

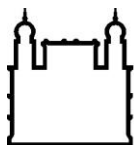
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

**Triagem de genótipos de arbovírus de importância clínico-epidemiológica no
Brasil: Dengue 4, Chikungunya e Zika**

CINTIA DAMASCENO DOS SANTOS RODRIGUES

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

CINTIA DAMASCENO DOS SANTOS RODRIGUES

**Triagem de genótipos de arbovírus de importância clínico-epidemiológica no Brasil:
Dengue, Chikungunya e Zika**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Medicina Tropical.

Orientador (es): Dra. Ana Maria Bispo de Filippis
Dr. Marcos César de Lima Mendonça

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017

Rodrigues, Cintia Damasceno dos Santos .

Triagem de genótipos de arbovírus de importância clínico-epidemiológica no Brasil: Dengue 4, Chikungunya e Zika / Cintia Damasceno dos Santos Rodrigues. - Rio de Janeiro, 2017.

xxii, 96 f.; il.

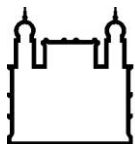
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: Ana Maria Bispo de Filippis.

Co-orientador: Marcos César de Lima Mendonça.

Bibliografia: f. 81-93

1. Pirosequenciamento. 2. Arbovírus. 3. Dengue 4. 4. Chikungunya. 5. Zika. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical

AUTOR: CINTIA DAMASCENO DOS SANTOS RODRIGUES

TRIAGEM DE GENÓTIPOS DE ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA
CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL: DENGUE, CHIKUNGUNYA E
ZIKA

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis Prof. Dr. Marcos César de Lima Mendonça

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Junior França de Barros (IOC/FIOCRUZ) - Presidente

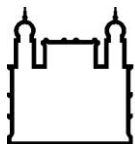
Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo (IMT - RN)

Prof. Dra. Gisela Freitas Trindade (Bio-Manguinhos/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Fernando do Couto Motta (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 17 de fevereiro de 2017.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho aqueles que me conduziram ao caminho do bem e me ensinaram o que é o amor em família: meus pais e meus irmãos, e ao meu noivo, Lidoan, meu companheiro de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela graça concedida, por me amparar nas horas em que mais precisei. Sem Ele, presente em todos os momentos, principalmente nos mais turbulentos, nada disso seria possível. A Ele toda minha gratidão.

Aos meus pais, Luiza e Fernando, que jamais mediram esforços para que este momento acontecesse. Por todo apoio, carinho, paciência e dedicação que tiveram e tem em todos os momentos da minha vida, principalmente neste. Agradeço a minha mãe por me fazer acreditar que nada é impossível e me mostrar que sou capaz de tudo o que eu quiser. São vocês a minha base e um dos principais motivos dos meus esforços.

Aos meus irmãos, Dannilo e Lais, sempre dispostos a me ajudarem no que fosse preciso. Ao meu irmão em especial, sempre amigo e tão dedicado, com sua calma e carinho, procura sempre fazer de tudo para me agradar.

Ao meu noivo, Lidoan, por todo carinho, dedicação, conselhos e principalmente, paciência. Obrigada por fazer eu me sentir sempre importante e apoiar todas as minhas escolhas e decisões. Por tolerar as minhas crises nervosas, principalmente agora, no fim de mais uma etapa. Peça fundamental na minha decisão para a realização deste mestrado.

A minha orientadora, **Dra. Ana Maria Bispo de Filippis**, por toda dedicação, pelos conhecimentos compartilhados, paciência e horas investidas com correções e explicações. Obrigada pelo carinho e preocupação dispostos a mim sempre que precisei. Valorizo cada conhecimento adquirido, bem como sua amizade, a qual sempre fará parte da minha vida. Pelo exemplo de profissional e mulher e, por todo apoio no decorrer da minha trajetória no Laboratório.

A **Dra. Rita Maria Nogueira**, a qual me concedeu a primeira oportunidade de fazer parte deste Laboratório; pelos ensinamentos passados e pela força de vontade contagiante. Sempre disposta a ajudar no que fosse preciso. Mais um exemplo de profissional, a qual me espelho.

Ao meu Co-orientador, **Dr. Marcos César Lima de Mendonça**, pelos ensinamentos (e foram muitos) transmitidos, pelas dúvidas tiradas sempre que precisei, pela paciência para ensinar o que eu precisava. Obrigada por todo empenho, dedicação e boa vontade em transmitir todo conhecimento.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos passados, em especial, a Prof. Dra. Martha Suarez Mutis, coordenadora da Pós Graduação em Medicina Tropical, por estar sempre pronta a atender não só as minhas, mas as necessidades de todos os alunos, tornando-se um exemplo e inspiração.

Aos amigos do Laboratório de Flavivírus, pelo auxílio dado e por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso, pela amizade e cumplicidade, além dos muitos momentos divertidos; Eliane Araújo, Simone Sampaio, Patrícia Sequeira, Allison Fabri, Carolina Santos, Marcelle Santos, Everton Rodrigues, Ronaldo Lapa, Sheila Cheles, José Farias, Leda Santos, Ana Lúcia Bastos e Solange Regina. Aos companheiros de trabalho mais recentes e não menos importantes: Ravi Mehta e Raquel Medialdea, sempre com uma palavra de carinho e incentivo, dispostos a ajudar no que fosse possível.

Aos amigos de turma (a famosa MedTrop2016), pelo companheirismo em todos os momentos ao longo destes dois anos.

As companheiras nesta jornada de dois anos (que mais pareceram dez), que se tornaram grandes amigas, Flávia Levy, Celeste Torres e Aline Santos, pelas risadas, carinho e companheirismo de sempre. Não tenho palavras para agradecer todos os momentos passados juntas. Um agradecimento especial a amiga Celeste, sempre paciente e disposta a ajudar, mesmo quando estava longe. Obrigada pelas aulas particulares que me ajudaram muito nos vários momentos de dúvidas, sugestões simples de experimentos e sempre procurando a forma mais fácil de transmitir seus conhecimentos. A amiga Flávia, que se tornou não somente uma amiga mas uma confidente. Meninas, obrigada por serem quem são e dedico a vocês essa frase: *“Assim como os perfumes alegram a vida, a amizade sincera dá ânimo para viver.”* Provérbios 27:9.

Agradeço ao Laboratório de Virologia Molecular pela parceria para realização deste projeto.

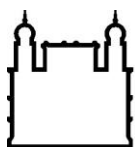
Ao Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo, por ter aceito ser o revisor deste trabalho.

Aos componentes da banca examinadora, Dr. José Junior França de Barros, Dra. Gisela Freitas Trindade, Josélio Maria Galvão de Araújo, Vanessa Salette de Paula e Fernando do Couto Motta, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram para a realização de mais este sonho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. ” (Cora Coralina)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

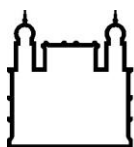
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TRIAGEM DE GENÓTIPOS DE ARBOVÍRUS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL: DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA

RESUMO

Os vírus Dengue, Zika e Chikungunya (DENV, ZIKV, CHIKV) são arbovírus, isto é, vírus transmitidos por artrópodes, responsáveis por infecções com sintomatologias agudas e inespecíficas com variado grau de intensidade. Desde a introdução do dengue na década de 80, mais de 10 milhões de casos já foram notificados no Brasil. Os primeiros casos autóctones confirmados de CHIKV no Brasil foram registrados no estado do Amapá, em 2014. Em abril de 2015 foi confirmada a introdução do ZIKV no país, no estado da Bahia e um após, ZIKV havia se espalhado por quase todo território brasileiro. Essas três arboviroses representam um enorme impacto para a saúde pública brasileira. O DENV e o ZIKV são arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e o CHIKV ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Ao contrário do DENV, que é subdividido em quatro sorotipos (DENV1-4), o CHIKV e ZIKV são sorotipos únicos, os três são vírus RNA e sujeitos a apresentar altas taxas de mutação devido a uma RNA polimerase intrinsecamente suscetível a erros. Dada a natureza desses vírus, aos rápidos ciclos de replicação, ao potencial epidêmico que adquirem, às possíveis mudanças de transmissibilidade, dentre outros fatores, geram-se variantes genéticas que costumam cumprir diferentes papéis nestes vírus, podendo assim, alterar a forma com que eles se comportam no vetor e no homem. Atualmente, diferentes métodos estão disponíveis para estudar os genomas virais e suas variações genotípicas, o sequenciamento parcial ou total do genoma por exemplo, fornece caracterização precisa de diferenças entre cepas do mesmo sorotipo, no entanto é um método laborioso e demorado. Dessa forma, com o objetivo de identificar de forma mais rápida genótipos circulantes em apoio à vigilância virológica, propomos o uso do pirosequenciamento PyroMark como um método alternativo, rápido, específico e eficaz na triagem e monitoramento de genótipos de DENV-4, CHIKV e ZIKV circulantes no Rio de Janeiro. Para desenho e escolha dos primers, as regiões E1, C e NS1 foram escolhidas para CHIKV, DENV-4 e ZIKV, respectivamente. A análise filogenética feita nas sequências parciais na porção da proteína E1 do CHIKV confirmaram os resultados obtidos no pirosequenciamento, demonstrando que as amostras estudadas pertenciam ao genótipo africano ECSA. Através do uso do pirosequenciamento fomos capazes de identificar e descrever pela primeira vez o genótipo ECSA nos primeiros casos autóctones do estado do Rio do Janeiro. Da mesma forma, o sequenciamento parcial das regiões de capsídeo de amostras de DENV-4 e NS1 de amostras de ZIKV, confirmou os resultados obtidos com o uso do pirosequenciador, em que as amostras analisadas de DENV-4 pertenciam aos genótipos I e II e, as de de ZIKV ao genótipo asiático. Os resultados desse estudo demonstraram que o pirosequenciamento pelo PyroMark pode ser um método alternativo eficiente, aplicado no monitoramento da introdução e circulação de genótipos de CHIKV, ZIKV e DENV-4.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

SCREENING ARBOVIRUS GENOTYPES OF CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE IN BRAZIL: DENGUE, CHIKUNGUNYA AND ZIKA ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Cintia Damasceno dos Santos Rodrigues

The viruses Dengue, Zika and Chikungunya (DENV, ZIKV, CHIKV) are arboviruses, ie, viruses transmitted by arthropods, responsible for infections with acute and nonspecific symptoms, which vary in intensity. Since the introduction of dengue in the 1980s, more than 10 million cases have already been reported in Brazil. The first confirmed autochthonous cases of CHIKV in Brazil were recorded in the state of Amapá in 2014. In April 2015, ZIKV was first described in Brazil, in the state of Bahia, one year after ZIKV was spreaded in almost all territory. These three arboviruses represent a huge impact on Brazilian public health. DENV and ZIKV are arboviruses belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* and CHIKV to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*. Unlike DENV, which is subdivided into four serotypes (DENV1-4), CHIKV and ZIKV are single serotypes, all three are RNA viruses and are subject to high mutation rates due to intrinsically error-prone RNA polymerase. Due to the nature of these viruses, the rapid cycles of replication, the potential epidemic they acquire, the possible changes in transmissibility among other factors, genetic variants are generated that often fulfill different roles in these viruses, can thus change the way in which they behave in the vector and in man. Currently, different methods are available to study viral genomes and their genotypic variations, partial or total genome sequencing for example, provides accurate characterization of differences between strains of the same serotype, however it is a laborious and time consuming method. In order to identify more rapidly circulating genotypes in support to virological surveillance, we propose the use of PyroMark pyosequencing as an alternative, fast, specific and effective method for screening and monitoring genotypes of DENV-4, CHIKV and ZIKV circulating in the state of Rio de Janeiro. Phylogenetic analysis of partial sequences in the CHIKV E1 protein portion confirmed the results obtained in the pyosequencing, demonstrating that the samples studied belonged to the African ECSA genotype. Through the use of pirosequencing we were able to identify and describe for the first time the ECSA genotype in the first autochthonous cases in the state of Rio do Janeiro. Likewise, the partial sequencing of the capsid regions of DENV-4 and NS1 samples from ZIKV samples confirmed the results obtained by the pyosequenciador, in which the analyzed samples of DENV-4 belonged to genotypes I and II and from de ZIKV to the Asian genotype. The results of this study demonstrated that PyroMark pyosequencing may be a fast, specific and efficient alternative method applied to monitor the introduction and circulation of CHIKV, ZIKV and DENV-4 genotypes.

SUMÁRIO

AUTOR: CINTIA DAMASCENO DOS SANTOS RODRIGUES	1
Agradecimentos.....	4
Sumário	10
Lista de Tabelas	16
Lista de Siglas e Abreviaturas	17
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Arbovírus	20
1.2 Histórico	22
1.2.1 Dengue	22
1.2.2 Zika	23
1.2.3 Chikungunya	24
1.3 Características gerais do DENV, ZIKV e CHIKV	24
1.4 Origem e evolução do vírus dengue (DENV)	26
1.5 Variabilidade genética e filogenia	28
1.5.1 Dengue	28
1.5.2 Zika	30
1.5.3 Chikungunya	32
1.6 Transmissão	34
1.7 Manifestações clínicas	34
1.8 Patogênese	37
1.9 Epidemiologia	40
1.9.1 Dengue	40
1.9.2 Zika	41
1.9.3 Chikungunya	43
1.10 Nas Américas.....	45
1.10.1 Dengue	45
1.10.2 Zika	46
1.10.3 Chikungunya	47
1.11 Brasil	48
1.11.1 Dengue	48
1.11.2 Zika	50
1.11.3 Chikungunya	51

1.12	Prevenção e controle	53
1.13	Caracterização molecular	55
1.14	Pirosequenciamento	56
1.15	Justificativa	59
2	OBJETIVOS	61
2.1	Objetivo Geral	61
2.2	Objetivos Específicos	61
3	MATERIAL E MÉTODOS	62
3.1	Amostragem	62
3.1.1	Critérios de Inclusão	62
3.1.2	Critério de não-inclusão	62
3.2	Desenho e escolha dos iniciadores	62
3.3	Extração do RNA viral	64
3.4	Protocolos utilizados na detecção DENV-4, CHIKV e ZIKV	64
3.4.1	RT-PCR, protocolo Lanciotti et al (1992) - Dengue 4	65
3.4.2	RT-PCR, protocolo Collao et al (2010) e qRT-PCR, protocolo Lanciotti et al (2007) - Chikungunya	65
3.4.3	RT-PCR em tempo real, protocolo Lanciotti et al (2008) - Zika	65
3.5	Seleção dos iniciadores para o pirosequenciamento	66
3.6	RT-PCR para genotipagem no pirosequenciamento	67
3.7	Metodologia	68
3.8	10mM desoxinucleotídeos (dNTPs)	69
3.9	Gel de agarose 1% em TBE 0,5X	69
3.10	Técnica de pirosequenciamento	70
3.10.1	Processo enzimático	71
3.10.2	Diluição do primer para o pirosequenciamento	72
3.10.3	Diluição da streptavidina Sepharose Beads	72
3.10.4	Hibridização do produto de PCR com beads e preparação do filtro na estação de trabalho	73
3.10.5	Análise das sequências	74
3.11	Técnica de sequenciamento por Sanger	75
3.11.1	Purificação de produto de RT-PCR diretamente da reação	

de RT-PCR para reação de sequenciamento	75
3.11.2 Metodologia	75
3.11.3 Quantificação do DNA	76
3.11.4 Análise das sequências	76
3.12 Considerações éticas	77
4 RESULTADOS	78
4.1 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para dengue 4	78
4.2 Caracterização molecular	79
4.3 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para ZIKV	83
4.4 Caracterização molecular	83
4.5 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para CHIKV	87
4.6 Caracterização molecular	87
5 DISCUSSÃO	92
6 PERSPECTIVAS	98
7 CONCLUSÕES	99
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
9. ANEXOS	112
9.1 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	112
9.2 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	113
9.3 Resumo enviado e aceito ao Congresso de Medicina Tropical 2016	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vias de transmissão e exposição humana a arbovírus zoonóticos (modificado de Iranpour et al. 2016).	21
Figura 2: Arbovírus emergentes nas Américas. (A) em 2005, e (B), em 2016 (Lima-Camara 2016).	22
Figura 3: A) Estrutura da partícula viral. B) Genoma do vírus dengue (DENV) e zika (ZIKV). Adaptado de Guzman et al. 2010 & Hottz et al. 2011.....	26
Figura 4: Estrutura da partícula viral do CHIKV.	26
Figura 5: Classificação da dengue, segundo a OMS 2009.	35
Figura 6: Modelo da teoria das infecções sequenciais por DENV (Whitehead et al. 2007).....	37
Figura 7: Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011 (WHO, 2013)	41
Figura 8: Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS, 1955–2011	41
Figura 9: Surtos ZIKV e vias de transmissão nas ilhas do Pacífico. O primeiro surto por ZIKV nas Ilhas foi relatado na Ilha de Yap, Micronésia (2007) e mais tarde transmitido para Polinésia Francesa em 2013 (indicado como número 1 e seta vermelha). A partir da Polinésia Francesa em 2013 (indicado como número 1 e seta vermelha). A partir da Polinésia Francesa, o vírus foi transmitido para Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilhas Cook (numeradas em ordem; 2, 3 e 4 e indicadas com setas vermelhas).	43
Figura 10: Rota do vírus chikungunya no mundo	45
Figura 11: Distribuição global dos sorotipos virais do dengue, 1970 (a) e 2011 (b) (adaptado de Gubler, 2011).	46
Figura 12: Casos autóctones e importados de ZIKV ao redor do mundo a partir de 2015. Os países com cores brancas não comunicaram qualquer caso importado em (números até setembro 2015)	47
Figura 13: Representação esquemática do sistema enzimático do pirosequenciamento. O nucleotídeo incorporado pela polimerase, liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A enzima ATP sulfúrilase, converte o PPi em ATP, que atua como substrato para produção de luz pela luciferase. A luz produzida é detectada, formando um pirograma, que indica a sequência de nucleotídeos	

incorporados durante o sequenciamento (Ahmadian, 2006)	58
Figura 14: Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento (PyroMark Q96 ID)	72
Figura 15: Estação de trabalho do PyroMark Q96 ID	74
Figura 16: Cartucho PyroMark Q96 (de cima) com compartimentos indicados para enzimas, substrato e nucleotídeos	74
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR para confirmação das amostras com DENV-4 (fragmento de ~ 252pb nested). Poços: 1 e 11 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 12 a 18: amostras com DENV-4; 19: controle positivo para DENV-4 (cepa referência genótipo II); 20: controle negativo (água livre de nucleases).....	78
Figura 18: Amostras pirosequenciadas (Sanger: amostras sequenciadas também por Sanger; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual)	80
Figura 19: Árvore filogenética baseada na região do capsídeo das 5 amostras de DENV-4. Método Neighbor-joining, modelo TN93+G. Suporte do teste de bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Círculos pretos representam as amostras de DENV-4 sequenciadas neste estudo. Cepas de DENV foram nomeadas da seguinte forma: País/Ano Número de acesso ao GenBank e País/Ano Número da amostra.	82
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR para confirmação das amostras com ZIKV (fragmento com ~359pb). Poço: 1 e 11 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 12 a 18: amostras positivas; 19: controle positivo para ZIKV; 20: controle negativo (água livre de nucleases)	83
Figura 21: Amostras pirosequenciadas (S: amostras sequenciadas também por SANGER; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual)	85
Figura 22: Árvore filogenética baseada na região NS1 das amostras de ZIKV. Método Neighbor-joining, modelo TN93+G. Suporte do teste de bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Círculos pretos representam as sequências de ZIKV analisadas. Cepas referência de ZIKV foram nomeadas da seguinte forma: País/Ano Número de acesso ao GenBank e País/Estado *Número da amostra/Ano.	86
Figura 23: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR (Collao 2010) para confirmação das amostras positivas para chikungunya (fragmento com ~469pb). Poços: 1 e 11 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp	

DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 13 a 19: amostras positivas; 20: controle positivo para CHIKV (cepa referência genótipo ECSA); 12: controle negativo (água livre de nucleases). **87**

Figura 24: Amostras pirosequenciadas (S: amostras sequenciadas também por SANGER; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual) **89**

Figura 25: Árvore filogenética baseada na região E1 das 9 amostras de CHIKV. Método Neighbor-joining, modelo GTR+I. Suporte do teste de bootstrap (1000 pseudo-réplicas). Círculos pretos representam as sequências de CHIKV analisadas. Cepas referência de CHIKV foram nomeadas da seguinte forma: País/Ano Número de acesso ao GenBank e País/Estado Número da amostra/Ano. **91**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica a proteína E, de acordo com Weaver & Vasilakis (2009) e Araújo et al. 2009.	30
Tabela 2: Conjunto de iniciadores e sondas utilizados na detecção dos agravos (rotina)	66
Tabela 3: Conjunto de iniciadores utilizados no estudo (*iniciadores marcados com biotina; em negrito: iniciadores utilizados no pirosequenciamento)	67
Tabela 4: Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR (* volume utilizado para CHIKV)	67
Tabela 5: Reagentes utilizados na reação de nested PCR	68
Tabela 6: Parâmetros de termociclagem da RT-PCR (*DENV-4, **CHIKV)	68
Tabela 7: Parâmetros de termociclagem da nested PCR (**CHIKV)	69
Tabela 8: Diluição dos desoxinucleotídeos em 10mM	69
Tabela 9: Reagentes utilizados para o preparo do gel de agarose	69
Tabela 10: Ordem de dispensação dos vírus	70
Tabela 11: Amostras de DENV-4 pirosequenciadas	79
Tabela 12: Amostras de ZIKV pirosequenciadas	84
Tabela 13: Amostras de CHIKV pirosequenciadas	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DENV – dengue vírus

DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 – dengue vírus sorotipo 1, 2, 3 e 4

YFV – febre amarela, do inglês, yellow fever vírus

ZIKV – zika vírus

CHIKV – chikungunya vírus

VEEV – vírus da encefalite equina venezuelana

JEV – vírus da encefalite japonesa

RNA – ácido ribonucleico

DNA – ácido desoxirribonucleico

VPSA – vírus da peste suína africana

MAYV – vírus Mayaro

WNV – vírus do Oeste do Nilo, do inglês, West Nile vírus

a.C –antes de Cristo

BWAV – vírus Bwamba

C – proteína estrutural de capsídeo

prM – precursora da proteína de membrana

E – proteína de envelope

NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 – proteínas não estruturais dos vírus dengue e zika

NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 – proteínas não estruturais do vírus chikungunya

3'NC – região não codificadora 3 linha

5'NC – região não codificadora 5 linha

aa – aminoácido (s)

FHD – febre hemorrágica do dengue

SDC – síndrome do choque por dengue

OFR – fase aberta de leitura, do inglês “open Reading frame”

MR766 – protótipo da cepa africana do zika vírus

ECSA – genótipo Sudeste-Centro-Sul Africano do vírus chikungunya

Ae. furcifer – *Aedes furcifer*

Ae. africanus – *Aedes africanus*

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

Ae. albopictus - *Aedes albopictus*

OMS – Organização Mundial de Saúde
ADE – facilitação dependente de anticorpo, do inglês antibody dependent enhancement
Ac – anticorpo
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
EUA – Estados Unidos da América
SE – semana epidemiológica
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância em Saúde
MS – Ministério da Saúde
SVS – Serviço de Vigilância em Saúde
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry
SGB – síndrome de Guillain-Barré
RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, em tempo real
IgM – imunoglobulina M
ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática
AP – Amapá
FSA – Feira de Santana
RJ – Rio de Janeiro
ES – Espírito Santo
BA – Bahia
BR – Brasil
ATP – adenosine trifosfato
PPi – pirofosfato
cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar
TCD8 – marcador de linfócito T
DEET – dietil-meta-toluamida
EBAAP – ethyl butylacetylaminopropionate
BLAST – ferramenta básica de pesquisa de alinhamento, do inglês Basic Local Alignment Search Tool
AVE – tampão de eluição

AW1, AW2 – tampão de lavagem 1 e 2

μL – microlitro

μM – micromolar

mg – miligrama

mL – mililitro

RPM – rotação por minute

dNTP – desoxinucleotídeo

TBE – tampão de lavagem

APS – adenosina 5 fosfosulfato

CEP – Comissão de Ética em Pesquisa

DA – dispensação automática

DM – dispensação manual

1 INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

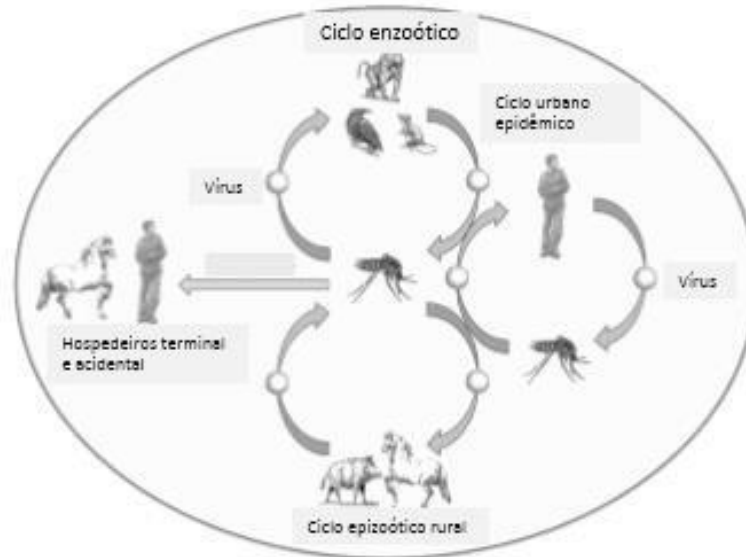
Com o surgimento de novas doenças infecciosas nos últimos anos e o espalhamento destas em diversas áreas do mundo, foi criada uma nova categoria de agentes patogênicos, denominados como agentes patogênicos emergentes e reemergentes. A maioria dos vírus emergentes são zoonóticos e transmitidos de animais para seres humanos, e entre estes vírus emergentes, os arbovírus desempenham um papel significativo (Pfeffer & Dobler, 2010).

A expressão “arbovirus” passou a ser utilizada em 1942 para representar um grupo de vírus de animais que se proliferavam em artrópodes hematófagos e que eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Em 1963 foi oficialmente recomendado pelo “International Subcommittee on Viral Nomenclature”, o uso deste termo para denominar vírus mantidos na natureza em ciclos regulares e que envolvessem a transmissão por artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados. Formada pela primeira sílaba das duas palavras do vocabulário inglês “**arthropode-borne**” e acrescidas da palavra **vírus**, os arbovírus constituem um grupo heterogêneo, do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas, possuindo, entretanto, certas características epidemiológicas em comum (GUBLER, 1988).

Pela definição, os arbovírus requerem no mínimo dois hospedeiros, sendo um vertebrado e um artrópode. Geralmente, os vírus produzem alta viremia nos hospedeiros vertebrados para os artrópodes tornarem-se infectados no repasto sanguíneo (KARABATSOS, 1985; GUBLER, 1988). Desta maneira, os arbovírus são vírus que se mantêm na natureza através da transmissão entre hospedeiros vertebrados e vetores artrópodes hematófagos, podendo também fazer parte do seu ciclo replicativo feito por transmissão vertical (transovariana), que ocorre nos artrópodes (World Health Organization, 1985). Em alguns ciclos de transmissão dos arbovírus, humanos e animais domésticos atuam como hospedeiros terminais, desenvolvendo uma viremia breve ou baixa, reduzindo a possibilidade de transmissão aos vetores artrópodes hematófagos (Weaver et al., 1999). Nos Dengue vírus (DENV), vírus Febre amarela (FAV), Zika vírus (ZIKV) e Chikungunya vírus (CHIKV), por exemplo, os humanos se tornaram o principal hospedeiro amplificador dentro do ciclo epidêmico urbano (Weaver & Barrett, 2004, Iranpour et al., 2016). Alguns outros, como vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e vírus da

Encefalite Japonesa (JEV), possuem animais domésticos, como cavalos e porcos, como amplificadores dentro de um ciclo de transmissão epizootico (Weaver et al., 1999, Brault et al., 2002, van den Hurk et al., 2009) (Figura 1).

Figura 1: Vias de transmissão e exposição humana a arbovírus zoonóticos (adaptado de Iranpour et al., 2016)

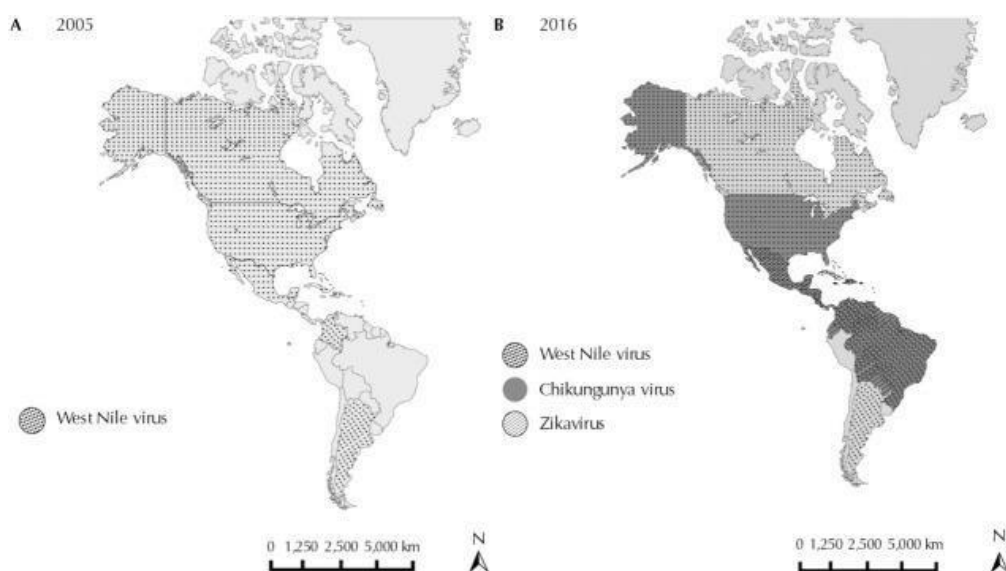


Os arbovírus incluem diversos grupos taxonomicamente distintos, e com uma grande variedade de vírus compostos por RNA. O único arbovírus já identificado, composto por DNA é o vírus da peste suína africana (VPSA). A falta de arbovírus composto por DNA sugere que os vírus compostos por RNA possuem uma taxa de mutação maior e ampla plasticidade genética, o que facilita o aumento da reprodução entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (Weaver, 2006). Estes vírus estão classificados em famílias as quais são constituídas por dois ou mais vírus que possuem relação antigênica. Dentre estas famílias estão: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Karabatsos N, 1985; Calisher & Karabastos, 1988; van Regenmortel et al., 2000). Arbovírus que possuem genoma composto por RNA podem ser segmentados ou não e apresentar-se com RNA de fita simples ou RNA de fita dupla. Os arbovírus com RNA não segmentados estão incluídos nas famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, enquanto aqueles com genomas segmentados incluem-se nas famílias *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (Beaty et al., 1988).

Atualmente, são descritas 534 espécies de arbovírus, com 14 gêneros, distribuídos em 8 famílias de vírus registrados no Catálogo Internacional de Arbovírus, sendo a maioria destes, zoonoses (Karabastos, 1985). Entre as espécies de arbovírus, 214 são causadores diretos ou prováveis de arboviroses. Outros 287 vírus são considerados como possíveis causadores de arboviroses, sendo somente 33 vírus listados como provável ou definitivamente não causadores de arboviroses (Gubler, 2002; Casseb et al., 2013). A maioria dos arbovírus com importância em Saúde Pública pertence a três famílias: Flaviviridae; Togaviridae, e Bunyaviridae (GUBLER, 1998).

Na América Latina, os principais arbovírus responsáveis por epidemias, incluídos na família *Flaviviridae*, são os vírus Febre amarela (VFA), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV), que circulam no continente americano de forma endêmica. Na família *Togaviridae*, são os vírus Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV). Ao mesmo tempo, ultimamente, tem ocorrido uma explosão de surtos de arboviroses emergentes, como chikungunya (CHIKV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e Zika (ZIKV) em todos os países das Américas (Lima-Camara, 2016; Paniz-Mondolfi et al., 2016) (Fig. 2).

Figura 2: Arbovírus emergentes nas Américas. (A) em 2005, e (B), em 2016 (LimaCamara, 2016)



1.2 Histórico

1.2.1 Dengue

As primeiras descrições clínicas conhecidas de uma doença semelhante a dengue (DENV) foram encontradas na literatura chinesa durante a Dinastia *Chin* (265-420a.C.), Dinastia *Tang* (610 a.C.) e Dinastia Northern Sung (992 a.C.) (Gubler, 1998). Esses relatos descreviam uma doença chamada "água envenenada", devido a sua relação com "insetos voadores associados a água". A descrição clínica incluía febre, exantema, artralgia mialgia e manifestações hemorrágicas. Aproximadamente 2000 anos depois, os primeiros surtos de dengue foram descritos nas Índias Ocidentais e no Panamá em 1635 e 1699, respectivamente. Em 1779 e 1780, epidemias simultâneas foram relatadas em três continentes (Ásia, África e América do Norte), o que provavelmente leva a crer que a dengue já apresentasse uma ampla distribuição geográfica antes do século XVIII, quando grandes epidemias ocorreram por todo o mundo (Gubler, 1998; Halstead, 1980).

A transmissão do DENV pelo *Aedes aegypti* foi demonstrada em 1906 por Bancroft, sendo confirmado posteriormente por outros estudos (Siler et al., 1926; Hastead, 1974; Rosen et al., 1954).

A relação entre os DENV e humanos começou no fim da década de 90, início do século 21, quando a distribuição global dos sorotipos de DENV se espelhou por quase todos os continentes. Este processo de espalhamento foi facilitado por diversos motivos, dentre eles, o crescimento das populações urbanas, o aumento da densidade vetorial, causado pela insuficiência de programas de controle e o grande aumento de viagens aéreas comerciais ou não (Weaver & Vasilakis, 2009).

1.2.2 Zika

O ZIKV foi descoberto no decorrer de um estudo do vetor responsável pelo ciclo silvestre de febre amarela (YFV), em Uganda, mais precisamente em 1947, ao longo de uma pesquisa de 10 anos (1937-1947). Um total de 10 vírus distintos foram isolados no Instituto de Pesquisa de Febre Amarela, em Entebbe, Uganda, incluindo 7 novos vírus: vírus do Oeste do Nilo (WNV) e Vírus Bwamba (BWAV) em 1937, o vírus da Floresta de Semliki em 1942, Vírus Bunyamwera e Vírus Ntaya em 1943 e Uganda S Vírus e ZIKV, em 1947. Com exceção do vírus Uganda S, todos esses vírus foram nomeados de acordo com os lugares geográficos onde foram isolados.

Quatro destes vírus foram relacionados, e pertencem ao gênero *Flavivirus* (WNV, Ntaya, vírus de Uganda S, e ZIKV). Algumas pesquisas de soroprevalência de ZIKV na África foram realizadas, mas por causa do grande número de flavivírus nessa região e a extensa reatividade cruzada entre os vírus desse gênero, os dados foram difíceis de interpretar. O fato destes vírus terem sido descobertos em Uganda não reflete necessariamente a origem dos vírus, mas sim, áreas em Uganda, onde estudos de febre amarela foram conduzidos (Musso & Gubler, 2016). Desde então, o vírus já foi isolado de outros mosquitos *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes africanus*, *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis*, *Aedes furcifer*, *Aedes vitattus*) e, mais recentemente, a partir de um mosquito doméstico, *Culex quinquefasciatus* (Basu & Tumban, 2016).

1.2.3 Chikungunya

A palavra chikungunya deriva da língua Makonde, região sudeste da Tanzânia e significa “aquele que se curva”, indicando a postura clássica que pacientes acometidos pela doença adquirem, devido às fortes dores articulares. O primeiro relato de um surto causado pelo vírus chikungunya (CHIKV), ocorreu na Tanzânia, em 1952-1953 (Mavalankar et al., 2008).

O primeiro surto confirmado de chikungunya foi relatado em 1952, em Makonde, na Tanzânia, África Oriental, onde o vírus foi isolado pela primeira vez. A primeira evidência de ciclo enzoótico de CHIKV silvestre foi descrito em Uganda e, posteriormente, em várias outras regiões da África Subsaariana, com transmissão principalmente por mosquitos arbóreos (Rossini et al., 2016).

1.3 Características gerais do DENV, ZIKV e CHIKV

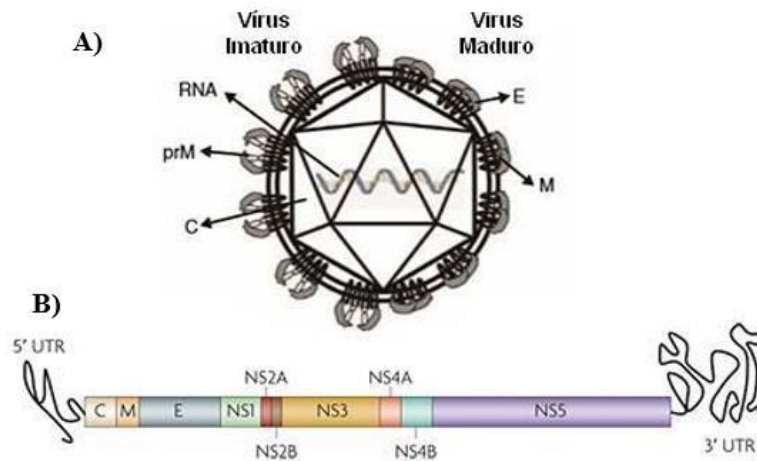
O vírus dengue (DENV), bem como Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) são arbovírus (vírus transmitido por artrópode), que pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (no caso do DENV e ZIKV) (Calisher, 1989; Musso & Gubler, 2016). Quanto ao vírus chikungunya, este pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* (Rossini et al., 2016). Os DENV são representados por quatro sorotipos antígenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Calisher, 1989), diferentemente do ZIKV, assim como o CHIKV que são sorotipos únicos (Haddow, 2012; Nunes et al., 2015). Estes vírus são mantidos na natureza por um ciclo de

transmissão que envolve hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem, o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção. Estruturalmente, os *Flavivirus* são esféricos e envelopados, que possuem entre 40 e 60nm de diâmetro, RNA de fita simples e polaridade positiva, de aproximadamente 11kb de comprimento, uma única fase aberta de leitura (ORF - open reading frame) codificando uma poliproteína precursora. Proteases virais e do hospedeiro clivam a poliproteína co-traducionalmente para gerar o conjunto de proteínas estruturais: capsídeo (C), precursora da proteína de membrana (prM), envelope (E) e as não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Chambers et al., 1990; Rice, 1986). Além disso, a região codificadora é flanqueada por regiões não traduzidas conservadas (5'NC e 3'NC), que parecem desempenhar importante papel na modulação da replicação e tradução do genoma viral (Alvarez et al., 2005; Chiu, Kinner, Dreher, 2005; Baronti et al., 2014). A Figura 3 demonstra a estrutura genômica e as proteínas mencionadas dos vírus DENV e ZIKV.

