para a avaliação, e montar a placa de ELISA. São necessários 5 poços para os controles positivo, negativo e o calibrador em triplicata. Em seguida, dilua 10 µL da amostra de soro em 90 µL de *Sample Diluent* e misture bem e adicione 100 µL das amostras e controles em seus respectivos poços. Cubra a placa e incube durante 30 min a 37°C ± 1°C. Depois do período de incubação, a placa deve ser lavada 6 vezes com o *Wash Buffer* previamente diluído em água destilada. Garanta que a placa esteja bem seca, e adicione 100 µL da solução *HRP conjugated anti-human IgG* em cada poço e incube por 30 min a 37°C ± 1°C. Lave a placa 6x com *Wash Buffer* e em seguida administre 100 µL do cromógeno aos poços, incube durante 10 min à temperatura ambiente, contando o tempo a partir da administração deste na primeira amostra. Nesta etapa, a cor dos poços deve ficar azul. Após, adicione 100 µL de *Stop Solution* nos poços na mesma sequência da adição do cromógeno e incube à temperatura ambiente durante 10 min. A cor previamente azul mudará para amarelo, e dentro de 30 min leia a absorbância em 450 nm.

Para a avaliação dos resultados, primeiramente é realizado o cálculo do *index value* (abaixo), sendo a, b e c os resultados da leitura dos calibradores.

$$\frac{\text{absorbância da amostra}}{\left(\frac{a \cdot b \cdot c}{3}\right) \cdot y}$$

A partir do *index value*, os resultados da análise podem ser considerados como negativos, indeterminados e positivos, conforme a tabela abaixo:

Index Value relacionados quanto à positividade

Valor Index	Resultado
<0.9	Positivo
0.9-1.1	Inconclusivo
>1.1	Negativo

Fonte: Adaptado do protocolo Panbio[®]

ANEXO D



Prefeitura Municipal de Cambé

ESTADO DO PARANÁ

Secretaria Municipal de Saúde Pública

4º LIRA'a/2012:

RESULTADO FINAL DO LEVANTAMENTO DE ÍNDICE RÁPIDO
4º LIRA'a (29 à 31/10/2012).

PERÍODO – 29/10/2012 à 31/10/2012	ESTRATO Nº. 01 (%)	ESTRATO Nº. 02 (%)	ESTRATO Nº. 03 (%)	ESTRATO Nº. 04 (%)
IP* - ÍNDICE PREDIAL	0,5%	1,0%	00	0,5%
IB* - ÍNDICE BRETEAU	0,5%	1,0%	00	0,5%
CP* - CRIADOURO PREDOMINANTE	A2 e D2	B e D2	-	D2
A1 – CAIXA D'ÁGUA	00	00	00	00
A2 – TANQUES/TAMBORES	50%	00	00	00
B – VASOS DE PLANTA	00	50%	00	00
C – DEPÓSITOS FIXOS	00	00	00	00
D1 - PNEUS	00	00	00	00
D2 – MATERIAL RECICLÁVEL	50%	50%	00	100%
E – DEPÓSITOS NATURAIS	00	00	00	00

Obs.: IP – índice por imóvel positivo;
IB – índice por criadouro positivo;
CP – cálculo de % de predominância de criadouro.

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO PREDIAL: 0,5%

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO BRETEAU: 0,5%

***CRIADOURO PREDOMINANTE: D2

Estrato 01: NOVA CAMBÉ; TERRA NOVA; DR: JOSÉ DOS SANTOS ROCHA; CAMBÉ III;; CAMBÉ V; CRISTAL; TUPI; SANTA IZABEL; ANA ROSA; ANA ROSA I; JD. DAS FLORES; PQ. INDUSTRIAL; NOSSA TERRA.

Estrato 02: CENTRO II; MORADA DO SOL; JD. SANTANA; VILA BRASIL; CENTRO I; VILA OPERÁRIA; CENTRO; JD. ALVORADA; VILAGE; MORUMBI e GUARANI.