O genoma do CHIKV consiste numa molécula de RNA linear, de cadeia simples, polaridade positiva e com aproximadamente 11,8 kb (Strauss et al., 1984). Existem duas regiões de leitura abertas (ORFs); a primeira, 5' que codifica a poliproteína que é processada, para dar origem às proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). A outra ORF, separada da primeira por uma região de junção, ocupa aproximadamente o terço 3' do genoma e codifica uma segunda poliproteína que vai gerar as proteínas estruturais [C, E1, PE2 (E3+E2) e 6K] (Khan et al., 2002), como demonstrado na figura 4.

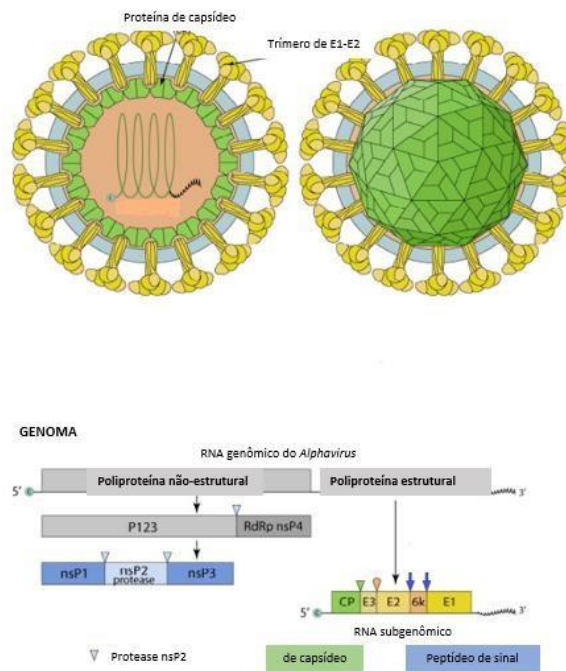
O tropismo do CHIKV nos seres humanos ainda não está completamente definido. Apesar da elevada viremia (10^8 cópias de RNA/ml), o CHIKV não se replica em linfócitos e monócitos primários. Para entrar nas células hospedeiras o CHIKV liga-se, através da glicoproteína E2 do invólucro viral, a receptores na superfície da célula ainda não identificadas e, após esta ligação o vírus é internalizado através de endocitose (Labadie et al., 2010).

Figura 3: A) estrutura da partícula viral. B) genoma do vírus dengue (DENV) e zika (ZIKV).



Fonte: Adaptado de Guzman et al., 2010 & Hottz et al., 2011.

Figura 4: Estrutura da partícula viral do CHIKV



Fonte: Retirado de viralzone.expasy.org e adaptado de Solignat M et al., 2009.

1.4 Origem e evolução do vírus dengue (DENV)

A origem dos vírus dengue (DENV) é um assunto bastante discutido. Alguns estudos sugerem que sua origem tenha sido no continente africano, devido à origem do seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (Edwards, 1932; Christophers, 1960). No entanto, estudos ecológicos e sorológicos realizados por Smith (1956) e Rudnick (1986) relatam a não susceptibilidade de seu antepassado, o *Aedes aegypti*

formosus, aos DENV na África (Diallo et al., 2005) e análises filogenéticas (Wang et al., 2000) direcionam para uma origem Asiática. Independentemente de sua origem, os DENV provavelmente evoluíram como um vírus de mosquitos arbóreos antes de adaptar-se aos primatas não humanos em ambientes silvestres (Gubler, 1997).

Ideias sobre a história do DENV podem também ser obtidas por reconstrução de uma escala de tempo molecular da sua evolução (Rambaut, 2000). Utilizando o método de máxima verossimilhança em uma grande quantidade de sequências do gene E, demonstrou-se que a evolução dos DENV segue um relógio molecular, ainda que tenham sido observadas taxas diferentes em linhagens específicas (Holmes & Twiddy, 2003).

A evolução do DENV tem tido um impacto importante sobre sua virulência para os seres humanos e a epidemiologia da doença em todo o mundo. Estudos filogenéticos são capazes de correlacionar genótipos específicos (dentro dos sorotipos) e gravidade da doença. Alguns vírus podem permanecer em ciclos silvestres de pequena ou baixa transmissibilidade para humanos, outros, podem causar doenças mais graves. O que já se sabe, é que o estado imunológico e possivelmente, características genéticas do hospedeiro também são determinantes de virulência ou manifestação da doença (Rico-Hesse, 2003).

Dentre os sorotipos de vírus dengue, o DENV-4 é o mais divergente, de forma geral ele está associado a formas mais brandas da doença, embora quadros graves também sejam descritos (Nunes et al., 2012).

Estudos realizados por Musso e Gubler (2016) demonstram substituições ocorridas no domínio II (aa52-132 e aa193-280) e domínio I (aa1-52, aa132-193 e aa280-296). Uma dessas substituições (E354 S-A) ocorreu ao longo do domínio III da proteína E, o mais variável de todos e que contém resíduos responsáveis por tropismo e virulência dos vírus dengue (Souza, 2014).

Estima-se que as taxas de substituição média do DENV sejam, $4,55 \times 10^{-4}$; $7,19 \times 10^{-4}$; $7,27 \times 10^{-4}$ e $11,58 \times 10^{-4}$ substituições/sítio/ano para DENV-1, DENV-2, DENV-4 e DENV-3, respectivamente. Esses valores são próximos às taxas de evolução de outros vírus RNA, mas um pouco menores que vírus RNA transmitidos por outros meios, o que pode revelar uma restrição estabelecida pela replicação em hospedeiros (Cordeiro, 2010).

Embora não tenha sido possível determinar uma relação direta entre um sorotipo ou genótipo particular de DENV e a severidade da epidemia da doença,

existem indicações de que certos genótipos de DENV-2 e de DENV-3 estejam associados a febre hemorrágica do dengue (DHF). Em geral, genótipos asiáticos parecem ser mais virulentos que os inicialmente encontrados nas Américas e no Pacífico Sul (Messer et al., 2003; Rico-Hesse et al., 1997; Watts et al., 1999). Sobre o DENV-4, pouco se conhece sobre sua virulência em relação aos outros sorotipos de dengue, além disso, no estado do Rio de Janeiro existem poucas referências disponíveis na literatura descrevendo a circulação do genótipo I e II de DENV-4, em poucas amostras analisadas e sem associação com quadro clínico (Campos et al., 2012).

1.5 Variabilidade genética e filogenia

1.5.1 Dengue

A grande variabilidade genética dos vírus RNA é observada devido ao alto grau de mutação associado com a RNA polimerase (RNA-dependente) e às suas rápidas taxas de replicação. Nos DENV, esta variabilidade genética resulta na existência dos quatro sorotipos antigenicamente distintos. Antes mesmo de se conhecer a sequência dos genes já se sabia que variações genéticas existiam dentro de cada sorotipo (Holmes & Twiddy, 2003). A evidência de diferentes genótipos entre os vírus DENV foi primeiramente detectada sorologicamente, usando anticorpos produzidos por inoculação em animais de laboratório (Sabin, 1952; Rico-Hesse, 2003).

Análises filogenéticas de DENV-1 baseadas nas sequências nucleotídicas da junção E/NS1 ou do gene E completo indicam a divisão do sorotipo em cinco genótipos: (1) genótipo I, representando cepas do Sudeste Asiático, China e Leste da África; (2) genótipo II, representando linhagens da Tailândia coletados na década de 1950 e 1960; (3) genótipo III, representando a cepa selvagem coletada na Malásia; (4) genótipo IV, representando cepas das ilhas do oeste do Pacífico e da Austrália; e o (5) genótipo V, representando todas as cepas derivadas das Américas, África Ocidental, e um número limitado de cepas da Ásia (Rico-Hesse, 1990; Vasilakis & Weaver, 2008) (Tabela 1).

Para DENV-2, análises filogenéticas baseadas em sequências de nucleotídeos do gene E caracterizou cinco genótipos distintos: (1) genótipo asiático, denominado genótipo asiático 1, representado por cepas da Malásia e Tailândia e

genótipo asiático 2, representado por cepas do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; (2) genótipo cosmopolita, que inclui cepas de ampla distribuição geográfica, possuindo cepas da Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Oceano Índico e Pacífico, Subcontinente Indiano e do Oriente Médio; (3) genótipo americano, com representantes da América Latina e cepas mais antigas do Caribe, Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico das décadas de 1950 e 1960; (4) genótipo Sudeste Asiático/Americano, incluindo cepas da Tailândia, do Vietnã e coletadas nas Américas nas duas últimas décadas, aproximadamente; e (5) genótipo silvestre, representando cepas de humanos, mosquitos silvestres, ou macacos sentinela no Oeste da África e Sudeste da Ásia (Rico-Hesse et al., 1997; Twiddy et al., 2002; Vasilakis & Weaver, 2008) (Tabela 1).

Inicialmente foram caracterizadas cinco genótipos para o DENV-3 pela técnica de fingerprinting, mas análises posteriores baseadas nas sequências correspondentes aos genes prM/E, e posteriormente, sequências do genoma completo caracterizaram quatro genótipos para este sorotipo: (1) genótipo I, representando cepas da Indonésia, Malásia, Filipinas e recentes isolados das ilhas do Pacífico Sul; (2) genótipo II, representando cepas da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; (3) genótipo III, com cepas da Sri Lanka, Índia, África e Samoa, e uma cepa da Tailândia de 1962; (4) genótipo IV representando cepas de Porto Rico, América Latina e Central e uma cepa antiga do Tahiti, de 1965; e genótipo V, representado inicialmente por três amostras: Filipinas (1956), Japão (1973) e China (1980) e atualmente incluídas as amostras da América do Sul (2002-2004). Estudos realizados por Araújo et al (2009) confirmaram a circulação do genótipo V, considerado extinto, no entanto, representado por cepas de DC/FHD, isoladas entre 2002 e 2004, na América do Sul. Embora cepas silvestres de DENV-3 não tenham sido isoladas, acredita-se que elas existem na Malásia, com base na soroconversão de macacos sentinelas (Vasilakis & Weaver, 2008) (Tabela 1).

Para o DENV-4, as análises filogenéticas baseadas no gene E e no genoma completo caracterizaram quatro genótipos distintos: (1) genótipo I, é representado por cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e do Japão (importados para o Japão a partir do Sudeste Asiático); (2) genótipo II, é representado por cepas da Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e Américas; (3) genótipo III, com amostras tailandesas recentes que são diferentes de outras cepas da Tailândia; e (4) o genótipo IV,

representando as cepas silvestres da Malásia (Weaver & Vasilakis, 2009; Vasilakis & Weaver, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica a proteína E, de acordo com Weaver & Vasilakis (2009) e Araújo et al. (2009).

Sorotipo	Genótipos	Distribuição geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V	Américas, África Ocidental e Ásia
DENV-2	Asiático I	Malásia e Tailândia
	Asiático II	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas dos Oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe, Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico (1950-1960)
	Sudeste Asiático/Americano	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul das Ilhas do Pacífico Sul
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980), América do Sul (2002-2004)
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

1.5.2 Zika

A cepa Yap 2007, e da Polinésia Francesa H / PF / 2013 de ZIKV, tiveram uma glicosilação na posição 154 do invólucro, e por este motivo, a glicoproteína tem sido descrita em várias flavivírus, mas não na estirpe protótipo ZIKV MR 766. Este local de glicosilação tem sido associado com um aumento na virulência. Tem-se sugerido, mas sem comprovação, que o protótipo ZIKV MR 766 tenha perdido esta glicosilação

durante passagens celulares em cérebro de camundongo. Com base nas sequências do genoma completo de ORFs, Haddow et al. (2012) descreveram duas linhagens principais de ZIKV; africanos (cepas da Nigéria, Senegal e Uganda) e asiática (Malásia 1966, Yap 2007 e Camboja 2010), sugerindo que ZIKV foi introduzido em Yap a partir do Sudeste Asiático e que tem circulado no Sudeste Asiático, pelo menos desde a década de 1960. Faye et al. (2014) sequenciaram as regiões E e NS5 do genoma de 43 cepas ZIKV isoladas entre 1947 e 2007 na África, Ásia e Oceania. Este estudo filogenético propôs dois grupos principais: estirpes africanas, protótipo ZIKV MR 766, cluster de Uganda, e o cluster da Nigéria; e estirpe asiática, da Micronésia ZIKV 2007 e Malásia (Musso & Gubler, 2016). Os autores sugeriram que ZIKV surgiu em Uganda (África Oriental) em torno de 1920 e deslocou-se para a África Ocidental, ocorrendo assim duas introduções independentes, da África Oriental até a África Ocidental, a primeira de Uganda para a Costa do Marfim e o Senegal, por volta de 1935 a 1940, relacionada ao concentrado de estirpes de protótipo MR 766 e a segunda, de Uganda à Nigéria e África Central, para o Senegal. O ZIKV provavelmente se mudou para a Ásia na década de 1940 e depois se espalhou por toda a região, formando a linhagem asiática (Faye et al., 2014). Estes achados corroboraram a existência das linhagens asiática e africana. Isto foi confirmado por Grard e colaboradores (2014), que sequenciou os genes E e NS3. Faye e colaboradores (2014) sugeriram que o ZIKV potencialmente passou por vários eventos de recombinação na natureza. No entanto, a recombinação em membros do gênero *Flavivirus* não foi demonstrada na natureza e sequer experimentalmente; estas recombinações foram detectadas apenas por análises filogenéticas computacionais (Faye et al., 2014).

De acordo com o sequenciamento parcial do gene codificante M / E, a estirpe da Polinésia Francesa esteve mais próxima da linhagem isolada no Camboja em 2010 que a linhagem Yap ZIKV 2007 (Cao-Lormeau et al., 2014), ambas pertencentes a linhagem asiática. As análises do sequenciamento de dois isolados coletados durante o surto polinésio francês evidenciaram a microevolução genômica durante a epidemia. Nas Américas, as sequências de ZIKV estavam disponíveis no Brasil, Colômbia, Porto Rico e Guatemala. Todos eles demonstraram mais de 99% de identidade nucleotídica com as estirpes polinésias francesas. Essas cepas americanas podem constituir um "grupo do Hemisfério Ocidental" com o genótipo asiático (Lanciotti et al., 2016). A estirpe isolada na Ilha de Páscoa (região NS5 do

gene) também apresentou 99,8% de identidade ao nível de nucleótidos com a estirpe da Polinésia Francesa. Supõe-se que dois desses eventos ocorreram, um no Estado de Yap e outro na Polinésia Francesa. A última cepa apresentou maior virulência e foi introduzida no Brasil em 2015 e do Brasil para outros países americanos. Uma hipótese alternativa é que o surgimento de uma doença grave associada ao ZIKV foi em função da ocorrência do mesmo. Eventos de baixa frequência como a SGB e a microcefalia só podem ser reconhecidos durante uma epidemia com grande número de casos, como os observados na Polinésia Francesa (aproximadamente 30.000 casos) e no Brasil (1.000.000 de casos) (Musso & Gubler, 2016). Assim, com os pouquíssimos casos humanos reconhecidos antes da epidemia do Estado de Yap, a possibilidade de cepas oriundas do ZIKV terem sido capazes de causar complicações graves não pode ser excluída, já que o número de casos humanos foi muito pequeno. A sequência parcial do gene codificante NS5 da linhagem isolada de um viajante retornando das Ilhas Maldivas em junho de 2015 era idêntica àquelas das cepas da Polinésia Francesa, Brasil e Ilha de Páscoa (Korhonen et al., 2016), sugerindo uma possível introdução do Pacífico ou Brasil.

1.5.3 Chikungunya

A análise filogenética do CHIKV identificou três genótipos geograficamente associados: África Ocidental, o Sudeste / Centro / Sul Africano (ECSA), e o genótipo asiático. As cepas CHIKV pertencem a diferentes linhagens geográficas e apresentam diferenças em seus ciclos de transmissão na Ásia, onde circulam principalmente em um ciclo de transmissão urbano envolvendo mosquitos peridomésticos (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e seres humanos. Já na África, o vírus é mantido num ciclo de transmissão zoonótico entre mosquitos presentes nas florestas (*Aedes spp*), como por exemplo, *Ae. furcifer*, *Ae. africanus*, e primatas não humanos e, emergências epidêmicas envolvendo ciclo silvestre e urbano onde os mosquitos peridomésticos transmitem aos seres humanos (Rossini et al., 2016).

Epidemias na África rural geralmente ocorrem em numa proporção muito menor do que na Ásia, provavelmente, resultado das densidades populacionais humanas inferiores e “imunidade de rebanho”, possivelmente, mais estável. Apesar de existirem pelo menos três genótipos, o CHIKV possui apenas um sorotipo.

Conseqüentemente, um surto em uma população gera “imunidade de rebanho”, conferindo proteção ao longo da vida. Isto pode explicar porque os surtos maciços de CHIKV ocorrem somente quando a população não imune é significativa em áreas endêmicas, o que geralmente leva décadas (Rossini et al., 2016).

Uma análise do código genético do vírus chikungunya sugere que o aumento da gravidade da situação em 2005 pode ter sido causado por uma alteração na sequência genética que alterou o segmento de E1 do vírus da proteína de revestimento viral, criando uma variante chamada E1-A226V. Esta mutação permite potencialmente que o vírus se multiplique mais facilmente nas células de mosquito (Schuffenecker et al., 2006).

Estudo conduzido por Arias-Goeta e colaboradores (2013) demonstraram que o surgimento de CHIKV em La Reunion foi associado a uma única alteração de nucleotídeo resultando em uma substituição de alanina (Ala) para uma valina (Val), na glicoproteína E1, posição 226 de uma cepa pertencente ao genótipo ECSA. As infecções experimentais mostraram que a variante E1-226V infecta as células do intestino médio de *Ae. Albopictus* mais eficientemente do que a variante E1-226A. Além disso, a variante E1-226V foi melhor disseminada e transmitida por *Ae. Albopictus*. Durante 2005-2006, a variante selecionada E1-226V espalhou-se pelas ilhas vizinhas no Oceano Índico: Mayotte, Mauritius e Madagascar, onde foi transmitida principalmente por *Ae. Albopictus*. Posteriormente, a análise filogenética mostrou que a substituição de aminoácidos E1-A226V em CHIKV emergiu quase simultaneamente em três ocasiões distintas: Oceano Índico, África Central e Ásia. Estudos posteriores mostraram que outras substituições no genoma viral, especialmente nos genes E1 e E2, conseguem bloquear a capacidade de alguns genótipos e são melhor transmitidos por *Ae. Albopictus* através da substituição E1A226V. Embora a substituição de aminoácidos na proteína E1 (E1-A226V) seja diretamente responsável por um aumento significativo na infecciosidade, disseminação e transmissão por *Ae. Albopictus*, o mecanismo molecular subjacente que conduz à seleção da variante E1-226V ainda é desconhecido (Arias-Goeta et al., 2013).

1.6 Transmissão

Fatores relacionados ao ambiente e fatores próprios do mosquito, do DENV e do hospedeiro influenciam a atividade de transmissão dessa doença e seu controle (Valle et al., 2015).

O vírus dengue é mantido na natureza por um ciclo de transmissão que envolve hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* (Gubler, 2002). Na África e Ásia a circulação dos DENV se mantêm em ciclos urbanos, silvestres e rurais, enquanto que em outros continentes a circulação é essencialmente urbana, envolvendo mosquitos com hábitos domésticos, como o *Aedes aegypti*. Em algum momento no passado, humanos ou mesmo primatas não humanos foram infectados por meio da exposição à picada de mosquitos silvestres, os quais estavam infectados pelo DENV. Esta infecção ocorreu quando estes primatas frequentaram o ambiente selvagem. Ao circularem virêmicos num ambiente alterado, permitiram a propagação do vírus por mosquitos domésticos (*Ae. aegypti* no caso da África e *Ae. Albopictus* na Ásia), tornando esse ciclo totalmente independente de reservatórios silvestres. A partir da implantação desse ciclo estritamente doméstico e peridomiciliar em portos marítimos, o vírus se espalhou pelo mundo simultaneamente com o seu vetor *Ae. aegypti* (Vasilakis et al., 2011).

A infecção do mosquito vetor (fêmea) pelo DENV se inicia a partir da ingestão de partículas virais infecciosas presentes no sangue humano virêmico. Após o repasto sanguíneo, é necessário um período de incubação, que varia entre 8 e 12 dias para que o vírus se replique no estômago do mosquito e chegue às glândulas salivares do mesmo. Estas partículas virais, agora infectantes, serão inoculadas em um novo hospedeiro durante o próximo repasto sanguíneo, recomeçando um novo ciclo (Salazar et al., 2007; Chan & Johansson, 2012).

Existe, ainda, uma transmissão do vírus, da fêmea do mosquito infectada para a sua progênie, por via transovariana ou vertical, sem necessidade de outro hospedeiro intermediário (Anderson & Rico-Hesse, 2006).

1.7 Manifestações clínicas

O homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver a doença, cuja apresentação clínica varia desde uma infecção assintomática, até a dengue com ou

sem sinais de alarme, ou dengue grave, forma rara, mas que pode atingir a letalidade (Figura 5). Aproximadamente 90% dos casos, apresentam-se de forma autolimitada, e não ultrapassam uma semana de duração (WHO, 2009). A dengue clássica é caracterizada por febre, acompanhada por dores generalizadas e possível envolvimento gastrointestinal e exantema maculopapular. De maneira geral, esta costuma ser a única fase da doença, e está relacionada ao período de viremia. Durante esta etapa, não é possível saber se o paciente vai permanecer com sinais e sintomas da dengue clássica, autolimitando e evoluindo para a cura espontânea, ou se o quadro evoluirá, levando ao dengue grave, com choque e até mesmo hemorragias maciças (manifestações decorrentes da perda de líquidos para o espaço extravascular, pelo aumento da permeabilidade vascular). No entanto, só uma minoria desenvolve o quadro grave, que pode ser fatal. Existem também formas de apresentação classificadas como atípicas; que envolve comprometimentos neurológico, hepático e cardíaco, por exemplo, menos frequentes que o dengue clássico ou dengue grave, os quais tem sido relatados em países do Sudeste Asiático e das Américas, inclusive no Brasil (Valle et al., 2015). Porém, pouco se conhece sobre a incidência destas formas.

Figura 5: Classificação da dengue, segundo a OMS.



Fonte: Organização mundial da saúde (WHO, 2009).

O período de incubação do vírus chikungunya é de 2-7 dias. As pessoas infectadas frequentemente apresentam febre alta repentina, cefaleia, vômitos,

erupções cutâneas, mialgias, artralguas, artrite e dor lombar. Um percentual de indivíduos pode desenvolver também erupção maculopapular múltiplas aftas, levando assim ao acometimento da mucosa oral. Outra manifestação comum entre os afetados pela febre chikungunya é a hiperpigmentação da pele, que afeta 16-42% dos pacientes. Alguns estudos demonstraram manifestações cutâneas ainda maiores entre lactentes; Na Índia, a taxa de manifestações cutâneas entre os bebês com chikungunya foi de 100% (37). Indivíduos infectados pelo vírus chikungunya apresentam poliartralgia em 30-90% dos casos. Essa poliartralgia, que afeta as articulações dos ossos do pulso, do tornozelo, metacarpofalangeal e metatarsfalangeal, pode ser resultado da infecção dos osteoblastos. Aqueles que tem artrite reumatóide subjacente ou outras doenças articulares, que são tratados com medicamentos imunossupressores, estão em maior risco de infecção por CHIKV com exacerbação subsequente da doença articular. Há um risco de encefalopatia neonatal como resultado de transmissão vertical. As crianças infectadas ao nascer tem 51% de chance de desenvolverem atrasos de desenvolvimento neurológico e encefalopatia. Podem ocorrer complicações graves em pessoas com mais de 65 anos ou com problemas médicos crônicos subjacentes. O transtorno neurológico mais comum como consequência da infecção é a meningoencefalite (Handler et al., 2016).

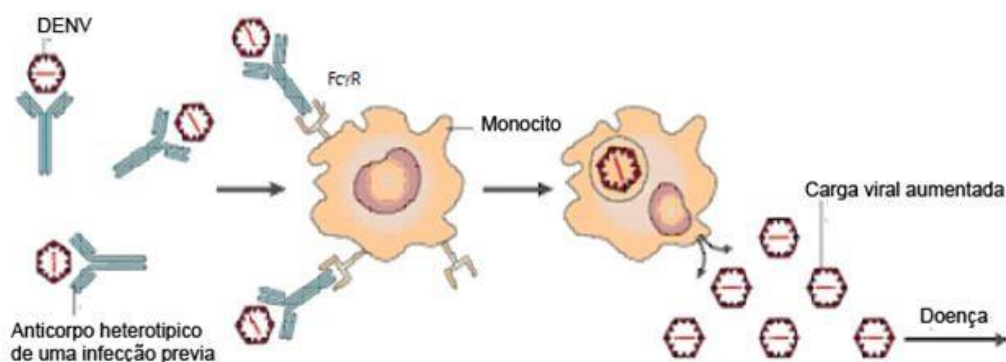
A PAHO propôs uma definição de infecção por ZIKV baseada na definição utilizada durante o surto polinésio francês, que as seguintes condições: elevação da temperatura corporal ($> 37,2$ °C) e um ou mais dos seguintes sintomas (não explicados por outras condições médicas): (i) artralgia melanogênica, (ii) conjuntivite não purulenta ou hiperemia conjuntival, (iii) cefaléia ou mal-estar. Caso confirmado é um caso suspeito com um resultado laboratorial positivo para a detecção específica de ZIKV (Musso & Gubler, 2016). Antes da epidemia da Polinésia Francesa, o ZIKV era descrito como uma doença febril aguda e autolimitada. No entanto, após a descrição de complicações neurológicas severas ocorridas, inclusive no Brasil, esta condição mudou. Observou-se casos de microcefalia em recém nascidos em que a mãe havia apresentado sintomas de zika durante a gestação, além da observação de casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), que posteriormente foram observados em estudos retrospectivos e relatos subsequentes (Musso & Gubler, 2016).

1.8 Patogênese

Algumas teorias são sugeridas para explicar o alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelos DENV, porém, duas são mais aceitas: a teoria das infecções sequenciais e a da virulência da cepa infectante.

A teoria da infecção sequencial ou da facilitação dependente de anticorpos (do inglês: “ADE - antibody dependent enhancement”), propõe que a resposta imune de um indivíduo debilitado é aumentada numa infecção seguinte, isso ocorre devido a existência prévia de anticorpos heterotípicos. Considera-se que há um aumento da replicação viral em macrófagos através destes anticorpos (Acs) heterólogos. Numa infecção secundária com um vírus heterólogo ao da infecção anterior, os anticorpos respondem de forma cruzada a este novo sorotipo, mas não são capazes de neutralizá-los. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam na infecção celular e replicação viral. Estas células infectadas liberam na corrente sanguínea, mediadores vasoativos, aumentando a permeabilidade vascular, ativando o sistema complemento e a tromboplastina tissular, desencadeando assim os mecanismos responsáveis pelas manifestações clínicas das formas hemorrágicas (Hastead 1988) (Figura 6).

Figura 6: Modelo da teoria das infecções sequenciais por DENV.



Fonte: Imagem adaptada de Whitehead et al., 2007.

A virulência da cepa infectante, propõe que a gravidade da doença se deve às diversidades genéticas e antigênicas das diferentes cepas do vírus. Acredita-se que a evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo possa dar origem a cepas epidêmicas ou mais virulentas (Rosen, 1977; Rico-Hesse, 1990).

Apesar do conjunto complexo de fatores que contribuem para a epidemiologia da doença, vários estudos sugerem que as estruturas virais específicas podem contribuir para o aumento da replicação em células alvo humanas e aumentar a transmissão pelo mosquito vetor (Rico-Hesse, 2003). Esta teoria poderia explicar a gravidade clínica nas infecções primárias.

Os dados sobre a patogênese da ZIKV são escassos, no entanto, verificou-se que os fibroblastos dérmicos humanos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas eram permissivos para a infecção por ZIKV. Alguns fatores de adesão permitem a entrada do ZIKV. A replicação de ZIKV ativa uma resposta imune antiviral e a produção de interferon de tipo I em células infectadas. A formação de autofagossomas está associada a uma maior replicação viral e a expressão induzida de aglomerados de antígenos antivirais (RIG-1, MDA-5 e TLR3) capazes de detectar a presença de patologias moleculares associadas ao patógeno foi observada após a infecção de fibroblastos da pele. A infecção por ZIKV induziu um programa autofágico confirmado pela presença de vesículas características tipo autofagossoma nos fibroblastos infectados. As células T (Th1, Th2, Th9 e Th17) são ativadas durante a fase aguda da febre zika (Musso & Gubler, 2016).

A detecção de vírus específicos por indução de fluorescência em neurônios de células vero infectadas tem sido estudada. Antes desse estudo, o ciclo de replicação de arbovírus foi pensado como sendo exclusivamente citoplasmático (Garcez et al., 2016).

Nas experiências iniciais com macacos Rhesus, apenas o macaco 766 desenvolveu uma ligeira elevação de temperatura e o vírus foi demonstrado no soro circulante nos três primeiros dias. O macaco Rhesus não apresentou sinais de febre, mas desenvolveu anticorpos durante duas a três semanas após a infecção. Em camundongos inoculados intracerebralmente, o único órgão que apresentou quantidades demonstráveis de vírus no início da doença foi o cérebro. Alguns outros camundongos, cobaias e coelhos também inoculados intracerebralmente não apresentam sinais de infecção, mas os coelhos desenvolveram anticorpos contra o ZIKV 21 dias após a infecção (Dick 1952). As alterações descritas por Dick (1952) em camundongos sacrificados no primeiro dia de sinais de infecção foram observadas no sistema nervoso central. Outras lesões que foram demonstradas em camundongos são miosite esquelética, miocardite e edema pulmonar. O exame histopatológico de cérebros de camundongos infectados mostrou degeneração

neuronal, infiltração celular das cordas e corpos de inclusão de Cowdry tipo A em células nervosas danificadas. A degeneração neuronal é mais intensa na região do hipocampo (Musso & Gubler, 2016).

O vírus chikungunya entra na célula hospedeira por endocitose dependente de clatrina, seguido pela libertação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira. Grande parte do que se sabe sobre a replicação de CHIKV e montagem de viriões é graças a experimentos que pesquisam esses aspectos em outros alfavírus. A replicação do vírus ocorre dentro do citoplasma, associado a vacúolos citopáticos formados a partir do rearranjo das membranas do hospedeiro. A montagem do virião não é bem caracterizada no CHIKV, mas também ocorre dentro do citoplasma, seguido da aquisição de um envelope de bicamadas lipídicas por brotamento através da membrana da célula hospedeira. Os dados relativos às infecções humanas e tropismos virais e persistência também são limitados, embora a persistência viral nos tecidos seja considerada um potencial mecanismo da doença crônica. Em estágios agudos, o antígeno do CHIKV tem sido demonstrado em células progenitoras de músculo esquelético de pacientes infectados e está associado a necrose muscular e inflamação. Durante a fase aguda, o CHIKV também pode ser detectado em monócitos circulantes. Além disso, persistência de infecção por CHIKV em células musculares satélite foi demonstrada três meses após a fase aguda da doença. Infecções persistentes também tem sido demonstrada em macrófagos sinoviais, 18 meses após o início da doença. Alguns artigos relataram a presença de antígeno do vírus dentro de fibroblastos da cápsula articular, pele, fáscia muscular e derme (Goupil BA & Mores CN, 2016).

Poucos exames histopatológicos foram realizados em amostras conjuntas de pacientes humanos infectados com CHIKV. Os que foram relatados descrevem uma proliferação vascular, macrófagos perivasculares e hiperplasia sinovial. Os macrófagos também podem se estender para os tecidos moles circundantes, incluindo tecidos conectivos e peritendinosos e músculos (Waymouth et al., 2013). Nos estágios agudos da doença, as células T auxiliaadoras CD4 + são essenciais no processo inflamatório, e a ativação intensa destas células, além de células dendríticas (DC), células *Natural Killer* (NK) e células T CD8 +, tem sido associada ao desenvolvimento de artralgia crônica. Embora a sinovite seja frequentemente assumida como sendo um componente principal da doença em artrite crônica associada a CHIKV, Jaffar-Bandjee e colaboradores (2009) relataram que

tenossinovite e inflamação periosteal são mais comuns. Entretanto, devido à escassez de dados histopatológicos associados à doença humana, é difícil tirar conclusões a respeito da patogênese das manifestações da doença (Jaffar-Bandjee et al., 2009).

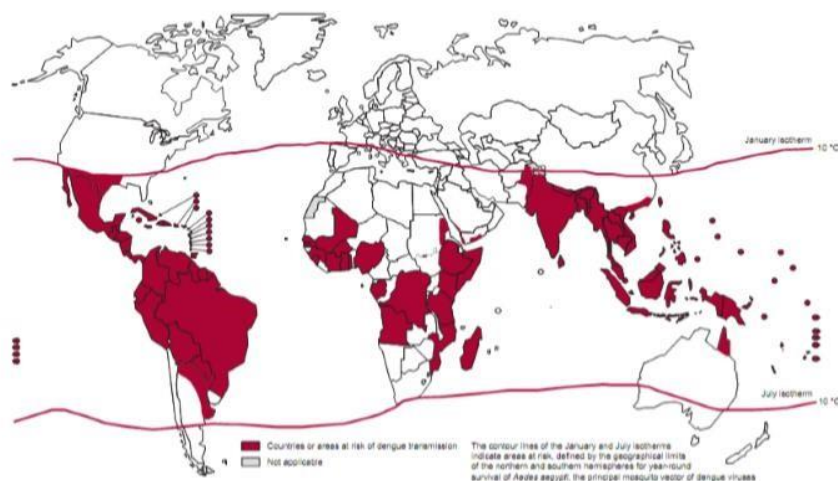
1.9 Epidemiologia

1.9.1 Dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública, sendo a doença viral transmitida por mosquitos que se espalha com maior rapidez pelo mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência tem elevado 30 vezes com o aumento da expansão geográfica para novos países, e atualmente, para pequenas cidades e áreas rurais. Em 2012, a distribuição geográfica da dengue incluiu mais de 125 países. Esse aumento reforça a necessidade da elaboração de programas para prevenção sustentável e intervenções de controle. O surgimento e disseminação dos quatro sorotipos na África, Américas, Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental representa uma ameaça de pandemia (WHO, 2013) (Figura 7).

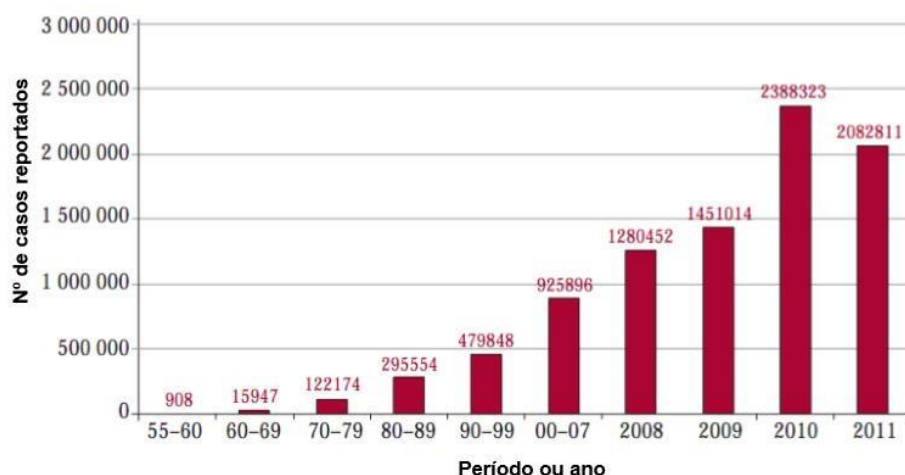
Calcula-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente e, aproximadamente, 2,5 bilhões de pessoas vivam em países endêmicos (WHO, 2009). Entre os anos de 1955-2011 houve um aumento progressivo no número de casos de dengue e dengue grave (WHO, 2013) (Figura 8).

Figura 7: Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011.



Fonte: WHO, 2013.

Figura 8: Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS, 1955–2011.



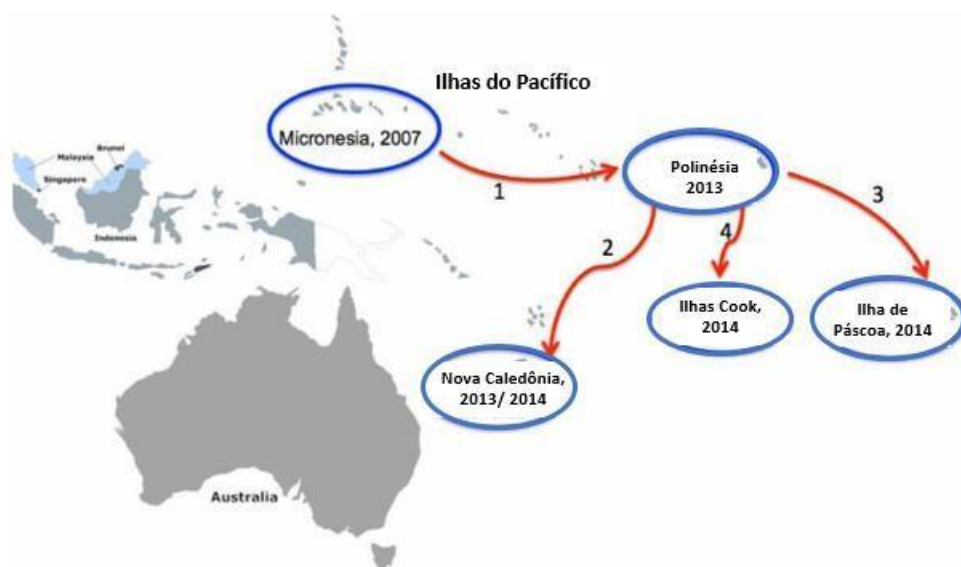
Fonte: WHO, 2013.