Estrato 03: JD. UNIÃO; MANELA I; SANTO AMARO; BOA VISTA; SÃO PAULO; PQ. MANELLA; CASTELO BRANCO; CHÁCARAS SANTA MARIA; VILÁGIO DO ENGENHO, BELA ITÁLIA

Estrato 04: ANA ELIZA; NOVO BANDEIRANTE; CAIC; ANA ELIZA II; CAMPOS VERDES; ECOVILLE.

Rua Pará, 154 - Centro - cep: 86181-240 - Cambé/PR - Fone: 3174-0182
E-mail: denguecambe@yahoo.com.br - Site: <http://www.cambe.pr.gov.br>

ANEXO E



Prefeitura Municipal de Cambé

ESTADO DO PARANÁ

Secretaria Municipal de Saúde Pública

1º LIRA'a/2013:

RESULTADO FINAL DO LEVANTAMENTO DE ÍNDICE RÁPIDO
1º LIRA'a (22/07/2013 a 26/07/2013).

PERÍODO – 22/07/2013 a 26/07/2013	ESTRATO Nº. 01 (%)	ESTRATO Nº. 02 (%)	ESTRATO Nº. 03 (%)	ESTRATO Nº. 04 (%)
IP* - ÍNDICE PREDIAL	0,5%	0,8%	0,8%	0,3%
IB* - ÍNDICE BRETEAU	0,8%	0,8%	0,8%	0,3%
CP* - CRIADOURO PREDOMINANTE	A2	B,D1,D2	A2,B,D2	B
A1 – CAIXA D'ÁGUA	00	00	00	00
A2 – TANQUES/TAMBORES	100%	00	33%	00
B – VASOS DE PLANTA	00	33%	33%	100%
C – DEPÓSITOS FIXOS	00	00	00	00
D1 - PNEUS	00	33%	00	00
D2 – MATERIAL RECICLÁVEL	00	33%	33%	00
E – DEPÓSITOS NATURAIS	00	00	00	00

Obs.: IP – índice por imóvel positivo;
IB – índice por criadouro positivo;
CP – cálculo de % de predominância de criadouro.

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO PREDIAL: **0,6%**

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO BRETEAU: **0,7%**

***CRIADOURO PREDOMINANTE: **A2**

Estrato 01: NOVA CAMBÉ; TERRA NOVA; DR: JOSÉ DOS SANTOS ROCHA; CAMBÉ III;; CAMBÉ V; CRISTAL; TUPI; SANTA IZABEL; ANA ROSA; ANA ROSA I; JD. DAS FLORES; PQ. INDUSTRIAL; NOSSA TERRA.

Estrato 02: CENTRO II; MORADA DO SOL; JD. SANTANA; VILA BRASIL; CENTRO I; VILA OPERÁRIA; CENTRO; JD. ALVORADA; VILAGE; MORUMBI e GUARANI.

Estrato 03: JD. UNIÃO; MANELA I; SANTO AMARO; BOA VISTA; SÃO PAULO; PQ. MANELLA; CASTELO BRANCO; CHÁCARAS SANTA MARIA; VILÁGIO DO ENGENHO, BELA ITÁLIA

Estrato 04: ANA ELIZA; NOVO BANDEIRANTE; CAIC; ANA ELIZA II; CAMPOS VERDES; ECOVILLE.

Rua Pará, 154 - Centro - cep: 86181-240 - Cambé/PR - Fone: 3174-0182
E-mail: denguecambe@yahoo.com.br - Site: <http://www.cambe.pr.gov.br>

ANEXO F



Prefeitura Municipal de Cambé

ESTADO DO PARANÁ

Secretaria Municipal de Saúde Pública

1º LIRA'a/2014:

RESULTADO FINAL DO LEVANTAMENTO DE ÍNDICE RÁPIDO
1º LIRA'a (06/01/2014 a 10/01/2014).

PERÍODO – 06/01/2014 à 10/01/2014	ESTRATO Nº. 01 (%)	ESTRATO Nº. 02 (%)	ESTRATO Nº. 03 (%)	ESTRATO Nº. 04 (%)
IP* - ÍNDICE PREDIAL	7,3%	3,9%	3,6%	2,3%
IB* - ÍNDICE BRETEAU	7,3%	5,3%	3,8%	2,6%
CP* - CRIADOURO PREDOMINANTE	B2 – D2	B – D2	A2 - B	B
A1 – CAIXA D'ÁGUA	00	00	00	00
A2 – TANQUES/TAMBORES	1,16%	0,83%	1,19%	0,52%
B – VASOS DE PLANTA	2,04%	1,39%	1,42%	0,78%
C – DEPÓSITOS FIXOS	0,58%	00	00	0,52%
D1 - PNEUS	00	0,27%	0,23%	0,26%
D2 – MATERIAL RECICLÁVEL	3,50%	2,78%	0,95%	0,52%
E – DEPÓSITOS NATURAIS	00	00	00	00

Obs.: IP – índice por imóvel positivo;
IB – índice por criadouro positivo;
CP – cálculo de % de predominância de criadouro.

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO PREDIAL: **4,2%**

***ÍNDICE GERAL DO MUNICÍPIO BRETEAU: **4,7%**

***CRIADOURO PREDOMINANTE: **B**

Estrato 01: NOVA CAMBÉ; TERRA NOVA; DR: JOSÉ DOS SANTOS ROCHA; CAMBÉ III; CAMBÉ V; CRISTAL; TUPI; SANTA IZABEL; ANA ROSA; ANA ROSA I; JD. DAS FLORES; PQ. INDUSTRIAL; NOSSA TERRA; EUTHIMYO CASAROTO.

Estrato 02: CENTRO II; MORADA DO SOL; JD. SANTANA; VILA BRASIL; CENTRO I; VILA OPERÁRIA; CENTRO; JD. ALVORADA; MORUMBI e GUARANI.

Estrato 03: JD. UNIÃO; MANELA I; SANTO AMARO; BOA VISTA; SÃO PAULO; PQ. MANELLA; CASTELO BRANCO; CHÁCARAS SANTA MARIA; VILÁGIO DO ENGENHO, BELA ITÁLIA

Estrato 04: ANA ELIZA; NOVO BANDEIRANTE; CAIC; ANA ELIZA II; CAMPOS VERDES; ECOVILLE; AGUA DA ESPERANÇA.