1.9.2 Zika

A partir de 2007 os surtos ZIKV foram relatados em muitas ilhas e continentes: em 2007, um surto de ZIKV de transmissão autóctone foi relatado nas ilhas do Pacífico, mais especificamente em Yap, Ilha dos Estados Federados da Micronésia, com 185 pessoas infectadas (incluindo casos suspeitos, prováveis e confirmados). Este surto foi causado pelo genótipo asiático do ZIKV. Seis anos mais tarde (em 2013), outro surto foi relatado, desta vez na Polinésia Francesa, a aproximadamente 5000 milhas de distância da Ilha de Yap (Fig. 9); mais de 28.000 pessoas foram infectadas neste surto. A cepa de ZIKV encontrada no surto da Polinésia Francesa tinha 99,9% de identidade nucleotídica e de aminoácidos com a estirpe asiática, observada no surto da Ilha Yap, sugerindo que o surto da Polinésia Francesa tenha tido sua origem na ilha. Tendo em vista a distância entre as duas ilhas, é improvável que o vírus tenha sido introduzido por mosquitos próprios da Polinésia, sugerindo assim, que ZIKV foi importado para Polinésia Francesa. Posteriormente, o surto da Polinésia Francesa se espalhou para outras ilhas do Pacífico, e, no fim de 2013, casos importados de Polinésia Francesa foram relatados em Nova Caledônia, além de casos de transmissão autóctone também relatados em janeiro 2014 (Fig. 9). Ao mesmo tempo, em janeiro, um surto foi relatado na Ilha de Páscoa, no Chile e, em fevereiro do mesmo ano, outro surto foi relatado nas Ilhas

Cook, (Fig. 9). A sequência de nucleotídeos da estirpe do ZIKV na Ilha de Páscoa era 99,9% idêntica à estirpe ZIKV no surto da Polinésia Francesa, sugerindo então que o surto Ilha de Páscoa tenha se originado também na Polinésia Francesa. Depois, em março de 2015, primeiros casos de surto do ZIKV (de transmissão autóctone) foram relatados na Bahia, Brasil (Basu & Tumban, 2016).

Figura 9: Surtos ZIKV e vias de transmissão nas ilhas do Pacífico. O primeiro surto por ZIKV nas Ilhas foi relatado na Ilha de Yap, Micronésia (2007) e mais tarde transmitido para Polinésia Francesa em 2013 (indicado como número 1 e seta vermelha). A partir da Polinésia Francesa em 2013 (indicado como número 1 e seta vermelha). A partir da Polinésia Francesa, o vírus foi transmitido para Nova Caledônia, Ilha de Páscoa e Ilhas Cook (numeradas em ordem; 2, 3 e 4 e indicadas com setas vermelhas).



1.9.3 Chikungunya

Casos humanos com febre, exantema e artrite, que aparentavam ser CHIKV foram observados no início de 1970. No entanto, não se conseguiu isolar nem de soro humano nem de mosquitos, até a epidemia ocorrida em 1952-53 na Tanzânia. Posteriormente, muitos surtos ocorreram na África e Ásia; muitos destes, em pequenas comunidades rurais. Porém, na Ásia, cepas de CHIKV só foram isoladas

durante grandes surtos urbanos em Bangkok e Tailândia, em 1960 e em Calcutá e Vellore, na Índia, nas décadas de 60 e 70 (MS/SVS, 2014).

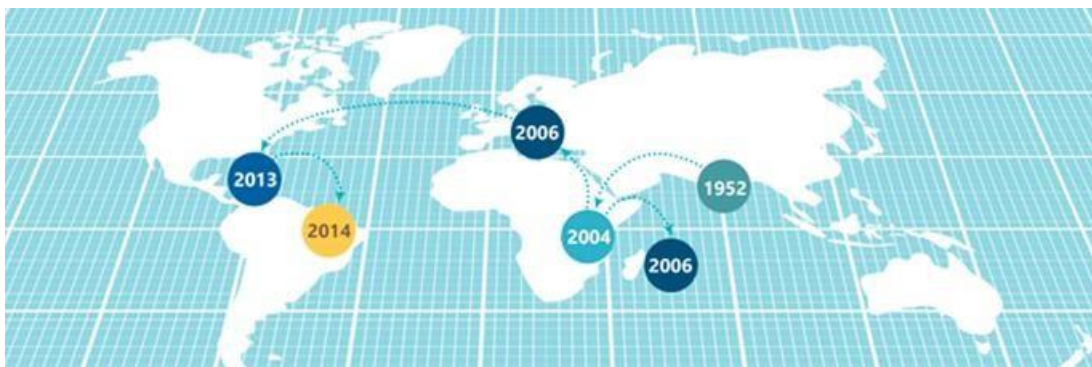
Após a primeira identificação do CHIKV alguns surtos ocorreram esporadicamente, e uma pequena transmissão foi descrita nos anos 80. Porém, em 2004, um surto espalhou-se da costa do Quênia para as Ilhas Comores, Réunion e outras ilhas do Oceano Índico, durante os dois anos seguintes. Do meado do ano de 2004 ao início de 2006, estima-se que 500.000 casos tenham ocorrido (MS/SVS, 2014) (Figura 10).

Na Índia, o vírus chikungunya foi primeiramente observado no Ocidente de Bengala, em 1963 e causado pelo genótipo asiático. A epidemia persistiu por 2 anos, até 1965, quando surtos pontuais se limitaram a Índia, com a epidemia mais recente ocorrendo em 1971. Nas décadas seguintes casos esporádicos foram observados. Em 2006 o vírus ressurgiu, desta vez causado pelo genótipo Sudeste / Centro / Sul Africano (ECSA). Esta estirpe ECSA infectou mais de 1,39 milhões de pessoas, quando se tornou endêmica na Ásia, além de ter infectado vários viajantes que se transportavam entre a América do Norte e Europa (Handler et al., 2016). O surto da Índia teve continuidade em 2010 com novos casos surgindo em áreas anteriormente não incluídas no início da fase epidêmica. Os casos também tem se propagado da Índia para as Ilhas de Andaman e Nicobar, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Singapura, Malásia, Indonésia e vários outros países, por meio de viajantes infectados. A preocupação com a propagação do CHIKV aumentou quando se relatou a transmissão autóctone do vírus no norte da Itália, após ser introduzido por um viajante com o vírus vindo da Índia (MS/SVS, 2014).

O sequenciamento do genoma de um caso ocorrido nas Ilhas Virgens Britânicas confirmou o mesmo pertencia ao genótipo asiático, mesmo genótipo que afeta China, Filipinas e Micronesia. No sudeste da Ásia, nas ilhas do Pacífico e em vários países, as epidemias tem aumentado ao longo dos últimos 10 anos, afetando milhões de pessoas (Handler et al., 2016).

Apesar dos dados escassos sobre CHIKV em Angola, há relatos recentes de casos da doença exportados do país para outros locais. Angola possui um clima adequado para mosquitos *Aedes spp.*, além disso, no passado, o CHIKV já foi isolado de mosquitos *Aedes aegypti*, em Luanda (Rodrigues et al., 2016).

Figura 10: Rota do vírus chikungunya no mundo.



Fonte: OMS, 2015.

1.10 Nas Américas

1.10.1 Dengue

As primeiras amostras de DENV-2 foram isoladas em Trindad, no ano de 1953. O DENV-3 foi isolado em Porto Rico, dez anos depois (Gubler, 1993). Durante as décadas de 60 e 70, epidemias de dengue eram incomuns tendo em vista a erradicação do *Ae. aegypti*. Com a descontinuidade do programa de erradicação no início dos anos 70, houve a re-infestação e disseminação do vetor (Gubler et al., 1997; Anderson et al., 1956).

Após a tentativa fracassada de eliminação dos vetores, em 1977, o DENV-1 foi introduzido na Jamaica e espalhou-se rapidamente, causando assim, epidemias em vários países do Caribe e da América Central, onde até o ano de 1980, foram notificados mais de 700.000 casos da doença, praticamente todos causados pelo DENV-1 (MS, 1998).

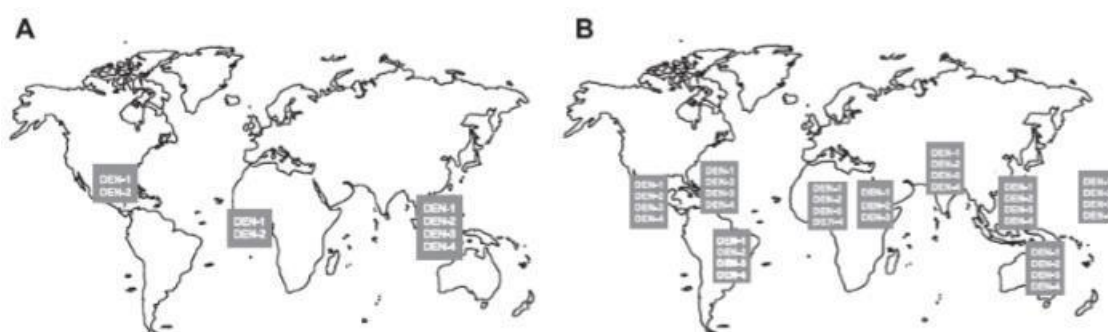
O DENV-4 foi introduzido nas Américas em 1981, na Ilha de St. Bartolomeu (Gubler et al., 1997). Durante este ano uma nova variante de DENV-2 levou à primeira epidemia de febre hemorrágica do dengue (FHD) nas Américas, em Cuba (Gubler, 2006). Na Venezuela, em 1989/1990, ocorreu a segunda maior epidemia de FHD, com cerca de 20 mil casos, onde co-circularam os DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Malavige et al., 2004).

Depois de 17 anos, o DENV-3 foi reintroduzido na Nicarágua e no Panamá em 1994 (Guzmán et al. 1997), sendo caracterizado como genótipo III, distinto do que circulava nas Américas anteriormente (genótipo IV) e associado às epidemias de

FHD/SCD no Sri Lanka e na Índia desde 1989 (Lanciotti et al., 1994, Messer et al., 2002). Nos anos seguintes, o DENV-3 foi detectado em outros países do continente, chegando à América do Sul (Nogueira et al., 2001).

Durante as últimas quatro décadas, foi observado um aumento da densidade vetorial e a co-circulação de múltiplos sorotipos de dengue, desencadeando um aumento da endemicidade do dengue grave e na atividade dos DENV em diversos países das Américas, que evoluiu de uma situação não-endêmica para hiperendêmica (Gúzman & Kourí, 2003; Gubler, 2011), conforme figura 11.

Figura 11: Distribuição global dos sorotipos virais do dengue, 1970 (a) e 2011 (b) (adaptado de Gubler, 2011).

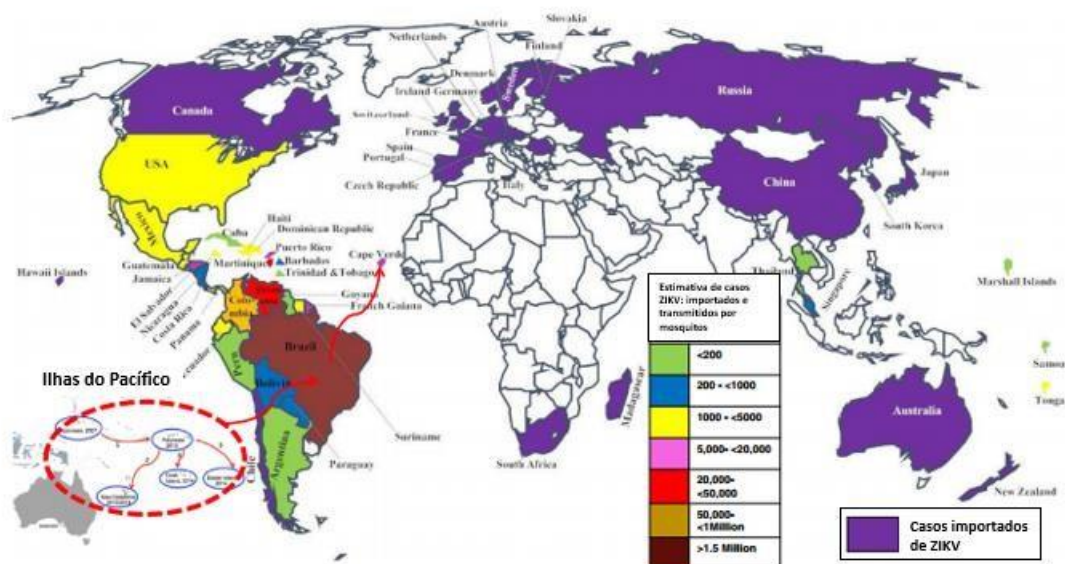


1.10.2 Zika

Os primeiros casos de um surto por ZIKV na América Latina foram relatados no Brasil (março de 2015). Desde então, estima-se que mais de 1,5 milhões de pessoas tenham sido infectadas somente no Brasil. Casos de transmissão do vírus por mosquitos tem sido relatado por toda América (exceto Canadá e Chile), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), mais de 65.000 casos confirmados e suspeitos já foram observados somente na Colômbia (Fig. 12). Embora o número de casos venha diminuindo na maioria dos países da Américas e do Caribe, uma outra parte, transmitida por mosquitos está aumentando em outros. Por exemplo, a partir de meados de setembro, mais de 85 casos de transmissões autóctones foram relatados na Flórida e Estados Unidos. Além disso, o número de casos de ZIKV importados e transmitidos sexualmente continuam aumentando; mais de 3130 casos importados (números corrigidos em meados de setembro) têm sido relatados no território continental dos Estados Unidos desde que o surto começou aqui no Brasil (Fig. 12).

Em Cuba, o número de casos importados aumentou de 1 caso, em março, para 33 casos (3 transmissões locais) em meados de setembro. Em resumo, estimasse que 1,6 milhões de pessoas estejam infectadas nas Américas (Basu & Tumban, 2016).

Figura 12: Casos autóctones e importados de ZIKV ao redor do mundo a partir de 2015. Os países com cores brancas não comunicaram qualquer caso importado em (números até setembro 2015).



Fonte: OMS, 2015.

1.10.3 Chikungunya

A apresentação autóctone inicial do vírus chikungunya no Hemisfério Ocidental ocorreu em dezembro de 2013, na Ilha de Saint Martin (Figura 10), anunciado pelo Centro Nacional Francês de Referência para Arbovírus. A partir de 7 de novembro de 2014 houve mais de 750.000 casos suspeitos de febre chikungunya no Caribe, com 150 relatos de morte (Handler et al., 2016).

Nessa época, esta área estava enfrentando também um surto de dengue e os primeiros casos de chikungunya foram inicialmente identificados como tal doença (Yactayo et al., 2016). As duas doenças tem apresentação clínica semelhante, o que dificultou o diagnóstico clínico. Em 2014 o EUA teve 11 casos autóctones confirmados e 1606 importados de outros países. A América Central teve quase 100.000 casos suspeitos. A área andina da América do Sul teve mais de 26.000

casos suspeitos, sendo 666 confirmados; os continentes do Cone Sul tiveram 174 casos confirmados (Handler et al., 2016).

Rapidamente, o chikungunya se espalhou para 45 países e territórios na América do Norte, Central e do Sul, causando mais de 2,9 milhões de casos suspeitos e confirmados além de 296 mortos no final de julho de 2016. Como em muitas outras doenças transmitidas por vetores, os surtos foram relatados principalmente durante a estação chuvosa, quando a densidade de mosquitos é maior. As taxas de ataque da doença são altas e foram relatadas em áreas, como República Dominicana (41%) e Suriname (90,4%). O pico de transmissão foi atingido em apenas de três meses. Estas taxas foram comparáveis às observadas na Malásia (55,6%) e na Índia (37,5%), e superiores a observada em La Reunion (16,5%). As diferenças nas taxas de ataque são esperadas e podem ser explicadas por fatores como as práticas de vigilância, estação de introdução de CHIKV num país ou região; que tem um efeito direto na densidade e atividade do vector, medidas de controle de vetores e diferenças no estilo de vida (por exemplo, uso de ar condicionado). A doença causada por CHIKV não é tipicamente fatal, com menos de 1% dos indivíduos com chikungunya na Colômbia e Venezuela morrendo, por exemplo. A doença também tem sido associada com significativa morbidade aguda e de longo prazo. De acordo com um modelo baseado no número de pacientes com chikungunya aguda relatado em 2014 nas Américas pela Organização PanAmericana de Saúde, estima-se que 48% das pessoas desenvolveram reumatismo inflamatório crônico pós-chikungunya num período mediano de 20 meses. Um ciclo enzoótico pode ser estabelecido entre os primatas não humanos na África e nas Américas, dependendo da susceptibilidade de uma espécie ao desenvolvimento da viremia da doença (Yactayo et al., 2016).

1.11 Brasil

1.11.1 Dengue

No Rio de Janeiro existem relatos de um surto de febre, mialgia e artralgia em 1846, possivelmente causado pelo DENV. Outros surtos prováveis da doença ocorreram no nordeste, sudeste e sul do Brasil no século XIX. Em 1917 ocorreram surtos em Curitiba e no Rio Grande do Sul. Em 1922 e 1923 ocorreu também um grande surto no Rio de Janeiro e cidades vizinhas (Figueiredo, 2000).

Em 1904 foi iniciada uma campanha de erradicação ao vetor *Ae. aegypti*, que transmitia a febre amarela urbana, a qual foi um sucesso, e, depois de 1920, foi provavelmente a razão para ausência de surtos de dengue no Brasil, até a década de 80 (Figueiredo, 2000). Em julho de 1982 foram registrados casos de dengue, com o isolamento dos sorotipos 1 e 4, na cidade de Boa Vista, Roraima. Esses foram os únicos casos até o ano de 1986, quando o DENV-1 foi isolado em pacientes numa epidemia no estado do Rio de Janeiro (Schatzmayr et al., 1986; Osanai et al., 1983). No mesmo ano, foram notificados 46.309 casos de dengue no país (SVS/MS, 2002). Nos anos seguintes a doença se tornou um problema de saúde pública no território nacional, com relatos de epidemias em diversos estados (Nogueira et al., 2007). Com a introdução de DENV-2 em 1990, também no estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 1990), houve um agravamento dos quadros clínicos e notificação dos primeiros casos de FHD/SCD no país (Nogueira et al., 2007). Neste ano, foram notificados 40.279 casos, com 274 casos de FHD e 8 óbitos (SVS/MS, 2012). A introdução do novo sorotipo causou novas epidemias por todo o país (Nogueira et al., 1995; Figueiredo, 1996). No ano seguinte, em mais uma epidemia, foram confirmados 104.399 casos de dengue no país (SVS/MS, 2012). Em 1998 ocorreu o primeiro relato de Dengue causado pelo sorotipo DENV-3, em paciente residente do município de Limeira, no estado de São Paulo, este havia viajado para a Nicarágua, sendo caracterizado como um caso importado. Em 2001, no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, foi isolado de um paciente com sinais e sintomas clássicos de dengue, o sorotipo DENV-3 (Nogueira et al., 2001; Rocco et al., 2001). A introdução do novo sorotipo aumentou o número de casos durante o verão de 2001 e 2002, causando a epidemia mais grave até então registrada (Nogueira et al., 2007; SVS/MS, 2012). Desde a última epidemia em 2002, até o ano de 2007, o sorotipo predominante era o DENV-3. Neste período foram notificados 1.937.092 casos de dengue no país, sendo o maior número de casos registrados em 2002, havendo uma diminuição entre os anos de 2003 e 2004, que se caracterizou como um período interepidêmico. Já em 2005, as notificações voltaram a subir e, em 2007, foram mais de 450.000 casos notificados (SVS/MS, 2009). Ainda em 2007, o DENV-2 re-emergiu, ocasionando uma grave epidemia no ano de 2008, com 806.036 casos notificados, sendo 17.945 casos de DCC (dengue com complicações), 4.195 casos de FHD e 229 óbitos (SVS/MS, 2011). O sorotipo 4 foi identificado em pacientes residentes em Roraima, em julho de 2010, sendo no mesmo ano isolado

no Amazonas. Em janeiro de 2011 foi isolado no Pará, chegando ao estado no Rio de Janeiro em março do mesmo ano (Temporão et. al., 2011; Nogueira, 2011). Nos últimos 27 anos, extensas epidemias de dengue, com emergência e re-emergência dos diferentes sorotipos vêm ocorrendo no Brasil e, até então, mais de doze milhões de casos já foram notificados (SVS/MS, 2015).

Em todo o ano de 2014, foram registrados 589.107 casos de dengue no Brasil. Em 2015 o número de registros mais que dobrou e, 1.688.688 casos da doença foram notificandos, sendo os sorotipos 1 e 4 os predominantes. Em 2016, até a Semana Epidemiológica (SE) 49 (3/1/2016 a 10/12/2016), foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no país, com o maior número de registros na região Sudeste do Brasil. Neste mesmo ano, 609 casos de óbitos causados pela doença foram confirmados (SVS/MS, 2016).

1.11.2 Zika

Casos de "doenças exantemáticas" têm sido relatados retrospectivamente no Brasil desde o final de 2014, e desde fevereiro de 2015, um surto destas doenças vem afetando milhares de pacientes no nordeste do Brasil, principalmente na Bahia, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba. Em março, amostras de soro obtidas de pacientes com diagnóstico provável de doença viral aguda do Hospital Santa Helena, em Camaçari, Bahia, Brasil, foram analisadas na Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Evandro Chagas (FIOCRUZ, Panamá), Brasil. Alertas foram emitidos pelo Ministério da Saúde e Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), e em 15 de maio, o primeiro caso de febre Zika autóctone foi confirmado em um paciente da Bahia (Campos et al., 2015; Zanluca et al., 2015). No início de dezembro de 2015, 18 estados no Brasil confirmaram a transmissão autóctone do vírus nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Roraima, São Paulo, Espírito Santo, Amazonas, Rondônia e Tocantins. No entanto, provavelmente o ZIKV já estava circulando em outros estados, mas ainda não tinha sido detectado. No final de dezembro de 2015, o número estimado de casos suspeitos de infecção por ZIKV variou de 440.000 para 1.300.000 (Musso & Gubler, 2016).

Em 2016, 211.770 casos prováveis de febre pelo vírus zika, foi registrado em todo país, sendo a região Centro-Oeste, a que apresentou maior incidência. 6 óbitos causados pelo vírus foram confirmados em todo ano, sendo quatro no Rio de Janeiro e dois no Espírito Santo (SVS/MS, 2016).

Até o momento o genótipo detectado no país é o asiático e, pouco se sabe sobre o impacto destes genótipos na evolução da doença e sua relação com o vetor e as epidemias (Oliveira & Vasconcelos, 2016).

Antes do aparecimento do zika vírus na Polinésia Francesa, este vinha sendo relatado como uma doença febril leve, auto-limitada e sem complicações, devido a seu baixo número de casos e poucas investigações em surtos (Musso et al., 2016). No entanto, um estudo retrospectivo foi realizado com base nesta epidemia e observou-se casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB) associados ao zika vírus, além dos primeiros casos de transmissão perinatal, onde foram relatados 17 casos de má-formações do sistema nervoso central, incluindo microcefalia, em fetos recém-nascidos; este último, entre março de 2014 e maio de 2015 (Oliveira & Vasconcelos, 2016).

Desde 2015 o Brasil vem enfrentando uma dramática emergência de saúde pública, haja visto grande número de casos de bebês microcefálicos. A princípio, evidências epidemiológicas sugeriam a associação do vírus zika à microcefalia, tendo em vista o grande número de mulheres grávidas com relatos de sintomatologias relacionadas ao zika durante a gestação. No entanto, estudos que evidenciem essa associação, como por exemplo, a presença do vírus em fetos recém-nascidos, ou até mesmo estudos que indiquem a alta incidência de microcefalia à presença do vírus são escassos (Calvet et al., 2016). Contudo, estudos recentes evidenciaram clínica e epidemiologicamente a associação deste agravo a tal doença (Cao-Lormeau et al., 2016). Inicialmente, em janeiro de 2016, foi demonstrado, através de diagnóstico por qRT-PCR, a presença do vírus zika no líquido amniótico de duas gestantes que apresentaram sintomas da doença (Calvet et al., 2016). Posteriormente, outros estudos foram publicados reforçando esta evidência (Cao-Lormeau et al., 2016).

1.11.3 Chikungunya

A partir de julho de 2014, quando a transmissão do vírus da dengue é baixa, um aumento no número de casos suspeitos da doença num bairro em FSA chamou

a atenção dos funcionários de vigilância locais. Havia suspeita de infecção por CHIKV devido aos resultados dos testes laboratoriais para dengue (NS1 e IgM ELISA) terem sido negativos, além de os pacientes se queixarem principalmente de febre alta e intensa dor articular bilateral, acompanhada de inchaço. O IgM ELISA e a RT-PCR quantitativa realizada no Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Brasil) confirmou a causa da doença como CHIKV. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank com os números de acesso KP164567-KP164572 (Teixeira et al., 2015). No mesmo ano, o Ministério da Saúde confirmou também transmissão autóctone do CHIKV no Amapá (AP), o qual faz fronteira com a Guiana Francesa, no norte do Brasil, em ambos os estados há circulação dos vetores *Aedes*. O sequenciamento do genoma revelou que o genótipo asiático estava circulando no norte do país (AP), no entanto, o sequenciamento do genoma de três de amostras de Feira de Santana (FSA) revelaram uma linhagem distinta; o genótipo ECSA, que havia entrado nas Américas pela primeira vez. Este genótipo está intimamente relacionado a estirpes de CHIKV que circulam em Angola (Rodrigues et al., 2016).

A epidemia atingiu o pico na Semana Epidemiológica 39, quando 200 casos foram relatados. No entanto, em seguida, estes casos diminuíram, e, na Semana Epidemiológica 48, apenas 10 casos foram registrados. Em Feira de Santana, dos 1.346 casos de chikungunya relatados até a Semana Epidemiológica 48, 52,4% dos pacientes viviam no mesmo bairro que o paciente índice, paciente este que vive em Luanda, Angola, e que teria vindo visitar familiares em FSA. Entretanto, os outros 77 bairros de FSA também registraram casos (Teixeira et al., 2015).

Em 2016, até a SE 49, foram registrados 263.598 casos prováveis de febre de chikungunya no país, distribuídos em 2.752 municípios, destes, 145.059 foram confirmados. O número de óbitos pela doença foi de 159, distribuídos pelas seguintes Unidades da Federação: Pernambuco (54), Paraíba (32), Rio Grande do Norte (25), Ceará (21), Rio de Janeiro (9), Alagoas (6), Bahia (4), Maranhão (5), Piauí (1), Sergipe (1) e Distrito Federal (1), respectivamente. A doença está distribuída em todos os estados do Brasil, com uma maior incidência na região Nordeste (SVS/MS, 2016).

1.12 Prevenção e controle

Estas doenças a cada dia que passa são motivos de grande preocupação e cada vez mais são mais problemáticas. Projetos que visam o controle do vetor e

programas comunitários que procuram manter o ambiente livre dos criadouros se empenham de maneira permanente, porém, até hoje, todo este trabalho não foi suficiente para a erradicação do mosquito vetor. Algumas estratégias novas que visam o controle vetorial tem sido desenvolvidas nos últimos anos, apresentando importantes evoluções. Para DENV, por exemplo, alguns projetos estão sendo desenvolvidos: 1) a adaptação endossimbiótica da bactéria *Wolbachia* de *Drosophila* no *Ae. Aegypti*, que tem demonstrado uma redução no tempo de vida do mosquito, além do bloqueio na transmissão direta do DENV (Hoffmann et al., 2011); 2) *Ae. aegypti* geneticamente modificados carregando um gene dominante letal e a liberação dos machos na natureza também tem se mostrado uma medida de controle biológico efetiva na redução de índices entomológicos (Harris et al., 2011); 3) óleos essenciais com ação larvicida e biopesticidas derivados de outro microrganismos estão sendo desenvolvidos (Veerakumar et al., 2013; Dias & Moraes, 2014).

Com o grande número de casos de dengue em todo mundo, bem como a ineficiência dos programas de controle do vetor, tornou-se de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina que fosse tetra-valente, isto é, eficiente, ou que estimulasse a resposta imune equilibrada para os quatro sorotipos. Porém, o desenvolvimento de vacinas multivalentes contra a dengue tem sido atrapalhada pela falta dificuldade de uma resposta imune equilibrada. Vírus vivos atenuados, inativados, proteínas recombinantes e vacinas de DNA já se encontram em desenvolvimento como possíveis candidatos (Thomas & Endy, 2011; Guzman & Harris, 2015).

O primeiro estudo de eficácia da vacina contra a dengue mostrou uma eficácia baixa contra o DENV-2 (Sabchareon et al., 2012).

A vacina desenvolvida pela Sanofi Pasteur, Dengvaxia®, é a única que até o momento cumpriu estudos de eficácia de fase III, e que foi certificada pela Organização Mundial da Saúde. Ela também já foi autorizada em alguns países endêmicos para dengue, como Filipinas, México, Brasil e Paraguai. Esta vacina tetravalente, viva e atenuada, consiste numa estrutura recombinante do cDNA infeccioso da cepa vacinal do vírus da Febre Amarela (17D) cujos genes pré M e envelope foram substituídos pelos correspondentes aos 4 sorotipos do DENV (Guy et al., 2011; Sanofi Pasteur, 2016).

Atualmente, alguns estudos em humanos e alguns modelos de ratos sugerem um papel de proteção desempenhados pelas células T CD8+, com a maioria dos epítomos localizados nos genes não estruturais (Yauch et al., 2009).

Com relação ao zika vírus também não existe na atualidade, uma vacina que seja capaz de conferir proteção contra o vírus e este tem sido um dos motivos pelos quais esta virose vem se espalhando por vários continentes onde o mosquito vetor encontra-se em proliferação. Existem vários grupos trabalhando no desenvolvimento da vacina, todos ainda em fase inicial. No início do mês de fevereiro de 2016 (11/02) foi assinado o primeiro acordo para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da Zika entre o governo brasileiro e a Universidade do Texas, nos Estados Unidos.

A produção de um soro anti-Zika deverá ser feita pelo Instituto Butantan. O soro deverá ser utilizado para bloquear o avanço da infecção, podendo ser empregado para tentar evitar a passagem do vírus para o feto.

O uso de produtos repelentes do mosquito *Aedes* é recomendado, inclusive para gestantes, desde que aprovados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). No Brasil o Ministério da Saúde indica o uso tópico de repelentes a base de n,n-Dietil-meta-toluamida (DEET) por gestantes. No entanto, não devem ser usados em crianças menores de 2 anos. Outros produtos repelentes aprovados no Brasil são Hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate (Icaridin ou Picaridin) e Ethyl butylacetylaminopropionate (EBAAP ou IR3535), assim como óleos essenciais a base de citronela.

Recomenda-se a utilização de roupas de manga longa e calças compridas, as quais ajudam a reduzir a área da pele exposta a picadas de mosquitos, em locais endêmicos para os vírus dengue, chikungunya e zika. No entanto, em países tropicais, esta recomendação não é bem aceita pela população devido às altas temperaturas e à elevada umidade do ar.

O controle do mosquito vetor continua sendo a melhor estratégia de prevenção destas arboviroses. Em ambientes domésticos pode-se fazer uso de inseticidas ou de repelentes de mosquitos comercializados. O uso de produtos larvicidas que matam os estádios larvais do mosquito só devem ser utilizados por agentes de saúde treinados corretamente para tal utilização, devendo-se ter em mente que são produtos de toxicidade mais elevada e que podem selecionar mosquitos resistentes quando utilizados de forma sistemática (Cangussu, 2016).

A adoção de medidas simples amplamente divulgadas no combate ao *Aedes aegypti* no Brasil são de grande importância e podem ser realizadas pela população na prevenção do vetor, tais como: virar garrafas de cabeça para baixo, reutilizar pneus de automóveis, evitar a acumulação de lixo, não utilizar pratinhos para aparar a água de irrigação das plantas, e quando usá-los, colocar areia para que não haja acumulação de água, tampar as caixas e outros reservatórios de água potável ou não potável, esvaziar as piscinas que não são mais utilizadas ou fazer sua limpeza e cloração periódicas, dentre outras medidas.

1.13 Caracterização molecular

Com o surgimento de metodologias moleculares, a partir da década de 1980, cujo princípio consiste na reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction (PCR)), a qual permite a amplificação de alvos conservados do genoma de diferentes agentes etiológicos, modificou o conhecimento da epidemiologia, diagnóstico e a pesquisa das doenças infecciosas de etiologia viral, dentre outras abordagens (Paiva, 2015).

Os métodos moleculares fundamentam-se na detecção do RNA viral a partir de amostras do paciente (seja ela, soro, urina ou líquido, por exemplo) suspeito durante o período virêmico. Como exemplo, o diagnóstico molecular de infecções por DENV utiliza a Transcrição Reversa – seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), permitindo classificar os sorotipos DENV, bem como detectar a presença do vírus, assim como para as infecções por ZIKV e CHIKV, ao utilizar iniciadores específicos das sequências genômicas de cada um destes vírus. Realtime PCR e nested PCR são também, variações dessa técnica (Lanciotti et al., 1992).

Estudos de filogenia molecular também estão sendo usados para determinar a estrutura genética de populações de patógenos, além de explicar as forças evolutivas que produziram essa estrutura, nos permitindo assim, determinar a origem evolutiva dos vírus, associando-os ou não à gravidade de uma doença, além de possibilitar o monitoramento de genótipos mais virulentos em epidemias e esclarecer a patogênese viral, bem como o entendimento da influência do vetor na seleção das variantes genéticas. O mapeamento da incidência de cada genótipo dentro de um mesmo sorotipo permite, por exemplo, rastrear a origem do vírus e suas principais rotas de transmissão (Holmes, 1998).

Atualmente, há diferentes modalidades de diagnóstico rápido e específico que usam os métodos moleculares e de genotipagem na identificação simultânea de vários vírus, como por exemplo, sequenciamento do genoma (parcial ou completo), por Sanger, sequenciamento de nova geração, sendo duas já amplamente utilizadas em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da Applied Biosystems, denominada SOLiD System, e o Heliscope True Single Molecule Sequencing (tSMS), da Helicos. Estas novas plataformas possuem como características em comum, o poder de gerar bilhões de informações num curto espaço de tempo, quando comparado ao sequenciamento por Sanger (Carvalho & Silva, 2010). No entanto, são técnicas bastante caras. Outro método de genotipagem existente é o de High-Resolution Melting (HRM), baseado na caracterização de amostras de DNA, de acordo com seus comportamentos de dissociação, durante a fase de transição de DNA dupla fita para fita simples, com aumento de temperatura (Uniscience, 2016). Hibridização reversa, é também utilizado para genotipagem de cepas, ele consiste de uma reação de PCR utilizando um primer universal que é capaz de amplificar sequências conservadas entre os agentes etiológicos que serão diagnosticados (Levada et al., 2010).

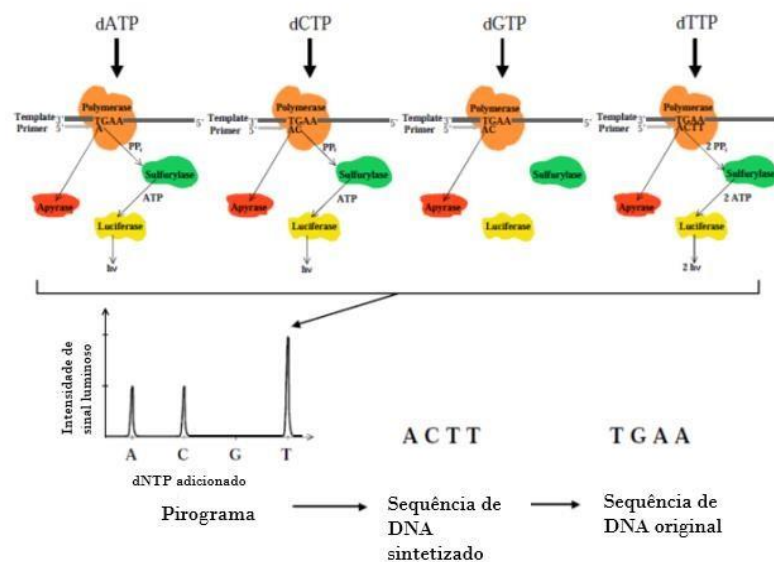
1.14 Pirosequenciamento

O pirosequenciamento é um método de sequenciamento de DNA, baseado no princípio do sequenciamento por síntese. A detecção da incorporação das bases diverge do sequenciamento de Sanger, pois é baseada na detecção da liberação do pirofosfato, em vez de terminação da cadeia com dideoxynucleotídeos (Nyrén, 1987). A abordagem desenvolvida para monitoramento do sequenciamento em tempo real sem a necessidade de eletroforese foi inicialmente proposta por Ronaghi (1996 e 1998) (Ronaghi et al., 1996; Ronaghi et al., 1998). O sistema de pirosequenciamento é formado por um sistema enzimático que se compõe de DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase. Estas enzimas, de maneira geral, desempenham as seguintes funções: a DNA polimerase catalisa a polimerização de DNA na replicação, reparação e é, portanto, essencial para sobrevivência de todas as células vivas. A produção de PPi liberado mediante ATP durante a polimerização é catalisada pela ATP sulfúrilase. A luciferase catalisa a produção de luz a partir de ATP que é

detectada durante o pirosequenciamento. Já a apirase é incluída no pirosequenciamento para a degradação dos nucleotídeos não incorporados e ATP em excesso, entre as adições das bases. O método é baseado na detecção do pirofosfato (PPi) liberado durante a síntese do DNA. Em uma cascata de reações enzimáticas, a luz visível gerada é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. O pirofosfato é convertido em ATP. O ATP fornece a energia necessária para a enzima luciferase catalisar a reação de oxidação da luciferina, gerando luz. O perfil de emissão da luz resultante da incorporação das bases pode ser observado através de um pirograma (Figuras 13 e 14).