Rua Pará, 154 - Centro - cep: 86181-240 - Cambé/PR - Fone: 3174-0182
E-mail: denguecambe@yahoo.com.br - Site: <http://www.cambe.pr.gov.br>


```

LRV 13/341 .....C.....T.....T.....A.....C.....C..
LRV 13/412 .....C.....T.....T.....C.....C.....
          640      650      660      670      680      690      700      710      720
LRV 13/369 ACAAAGAAAGAAATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCCTGCCATGGACTTCGGGGGCTTCAACATCTCAAGAG
LRV 14/467 .....A.....
LRV 14/893 .....A.....
LRV 14/1139 .....G.....C.....A.....C.....
LRV 14/1166 .....G.....C.....A.....C.....
LRV 14/993 .....G.....C.....A.....C.....
LRV 13/350 .....C.....A.....C.....
LRV 13/341 .....C.....A.....C.....
LRV 13/412 .....T.....C.....A.....C.....
          730      740      750      760      770      780      790      800      810
LRV 13/369 ACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCCATTCGAAGCAGCTCATGCAAGAAACAGGAAGTAGTCGTACTGGGATCACAGGAAGGAGCA
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....G.....
LRV 14/1166 .....T.....G.....
LRV 14/993 .....T.....G.....
LRV 13/350 .....T.....T.....G.....
LRV 13/341 .....T.....G.....
LRV 13/412 .....T.....G.....
          820      830      840      850      860      870      880      890      900
LRV 13/369 ATGCACACAGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACGTCAGGAACGACAACAATCTTCGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAAATG
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
LRV 14/1166 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
LRV 14/993 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
LRV 13/350 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
LRV 13/341 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
LRV 13/412 .....T.....C.....T.....T.....G.....T.....G.....
          910      920      930      940      950      960      970      980      990
LRV 13/369 GATAAACTGACCTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCAGCATGGAAGT
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....A.....
LRV 14/1166 .....T.....A.....
LRV 14/993 .....T.....A.....
LRV 13/350 .....T.....A.....
LRV 13/341 .....T.....A.....
LRV 13/412 .....T.....A.....
          1000     1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
LRV 13/369 GTCCCTAGTCAGTCAAAATGAAGGAACAGACCGCCATGCAAGATCCCTTCTCGACCCAGATGAGAAAGGATGACCCAGATGGG
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
LRV 14/1166 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
LRV 14/993 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
LRV 13/350 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
LRV 13/341 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
LRV 13/412 .....TT.....C.....T.....A.....T.....T.....T.....T.....
          1090     1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170
LRV 13/369 AGATTGATAACACCCATCCCATAGTTACTGACAAAGAAACCAAGTCAACATTGAGACAGAACCCCTTTTGGTGAAGCTACATCGTG
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....T.....T.....
LRV 14/1166 .....T.....T.....T.....
LRV 14/993 .....T.....T.....T.....
LRV 13/350 .....T.....T.....T.....
LRV 13/341 .....T.....T.....T.....
LRV 13/412 .....T.....T.....T.....
          1180     1190     1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
LRV 13/369 GTAGGGCAGGCGAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAAGAGGAGCAGCATAGGGAAAATGTTCCGAGCATCCGCCGAGGAGCA
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....A.....T.....

```



```

LRV 14/1166 .....T.....A.....T.....
LRV 14/993 .....T.....A.....T.....
LRV 13/350 .....T.....A.....T.....
LRV 13/341 .....T.....A.....T.....
LRV 13/412 .....T.....A.....T.....

```

1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350

```

LRV 13/369 CGAAGGATGGCTATCCTGGGAGACACCCCATGGGACTTCGGTTCATAGGAGGAGTGTTTACATCTGTGGGAAATGGTACATCAGGTT
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....C.....C.....T..C..G..C.....A..C..
LRV 14/1166 .....C.....C.....T..C..G..C.....A..C..
LRV 14/993 .....C.....C.....T..C..G..C.....A..C..
LRV 13/350 .....C.....C.....T..C..G..C.....A..C..
LRV 13/341 .....C.....C.....T..C..G..C.....A..C..
LRV 13/412 .....C.....C.....T..C..G..C.....C..A..C..

```

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440

```

LRV 13/369 TTTGGAACCCCATATGGGTTCTGTTAGCGGTGTTTCTTGACCATGAAAATAGGAATAGGGATTCGCTGACATGGTTGGGATTAAT
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....T.....C.....
LRV 14/1166 .....T.....C.....
LRV 14/993 .....T.....C.....
LRV 13/350 .....T.....C.....
LRV 13/341 .....T.....C.....
LRV 13/412 .....T.....A..C.....

```

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530

```

LRV 13/369 TCAAGGAGCACGTCACCTTCGATGACGTGCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCAGCGGATTCGGGATGT
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....A.....C.....
LRV 14/1166 .....A.....C.....
LRV 14/993 .....A.....C.....
LRV 13/350 .....A.....C.....
LRV 13/341 .....A.....C.....
LRV 13/412 .....A.....C.....

```

1540 1550 1560 1570

```

LRV 13/369 GTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTTAAATGTGGAAGTGGCATT
LRV 14/467 .....
LRV 14/893 .....
LRV 14/1139 .....G.....C.....C..
LRV 14/1166 .....G.....C.....C..
LRV 14/993 .....G.....C.....C..
LRV 13/350 .....G.....C.....C..
LRV 13/341 .....G.....C.....C..
LRV 13/412 .....G.....C.....C..