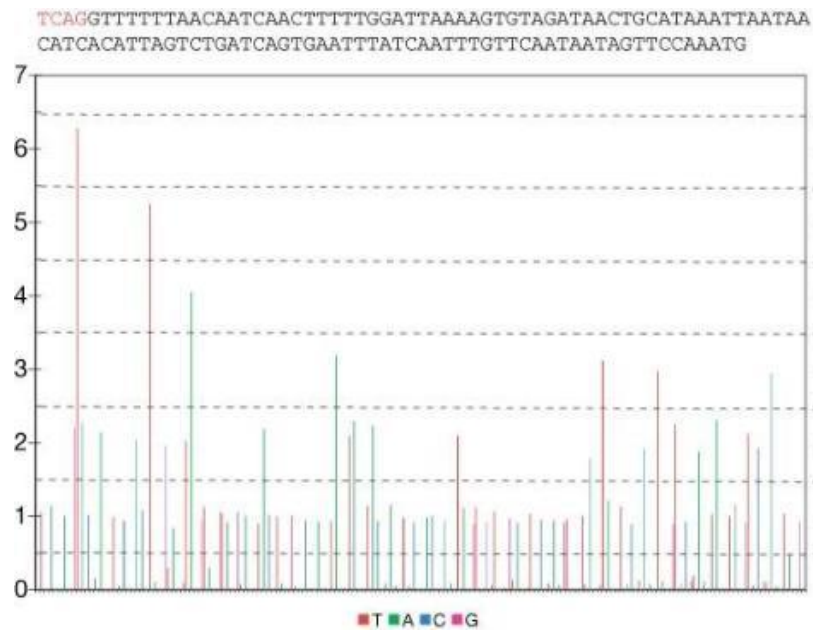
O grande número de pirosequenciamento aliado ao aumento da capacidade computacional e bioinformática, permitiu o desenvolvimento substancial das ciências genômicas. Na metade dos anos 2000, o custo do sequenciamento foi reduzido em aproximadamente duas vezes, além de reduzir os esforços dos projetos genomas (Rogers & Venter, 2005).

Figura 13: Representação esquemática do sistema enzimático do pirosequenciamento. O nucleotídeo incorporado pela polimerase, liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A enzima ATP sulfurylase, converte o PPi em ATP, que atua como substrato para produção de luz pela luciferase. A luz produzida é detectada, formando um pirograma, que indica a sequência de nucleotídeos incorporados durante o sequenciamento.



Fonte: Adaptado de Ahmadian, 2006.

Figura 14: Pirograma resultante da incorporação de bases, durante o pirosequenciamento.



1.15 Justificativa

Com a introdução de novos vírus na população, se faz necessário o monitoramento destes para a identificação de possíveis variantes mais virulentas ou capazes de evadir à resposta imune, bem como verificar os genótipos circulantes num dado momento e até mesmo em epidemias. Além disso, também é de extrema importância para a vigilância epidemiológica do país e para pesquisas em vacinas.

Tendo em vista que nos últimos anos, diversos registros de epidemias por arboviroses foram relatados em todo mundo, e que no Brasil estamos diante de uma situação em que se tem a cocirculação das três arboviroses urbanas que são de grande impacto para a saúde pública, além do elevado número de casos registrados destas arboviroses, se faz necessária a utilização de uma ferramenta rápida e específica que seja capaz de fazer uma triagem genotípica capaz até mesmo de identificar possíveis mutações no genoma.

Apesar de existirem 3 genótipos de chikungunya, no Brasil se tem a circulação de dois (ECSA e asiático) e, no estado Rio de Janeiro, até o momento, somente o ECSA.

Para ZIKV, dois são os genótipos conhecidos (asiático e africano), atualmente com circulação apenas do genótipo asiático tanto no Brasil quanto no estado do Rio de Janeiro.

A escolha pelo sorotipo 4 do vírus dengue foi feita baseada na disponibilidade de cepas (dos genótipos existentes no Brasil), bem como nas amostras existentes em nosso laboratório, tendo em vista também que o DENV-4 é o único sorotipo do vírus dengue o qual temos a cocirculação de dois genótipos no estado do Rio de Janeiro. Além disso ainda são poucos os estudos referentes a este sorotipo, quando comparado aos outros.

Considerando-se que o Laboratório de Flavivírus é um laboratório de Referência Regional para o Ministério da Saúde, e para tanto, precisa responder de forma rápida e eficiente sobre a introdução de “novos” vírus, bem como a dispersão e variabilidade genética dos mesmos, se faz necessário o uso de ferramentas ágeis e eficientes, que garantam esta resposta à vigilância virológica do estado. Desta forma, é fundamental o uso de ferramentas que sejam capazes de triar geneticamente as cepas circulantes. O uso do pirosequenciamento, que é uma técnica baseada no princípio de “sequenciamento por síntese”, a partir da detecção

da liberação do pirofosfato sobre a incorporação de nucleotídeos, permitirá que em poucas horas seja possível a triagem de genótipos e de possíveis mutações que levem a variações genotípicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Triagem de genótipos virais, utilizando o pirosequenciador PyroMark no monitoramento de cepas de DENV-4, ZIKV e CHIKV circulantes no estado do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecer regiões capazes de diferenciar genotipicamente cepas de DENV4, CHIKV e ZIKV;

Desenhar ou selecionar da literatura iniciadores que possam ser utilizados na padronização de reações de RT-PCR para o sequenciamento no equipamento PyroMark Q96 ID, cepas de DENV-4, CHIKV e ZIKV;

Utilizar cepas referência de DENV-4, CHIKV e ZIKV para avaliar o método de genotipagem por pirosequenciamento;

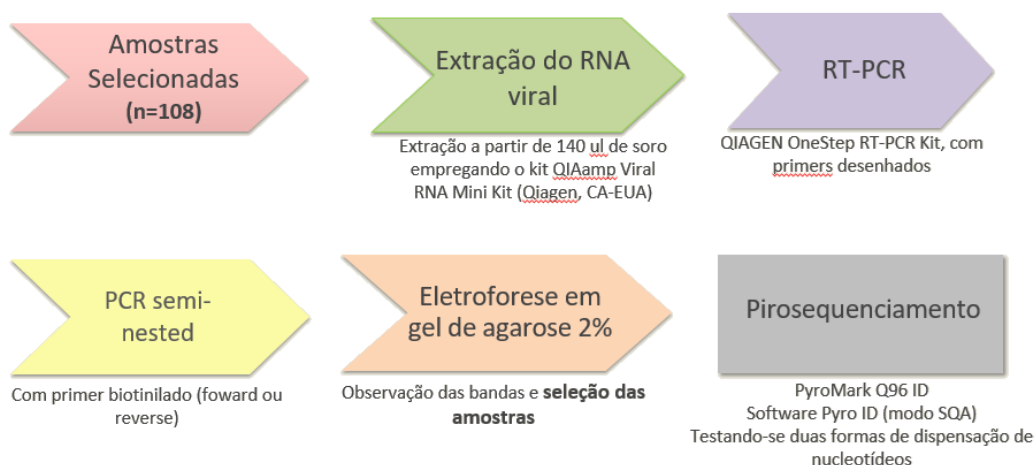
Aplicar o método para genotipagem de forma rápida, utilizando cepas de referência e amostras de DENV-4, CHIKV e ZIKV detectadas a partir de amostras clínicas de pacientes.

3 Considerações éticas

Todas as amostras utilizadas neste estudo são derivadas de demanda espontânea do Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika, e mantidas em freezer 70 °C. Após a realização de testes diagnósticos confirmatórios, não há qualquer método complementar ao paciente. Este estudo se enquadra nos propósitos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 274/05 e 027/2007) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde (anexos 1 e 2 deste estudo).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 15: Fluxograma do projeto.



4.1 Amostragem

Foram pré-seleccionadas 108 amostras de fase aguda, ou seja, coletadas com até 7 dias após o início dos sintomas. Estas amostras de soro utilizadas fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Flavivírus, oriundas de casos confirmados por RT-PCR e/ou qRT-PCR, com infecção por um dos agravos de interesse. Posteriormente, selecionou-se uma amostragem de conveniência, sendo 33 amostras de DENV-4, 42 de CHIKV e 33 de ZIKV. Todas as amostras estavam em freezers -70 °C do laboratório.

Além das amostras, utilizou-se também, cepas referência dos genótipos dos vírus DENV-4 (genótipo II), CHIKV (genótipo ECSA) e ZIKV (genótipo africano). Os genótipos os quais não dispúnhamos de cepa referência, foram utilizadas amostras representativas, isto é, amostras sabidamente genotipadas (previamente analisadas e confirmadas). O fluxograma do projeto está apresentado na figura 15.

4.1.1 Critérios de Inclusão

Amostras de soros positivos por RT-PCR e/ou qRT-PCR para DENV-4, ZIKV e CHIKV.

4.1.2 Critério de não-inclusão

Amostras com mais de 7 dias de início dos sintomas.

4.2 Desenho e escolha dos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi feito com Programa PyroMark Assay Design Software 2.0.

O Primer BLAST foi utilizado para verificar a especificidade dos iniciadores, isto é, se os mesmos não amplificavam genomas que não fossem os de interesse.

Para CHIKV foram utilizados iniciadores retirados da literatura, descritos por Collao e colaboradores (2010). Enquanto que para DENV-4 e ZIKV, foram desenhados iniciadores específicos para amplificação dos agravos em estudo (conforme demonstrado na tabela 3).

4.3 Extração do RNA viral

Os RNAs das amostras de vírus de referência e soros, foram extraídos através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir.

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560 µL de Tampão de Lise AVL, 5,6 µL de Carrier/AVE e 140 µL da amostra. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 560 µL de álcool etílico à 100% PA e a suspensão homogeneizada. Após a homogeneização, 630 µL da mistura são transferidos para uma coluna previamente numerada e levados a centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm. O eluído do tubo coletor é desprezado e um novo tubo coletor é colocado na coluna. Os 630 µL restantes da mistura são transferidos para a coluna e, após mais uma centrifugação de 1 minuto a 8000 rpm o eluído é descartado e a coluna transferida para novo tubo coletor. Adiciona-se 500 µL do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído é descartado. Adiciona-se 500 µL do Tampão de lavagem AW2 e segue-se para uma nova centrifugação, desta vez por 3 minutos a 14000 rpm. O eluído é descartado e a coluna é mais uma vez transferida para um novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna é então transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL previamente

identificado. Adiciona-se 60 µL de tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna é descartada e o RNA armazenado em freezer - 70°C.

4.4 Protocolos utilizados na detecção DENV-4, CHIKV e ZIKV

Todas as amostras utilizadas foram previamente confirmadas pela rotina do laboratório, para cada um dos agravos em estudo. Os protocolos utilizados estão descritos a seguir.

4.4.1 RT-PCR, protocolo Lanciotti et al (1992) - Dengue 4

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al (1992), para detecção e tipagem dos DENV, a partir de espécimes clínicos. Este protocolo detecta os quatro sorotipos, a partir de um procedimento “semi-nested”, que gera produtos amplificados (amplicons), com tamanho específico em pares de base (bp) para cada sorotipo.

4.4.2 RT-PCR, protocolo Collao et al (2010) e qRT-PCR, protocolo Lanciotti et al (2007) - Chikungunya

Aplicou-se a metodologia descrita por Collao et al (2010), a qual detecta CHIKV por nested RT-PCR convencional. O conjunto de iniciadores amplifica uma região específica do vírus (E1). Foi utilizado também o protocolo descrito por Lanciotti et al (2007). Este protocolo baseia-se numa qRT-PCR, onde utiliza iniciadores e sonda específicos para detecção do vírus, a partir de espécimes clínicos (tabela 2).

4.4.3 RT-PCR em tempo real, protocolo Lanciotti et al (2008) - Zika

Para zika, foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al (2008), para detecção dos ZIKV, a partir de espécimes clínicos. Este protocolo utiliza iniciadores e sonda específicos de estirpes isoladas em Yap, no ano de 2007.

O conjunto de iniciadores utilizados neste protocolo amplifica a região da proteína de envelope do vírus zika, conforme a tabela 2.

Tabela 2: Conjunto de iniciadores e sondas utilizados na rotina para detecção dos agravos (*sondas).

Vírus	Iniciadores	Posição Genoma	Sequência (5'-3')
DENGUE (Lanciotti et al 1992)	D1	134-161	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG
	D2	616-644	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC
	TS1	568-586	CGTCTCAGTGATCCGGGGG
	TS2	232-252	CGCCACAAGGGCCATGAACAG
	TS3	400-421	TAACATCATCATGAGACAGAGC
	TS4	506-527	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA
ZIKV	ZIKV1086	1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG
	ZIKV1162c	1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
	ZIKV1107FAM*	1107-1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA
CHIKV (Lanciotti et al 2007)	CHIKV6856	6856-6879	TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA
	CHIKV5981C	6981-6956	TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC
	CHIKV6919FAM*	6919-6941	AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG
(Collao et al 2007)	Sense	10246-10262	TTACCNTTYATGTGGGG
	Antisense	10793-10777	CTTACSGGGTTTGTYGC
	Sense ₂	10714-10698	TRAAGCCAGATGGTGCC

4.5 Seleção dos iniciadores para o pirosequenciamento

Para todas as amostras selecionadas foi realizada uma RT-PCR, este procedimento é uma etapa prévia a realização do pirosequenciamento e serviu também como uma forma de confirmação das amostras selecionadas. O conjunto de iniciadores utilizados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Conjunto de iniciadores utilizados no estudo (*iniciadores marcados com biotina; em negrito: iniciadores utilizados para no pirosequenciamento).

Vírus	Iniciadores	Posição Genoma	Sequência (5'-3')
CHIKV	SeqChik E1 Upp	10245-10262	TTACCNTTYATGTGGGG*
	SeqChik E1 Low	10777-10792	CTTACSGGGTTTGTGTYGC
	SeqChik E1 2L	10698-10715	TRAAAGCCAGATGGTGCC
ZIKV	FZK PYROMARK01	2618-2639	TGGAAAACATHATGTGGARATCA*
	R1ZK PYROMARK01	2953-2976	CGGCTGGRTCACAYTCTARTGAAT
	RNZK PYROMARK01	2905-2927	ACTAGTGTGRAADACYCCRAACC
	SEQZK PYROMARK01	2835-2852	CTTCARTGTGTCWCCRTC
DENV-4	F1D4 PYROMARK02	216-233	GGGAAAGGACCCTTACGG
	FND4 PYROMARK02	276-295	CCRCCAACAGCAGGGATTCT*
	RD4 PYROMARK02	448-468	GTTCCRCRTCTCTYGTGACA
	SEQD4 PYROMARK02	409-426	GAATCAARCACARYAATG

Para chikungunya, utilizou-se iniciadores descritos por Collao e colaboradores (2010), os quais amplificam uma região específica do vírus (E1).

A fim de confirmarmos dengue 4 e zika vírus, foram desenhados iniciadores específicos para estes agravos, que amplificam as regiões do capsídeo e NS1, respectivamente.

4.6 RT-PCR para genotipagem no pirosequenciamento

Os reagentes utilizados para a reação de amplificação de RT-PCR e nested PCR estão representados na tabela 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4: Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR (* volume utilizado para CHIKV).

Reagentes	Concentração	µL /Tubo
H ₂ O RNase free	-	9 ou 11*
5X QIAGEN Buffer	-	5
dNTP MIX	10mM	1
Primer Direto	10µM	2 ou 1*
Primer Reverso	10µM	2 ou 1*
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	1

Tabela 5: Reagentes utilizados na reação de nested PCR.

Reagentes	Concentração	µL /Tubo
H ₂ O RNase free	-	9
Taq PCR Master Mix 2X	-	12,5
Primer Direto	10µM	1,5
Primer Reverso	10µM	1,5

O volume de RNA viral foi estimado de acordo com o protocolo existentes no laboratório e testados para o nosso estudo.

4.7 Metodologia

Um tubo tipo eppendorf de 200µL foi colocado em banho de gelo para a adição de 20µL da mistura RT-PCR, conforme tabela 3 e 3.1, logo depois, foi adicionado 5µL do RNA extraído. Posteriormente colocou-se os microtubos no termociclador, conforme o ciclo descrito na tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros de termociclagem da RT-PCR (*DENV-4, **CHIKV).

Parâmetros para a RT-PCR			
Etapas	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
RT	50	60min	1 ciclo
Inativação	95	15min	1 ciclo
Desnaturação	94	30sec	30/25*/40** ciclos
Hibridização	55/60**	30sec/3min**	
Extensão	68	2min/30sec**	
Extensão final	68	10min	1 ciclo
Temperatura final	4	∞	-

Numa segunda etapa de amplificação (nested PCR), diluiu-se os produtos obtidos em microtubos de 200µL ou 1,5mL; para zika, diluiu-se a 1/10 (1µL do produto + 9µL de H₂O). Para DENV-4 e CHIKV a diluição foi de 1/100 (5µL do produto + 495µL de H₂O).

Em microtubos de 200µL adicionou-se 24,5µL da mistura nested PCR e 0,5µL do produto da primeira reação diluído. Colocou-se os microtubos no termociclador, conforme o ciclo da tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de termociclagem da nested PCR (**CHIKV).

Parâmetros para a RT-PCR			
Etapas	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
Inativação RT	94	2min	1 ciclo
Desnaturação	95	30sec	
Hibridização	56/55**	30sec/1min**	35 ciclos
Extensão	72	2min/30sec**	
Extensão final	72	10min/5min**	1 ciclo
Temperatura final	4	∞	-

Após a nested PCR realizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose (2%), onde numa bandeja acrílica misturou-se 2g de agarose com 100mL de TBE (0,5X), onde este foi previamente aquecido e solubilizado. Quando a mistura estava resfriada, foi adicionado 5µL de brometo de etídeo. Após a solidificação, colocou-se o gel imerso em TBE (0,5X) em cuba de eletroforese.

Aplicou-se 5µL da reação, obtida após a nested, mais 2µL de azul de bromofenol e realizou-se a eletroforese a 110 v – 50 mA por 60 minutos. No primeiro orifício, aplicou-se 8µL do peso molecular e 2µL do azul de bromofenol. Após a corrida realizou-se a “captura” da imagem em transiluminador, com leitura feita em luz UV.

4.8 10mM desoxinucleotídeos (dNTPs)

Tabela 8: Diluição dos desoxinucleotídeos em 10Mm.

Reagentes	Peso/Volume
dNTP estoque	25µL
Água livre de nuclease	900µL

Adiciona-se 25µL de cada dNTP estoque a 900µL de H₂O. Homogeneizar bem e estocar em freezer -20 °C.

4.9 Gel de agarose 1% em TBE 0,5X

Tabela 9: Reagentes utilizados para o preparo do gel de agarose.

Reagentes	Peso/Volume
Agarose (Sigma, St. Louis, USA)	1g
Solução de TBE (0,5X)	100mL

Em um erlenmeyer, dissolver a agarose em TBE 5X, aquecendo a solução em micro-ondas (temperatura máxima) por 2 minutos. Resfriar a solução e adicionar 5µL de brometo de etídeo.

4.10 Técnica de pirosequenciamento

O equipamento PyroMark Q96 ID da marca QIAGEN® (QIAGEN Group) foi utilizado na triagem dos genótipos das arboviroses estudadas.

A técnica de pirosequenciamento foi realizado com aproximadamente 100 pares de base (bp), através do software Pyro ID, no modo SQA (usado para buscar mutações em posições desconhecidas, com dispensação das quatro bases sucessivamente).

Foram testados dois tipos de dispensação: dispensação automática (ou cíclica) de nucleotídeos, que é um tipo de dispensação a qual utiliza uma sequência do próprio programa, existente no PyroMark (25(ATGC)). As dispensações são feitas nesta ordem, por 25 vezes, até que se finalize o ciclo. O outro tipo de dispensação utilizado foi o que chamamos de dispensação manual, que consiste em colocarmos cada nucleotídeo na ordem em que desejávamos que eles fossem dispensados e na sequência do genótipo existente no Brasil. Esta ordem de dispensação está demonstrada na tabela 10.

Nas posições em que existiam inderteminações, estas foram substituídas por todas as possibilidades de bases correspondentes, de acordo com a IUPAC.

Tabela 10: Ordem de dispensação dos vírus.