```


ANEXO I

Nome	Código de Acesso	País	Cidade/Região	Ano	Clado
JN713897_BR_RR_2010	JN713897	Brasil	Roraima	2010	A
KF444786_BRA_RR_2010	KF444786	Brasil	Roraima	2010	A
KF444785_BRA_RR_2009	KF444785	Brasil	Roraima	2009	A
KF444780_BRA_RR_2009	KF444780	Brasil	Roraima	2009	A
HM450104_BRA_RR_2008	HM450104	Brasil	Roraima	2008	A
KF444787_BRA_RR_2010	KF444787	Brasil	Roraima	2010	A
KF444792_BRA_RR_2010	KF444792	Brasil	Roraima	2010	A
KF444790_BRA_RR_2009	KF444790	Brasil	Roraima	2009	A
KF444784_BRA_RR_2009	KF444784	Brasil	Roraima	2009	B
KF444788_BRA_RR_2010	KF444788	Brasil	Roraima	2010	B
KF444791_BRA_RR_2009	F444791	Brasil	Roraima	2009	B
KF444783_BRA_RR_2009	KF444783	Brasil	Roraima	2009	B
KF444789_BRA_RR_2008	KF444789	Brasil	Roraima	2008	B
FJ639740_VEN_1998	FJ639740	Venezuela	Aragua	1998	C
FJ850104_VEN_2008	FJ850104	Venezuela	Aragua	2008	C
GU131837_VEN_2005	GU131837	Venezuela	Aragua	2005	C
GQ868560_COL_1998	GQ868560	Colombia	Santander	1998	C
GQ868560_COL_1998	GQ868559	Colombia	Santander	1998	C
AF425634_VEN_1997	AF425634	Venezuela	Aragua	1997	C
HM450079_BRA_CE_1994	HM450079	Brasil	Ceará	1994	D
JX669469_BRA_PE_1997	JX669469	Brasil	Pernambuco	1997	D
AF311956_BRA_PE_1997	AF311956	Brasil	Pernambuco	1997	D
KF672777_BRA_MG_1998	KF672777	Brasil	Minas Gerais	1998	D
KF672792_BRA_RJ_1999	KF672792	Brasil	Rio de Janeiro	1999	D
KF672763_BRA_ES_2000	KF672763	Brasil	Espírito Santo	2000	D
KF672782_BRA_RJ_2000	KF672782	Brasil	Rio de Janeiro	2000	D
HM450098_BRA_RN_2001	HM450098	Brasil	Rio Grande do Norte	2001	D
KF672783_BRA_ES_2002	KF672783	Brasil	Espírito Santo	2002	D
KF672778_BRA_ES_1998	KF672778	Brasil	Espírito Santo	1998	D
HM450090_BRA_MT_2002	HM450090	Brasil	Mato Grosso	2002	D
HM450091_BRA_MT_2002	HM450091	Brasil	Mato Grosso	2002	D
AY277658_ARG_2000	AY277658	Argentina	Buenos Aires	2000	D
JX669471_BRA_1999	JX669471	Brasil	Pernambuco	1999	D
KF672764_BRA_RJ_2001	KF672764	Brasil	Rio de Janeiro	2001	D
KF672788_BRA_RJ_2001	KF672788	Brasil	Rio de Janeiro	2001	D
HM450086_BRA_CE_2000	HM450086	Brasil	Ceará	2000	D
JX669475_BRA_PE_2002	JX669475	Brasil	Pernambuco	2002	D
KF672773_BRA_RN_1997	KF672773	Brasil	Rio Grande do Norte	1997	D
KF672775_BRA_CE_1998	KF672775	Brasil	Ceará	1998	D
KF672769_BRA_MG_1997	KF672769	Brasil	Minas Gerais	1997	D

KF672774 BRA RJ 1998	KF672774	Brasil	Rio de Janeiro	1998	D
JX669468 BRA PE 1997	JX669468	Brasil	Pernambuco	1997	D
KF672772 BRA RJ 1997	KF672772	Brasil	Rio de Janeiro	1997	D
AF311958 BRA PE 1997	AF311958	Brasil	Pernambuco	1997	D
AB519681 BRA DF 2001	AB519681	Brasil	Distrito Federal	2001	D
AF513110 BRA PR 2001	AF513110	Brasil	Paraná	2001	D
KF672787 BRA PI 2000	KF672787	Brasil	Piauí	2000	D
JX669474 BRA PE 2001	JX669474	Brasil	Pernambuco	2001	D
JX669473 BRA PE 2001	JX669473	Brasil	Pernambuco	2001	D
JX669472 BRA PE 2000	JX669472	Brasil	Pernambuco	2000	D
KP858119 BRA GO 2013	KP858119	Brasil	Goiás	2013	E
KP858114 BRA GO 2013	KP858114	Brasil	Goiás	2013	E
KC692513 ARG 2010	KC692513	Argentina	Buenos Aires	2010	E
KY369949 BRA SP 2013	KY369949	Brasil	São Paulo	2013	E
KC692511 ARG 2010	KC692511	Argentina	Buenos Aires	2010	E
GU131863 BRA SP 2008	GU131863	Brasil	São Paulo	2008	E
KP188567 BRA SP 2013	KP188567	Brasil	São Paulo	2013	E
KP858113 BRA GO 2013	KP858113	Brasil	Goiás	2013	E
KP858112 BRA GO 2013	KP858112	Brasil	Goiás	2013	E
KP858117 BRA GO 2013	KP858117	Brasil	Goiás	2013	E
KP858115 BRA GO 2013	KP858115	Brasil	Goiás	2013	E
KP858109 BRA GO 2013	KP858109	Brasil	Goiás	2013	E
JX669464 BRA PE 2010	JX669464	Brasil	Pernambuco	2010	E
KF672785 BRA ES 2010	KF672785	Brasil	Espírito Santo	2010	E
KF672759 BRA RJ 2010	KF672759	Brasil	Rio de Janeiro	2010	E
KP858116 BRA GO 2013	KP858116	Brasil	Goiás	2013	E
KP858111 BRA GO 2013	KP858111	Brasil	Goiás	2013	E
KP188544 BRA SP 2012	KP188544	Brasil	São Paulo	2012	E
KP858108 BRA GO 2013	KP858108	Brasil	Goiás	2013	E
KP858105 BRA GO 2013	KP858105	Brasil	Goiás	2013	E
KP858110 BRA GO 2013	KP858110	Brasil	Goiás	2013	E
KP858118 BRA GO 2013	KP858118	Brasil	Goiás	2013	E
JN982362 BRA CE 2010	JN982362	Brasil	Ceará	2010	F
JX669461 BRA PE 2010	JX669461	Brasil	Pernambuco	2010	F
KP188539 BRA SP 2010	KP188539	Brasil	São Paulo	2010	F
JX669465 BRA PE 2010	JX669465	Brasil	Pernambuco	2010	F
HM450088 BRA AP 2001	HM450088	Brasil	Amapá	2001	F
HM450089 BRA RR 2001	HM450089	Brasil	Roraima	2001	F
HM450095 BRA AM 2002	HM450095	Brasil	Amazonas	2002	F
KF672789 BRA ES 2001	KF672789	Brasil	Espírito Santo	2001	F
FJ850071 BRA NORTHERN 2000	FJ850071	Brasil	Norte	2000	F
HM450096 BRA MA 2003	HM450096	Brasil	Maranhão	2003	F
FJ850084 BRA NORTHERN 2005	FJ850084	Brasil	Norte	2005	F
HM450099 BRA AP 2005	HM450099	Brasil	Amapá	2005	F
FJ850070 BRA NORTHERN 2000	FJ850070	Brasil	Norte	2000	F

FJ850081 BRA NORTHERN 2004	FJ850081	Brasil	Norte	2000	F
HM450092 BRA PI 2002	HM450092	Brasil	Piauí	2002	F