Vírus	Ordem de Dispensação
DENV-4	THATYGTGGACCTTYTYCTYCYRRTTCAAGATGTTYARCATGCGRCCTATCTCCTTCC TGAATCCARTCAGTATYTTDATGGCCTTRTTYTTYTTAACTGTCCCCATCT
CHIKV	TGAGAGTAYGGYACRTGYACCGTRCCYRCDGMYGGYCTCTGYAGTACCARYTGW GTRTTTRGCATARACGTCTTYRCTYTCMGGYGTTCGACTTTGRATRTCR
ZIKV	SACVACAAAVCTGTTTRTTKGTCTTTGCYGCYCTRACRAARTACGATTTCCCCCARG CYTTCCAGCCRTGGGGCAGCTCRTTCACAGGCACNGGCAATCTYTGTTGGASCTCT

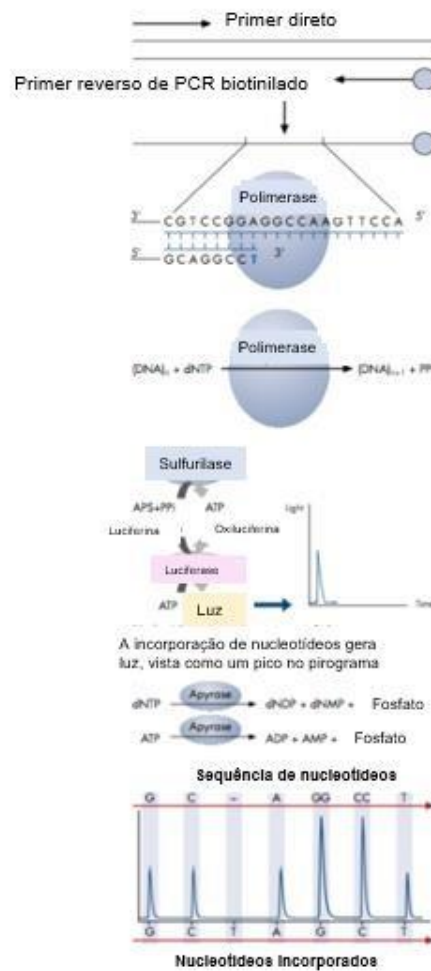
Obs.: indeterminações e correspondentes: H= A, C, T; Y= C, T; R= A, G; D= A, G, T; M= A, C; S= G, C; V= A, C, G; K= G, T; N= qualquer base.

4.10.1 Processo enzimático

Este método determina a ordem dos nucleotídeos do DNA, com base na detecção da liberação de pirofosfato no ato da incorporação dos nucleotídeos, daí o nome sequenciamento por síntese. Uma enzima quimioluminescente (luciferase) detecta a atividade de DNA polimerase e irá gerar luz a cada nucleotídeo complementar a fita molde, emitindo sinais luminosos em forma de picos.

Um fragmento de DNA é amplificado utilizando um dos iniciadores biotinilados, sendo assim, a fita que servirá como molde possui sua extremidade marcada com biotina. Após a desnaturação esta fita marcada é isolada para posterior hibridização do primer de sequenciamento. Logo após, o complexo formado pelo primer marcado é incubado com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase e os substratos adenosina 5 fosfosulfato (APS) e luciferina, e o primeiro dNTP é adicionado à reação. A DNA polimerase catalisa a adição deste nucleotídeo ao primer de sequenciamento, caso seja complementar. A base da fita molde e cada incorporação é acompanhada da liberação de pirofosfato (PPi). Caso o nucleotídeo não seja complementar, a reação não ocorrerá, acontecendo somente no ciclo em que o nucleotídeo complementar for utilizado. A enzima ATP sulfúrilase converte PPi em ATP, na presença de APS. O ATP gerado, mediado pela luciferase, converte luciferina em oxiluciferina e gera uma luz visível proporcional a quantidade de ATP. Esta luz é interpretada como um pico, com altura proporcional a quantidade de nucleotídeos incorporados. Os nucleotídeos não incorporados e ATP, são degradados pela enzima apirase a cada ciclo de adição de nucleotídeos (PyroMark Q96 ID Manual, 2016) (Fig. 14).

Figura 14: Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento (PyroMark Q96 ID).



4.10.2 Diluição do primer para o pirosequenciamento

O iniciador utilizado para reação de sequenciamento foi diluído em PyroMark *Anneling Buffer* e estocado numa concentração de 100µM. Para o uso, foi realizada uma diluição de forma que se obtivesse uma concentração final de 0,4µM.

4.10.3 Diluição da streptavidina Sepharose Beads

A estreptavidina, uma proteína de *Streptomyces avidinii*, é conhecida por se ligar à biotina com uma afinidade elevada. Possui uma estrutura tetramérica na qual cada molécula de estreptavidina se liga a quatro moléculas de biotina. Estas interações foram utilizadas para isolar uma variedade de proteínas marcadas com biotina, anticorpos e outras biomoléculas.

A suspensão de *Streptavidin Sepharose Beads* foi diluída a 1/20, cujo o agente diluente é uma combinação de água destilada e deionizada com *Binding Buffer*. Agitou-se bem a suspensão de beads antes de usá-la (não deve ser misturada por vortex ou centrifugada, para que as beads não se desfaçam).

Os volumes fixos de H₂O, *binding buffer* e *beads* são respectivamente, 17µL, 40µL e 3µL, multiplicados pela quantidade de amostras que seriam analisadas. O volume final para cada poço da placa foi de 60µL.

4.10.4 Hibridização do produto de PCR com *beads* e preparação do filtro na estação de trabalho

Em uma placa de 96 poços (semelhante a usada no RT-PCR em tempo real), foram pipetados 20µL da reação de PCR, mais 60µL do mix de *bead*. Lacrou-se a placa com adesivo próprio para esta função, vortexou-se por 10 minutos a 1400 rpm (para que ocorresse a ligação das beads a biotina).

Na placa de pirosequenciamento foram pipetados 40µL do primer diluído em *annealing buffer* em cada poço. Esta placa foi fixada em sua posição da estação de trabalho. Logo depois, a metodologia foi iniciada com o carregamento das estações, isto é, os reagentes foram colocados em suas devidas posições, conforme apresentado na figura 10. Logo após, a bomba de funcionamento foi ligada e a sonda colocada na posição “P”, que contém água. Isto é feito para que ocorra a limpeza do sistema. Posteriormente, colocou-se a sonda na posição “4”, também com água. Nestas duas primeiras etapas a sonda não tem um tempo específico para permanecer. O próximo passo foi realizado colocando-se a sonda na placa de PCR, por 1 minuto. Logo depois, a sonda ficou por 30 segundos na posição “1”, onde se encontra o álcool a 70%. Seguidamente, na posição “2”, que contém a solução de desnaturação, por 30 segundos. Após esta etapa, a sonda foi disposta na posição “3”, com *wash buffer*, também por 30 segundos. Feito estes processos, a sonda foi então posicionada a 90 graus de inclinação, para posterior retirada da mangueira. A sonda foi então disposta na placa de sequenciamento e agitada por 20 segundos, para que toda e qualquer *bead* que estivesse fixa a ela pudesse se soltar. A placa de sequenciamento foi levada a um termobloco aquecido a 80 °C, durante 2 minutos. Depois desta etapa, a placa foi deixada em temperatura ambiente por 5 minutos e neste tempo o cartucho do pirosequenciamento foi preparado, com as devidas quantidades de enzima,

substrato e nucleotídeos (dados pelo programa, de acordo com a quantidade de amostras). As posições de cada um estão demonstradas na figura 15. A placa de sequenciamento foi então colocada no equipamento, seguida do cartucho, este com o rótulo voltado para frente (Fig. 16). Por último, deu-se início à corrida.

Figura 15: Estação de trabalho do PyroMark Q96 ID.

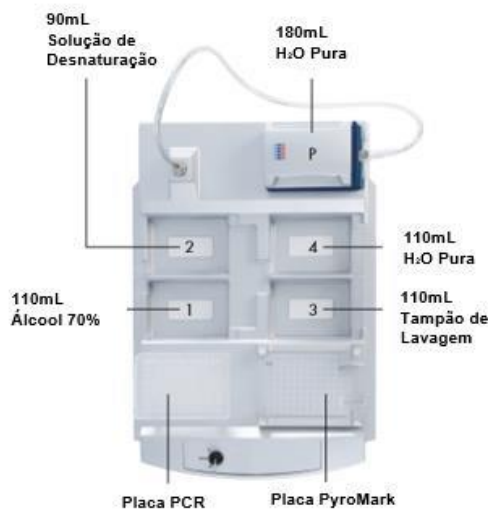
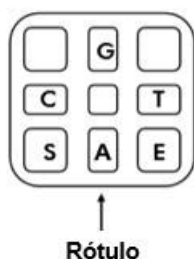


Figura 16: Cartucho PyroMark Q96 (de cima) com compartimentos indicados para enzimas, substrato e nucleotídeos.



4.10.5 Análise das sequências

Para análise dos produtos sequenciados utilizou-se o programa BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), o qual foi feito o alinhamento das sequências. As árvores filogenéticas foram construídas com suporte de teste de *bootstrap* (1000 pseudorréplicas), utilizando o Programa MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>), utilizando o método de Máxima Verossimilhança,

modelos Tamura-Nei 93+G (DENV-4 e ZIKV) e GTR+I para CHIKV, de acordo com o resultado obtido pela ferramenta disponível no MEGA 7.

4.11 Técnica de sequenciamento por Sanger

A técnica de sequenciamento foi subsequente à RT-PCR, já descrita anteriormente. Este método foi realizado em algumas amostras para confirmarmos os genótipos demonstrados no pirosequenciamento.

4.11.1 Purificação de produto de RT-PCR diretamente da reação de RTPCR para reação de sequenciamento

Na presença do amplicom na análise da eletrofore em gel de agarose, este foi cortado e realizou-se a purificação do DNA utilizando o kit QIAquick Gel extraction Kit (QIAGEN, Alemanha).

4.11.2 Metodologia

Na purificação do produto o fragmento de DNA de interesse foi cortado do gel de agarose com lâmina descartável e, pesado em um tubo incolor. Foram adicionados 3 volumes de Tampão QG para 1 volume de gel (100mg ~ 100µL), ou seja, 300µL para 100mg de gel. O fragmento foi incubado a 56 °C por 10 minutos com agitação em vortex a cada 2 – 3 minutos. Após a completa dissolução do gel, a coloração da mistura foi conferida, tendo que estar com a coloração do Tampão QG (amarelo). Caso a mistura estivesse laranja ou violeta, 10µL de 3M acetato de sódio era adicionado. Foi misturado 1 volume de isopropanol (de acordo com a quantidade por ng de gel) e as colunas foram colocadas nos tubos de coleta. A suspensão foi transferida para a coluna e centrifugada por um minuto a 13000 rpm em microcentrífuga. O eluído do tubo coletor foi descartado e 500µL do Tampão QG foi adicionado a coluna. Após centrifugação por um minuto a 13000 rpm, 750µL de Tampão PE foram adicionados. Após nova centrifugação por um minuto a 13000 rpm o eluído foi descartado. Incubou-se por 2 a 5 minutos e uma nova centrifugação foi realizada. A coluna foi transferida para um microtubo tipo eppendorf de 1,5mL previamente identificado, e o DNA purificado foi eluído pela adição de 30µL de água livre de RNAses e DNAses. Uma nova centrifugação por um minuto a 13000 rpm foi realizada e o DNA estocado a -20 °C até a utilização.

4.11.3 Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA purificado (resultante da purificação do gel), o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo por 40 minutos a 100V. no primeiro orifício do gel foi aplicado 4µL do peso molecular de massa *Low Mass DNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 4µL do DNA a ser quantificado nos demais orifícios. Os amplicons foram visualizados em transiluminador com luz UV e a imagem registrada em capturador de imagens. A concentração do DNA foi estimada de acordo com a comparação da concentração apresentada pelo peso molecular de massa.

Os produtos para a reação de sequenciamento foram devidamente enviados para a Plataforma de sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

4.11.4 Análise das sequências

As sequências dos produtos obtidos no sequenciamento por Sanger foram incluídas para análise junto às sequências pirosequenciadas. Esta análise utilizou o programa BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), no qual foi realizado o alinhamento das sequências e, as árvores filogenéticas foram construídas com suporte de teste de *bootstrap* (1000 pseudorréplicas), utilizando o Programa MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>), como descrito no item 3.10.5.

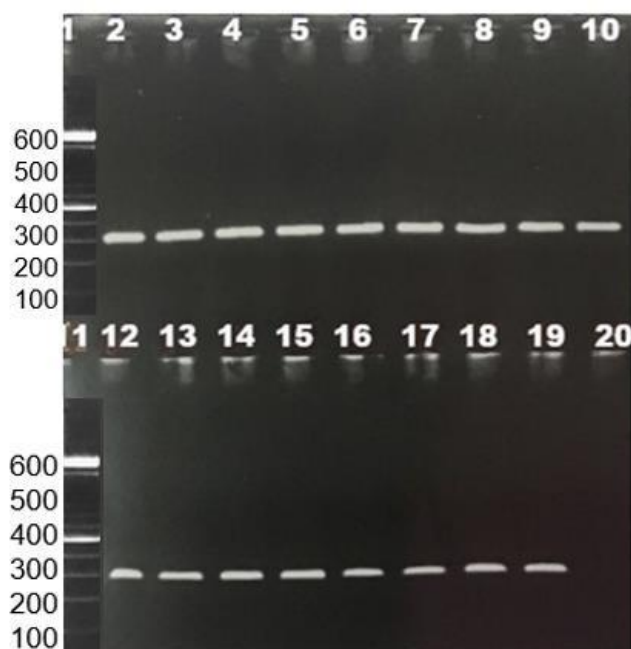
5 RESULTADOS

Em todas as amostras pré-selecionadas (n=108) foi realizada uma nested RTPCR, a qual faz parte de uma etapa prévia ao pirosequenciamento, além de exercer também a função de verificação dos amplicons, ou seja, observação da amplificação do gene de interesse.

5.1 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para dengue 4

Um total de 33 amostras foram pré-selecionadas para realização da nested RTPCR, que tinha por objetivo prepará-las para o pirosequenciamento e verificar a amplificação das bandas destas amostras e cepas de DENV-4. Para isto, foram utilizados iniciadores específicos, desenhados para este estudo, que amplificavam a região do capsídeo do vírus. Os produtos das amplificações estão exemplificados na Figura 17.

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR para confirmação das amostras com DENV-4 (fragmento de ~ 252pbnested). Poços: 1 e 11 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 12 a 18: amostras com DENV-4; 19: controle positivo para DENV-4 (cepa referência genótipo II); 20: controle negativo (água livre de nucleases).



5.2 Caracterização molecular

O produto da RT-PCR das amostras amplificadas foi preservado para posterior ensaio de pirosequenciamento.

A origem geográfica das amostras escolhidas foi o estado do Rio de Janeiro; Região Sudeste do Brasil (conforme tabela 11). Uma amostra proveniente da Bahia, região Nordeste do país, foi utilizada como mais uma “referência” do genótipo I. A estratégia para o pirosequenciamento destas amostras foi baseada na amplificação das mesmas por RT-PCR.

Tabela 11: Amostras de DENV-4 pirosequenciadas (*sem informação).

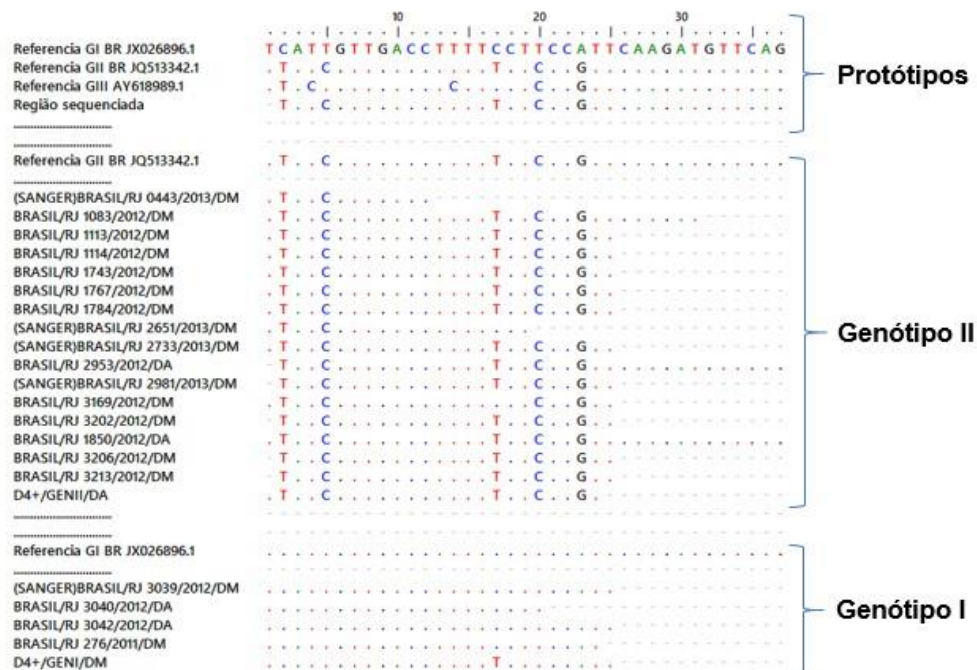
Amostras	Ano	Estado	Município	Bairro	Genótipo
276	2011	BA	Tancredo Neves	*	I
443	2013	RJ	Rio de Janeiro	Catete	II
1083	2012	RJ	Belford Roxo	Parque Floresta	II
1113	2012	RJ	Niterói	Charitas	II
1114	2012	RJ	Niterói	Charitas	II
1743	2012	RJ	Rio de Janeiro	Marechal Hermes	II
1767	2012	RJ	São Gonçalo	Zé Garoto	II
1784	2012	RJ	Rio de Janeiro	Manguinhos	II
1850	2012	RJ	Rio de Janeiro	Tijuca	II
2651	2013	RJ	Rio de Janeiro	Santa Cruz	II
2733	2013	RJ	Niterói	Fonseca	II
2953	2012	RJ	Belford Roxo	São Vicente	II
2981	2013	RJ	Rio de Janeiro	Ipanema	II
3039	2012	RJ	Rio de Janeiro	Padre Miguel	I
3040	2012	RJ	Rio de Janeiro	Padre Miguel	I
3042	2012	RJ	Rio de Janeiro	Padre Miguel	I
3169	2012	RJ	Rio de Janeiro	Campo Grande	II
3202	2012	RJ	Rio de Janeiro	Cosmos	II
3206	2012	RJ	Rio de Janeiro	Campo Grande	II
3213	2012	RJ	Rio de Janeiro	Praça Seca	II
REFERÊNCIA GENÓTIPO II					

Após a pré-seleção das 33 amostras, 13 foram descartadas, restando assim, 20 amostras para o pirosequenciamento, além das referências dos genótipos I e II.

Através do alinhamento das sequências da região “C” de DENV-4 das 20 amostras e dois controles os quais foram realizadas pirosequenciamento, foi possível observar e diferenciar os genótipos existentes no Brasil; genótipo II e

genótipo I. A amostra de 2011, oriunda da Bahia constitui uma amostra do genótipo I, assim como três amostras de Padre Miguel (3039, 3040 e 3042) do ano de 2012. Todas as outras amostras demonstraram pertencer ao genótipo II, conforme demonstrado na figura 18.

Figura 18: Amostras pirosequenciadas (Sanger: amostras sequenciadas também por Sanger; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual).

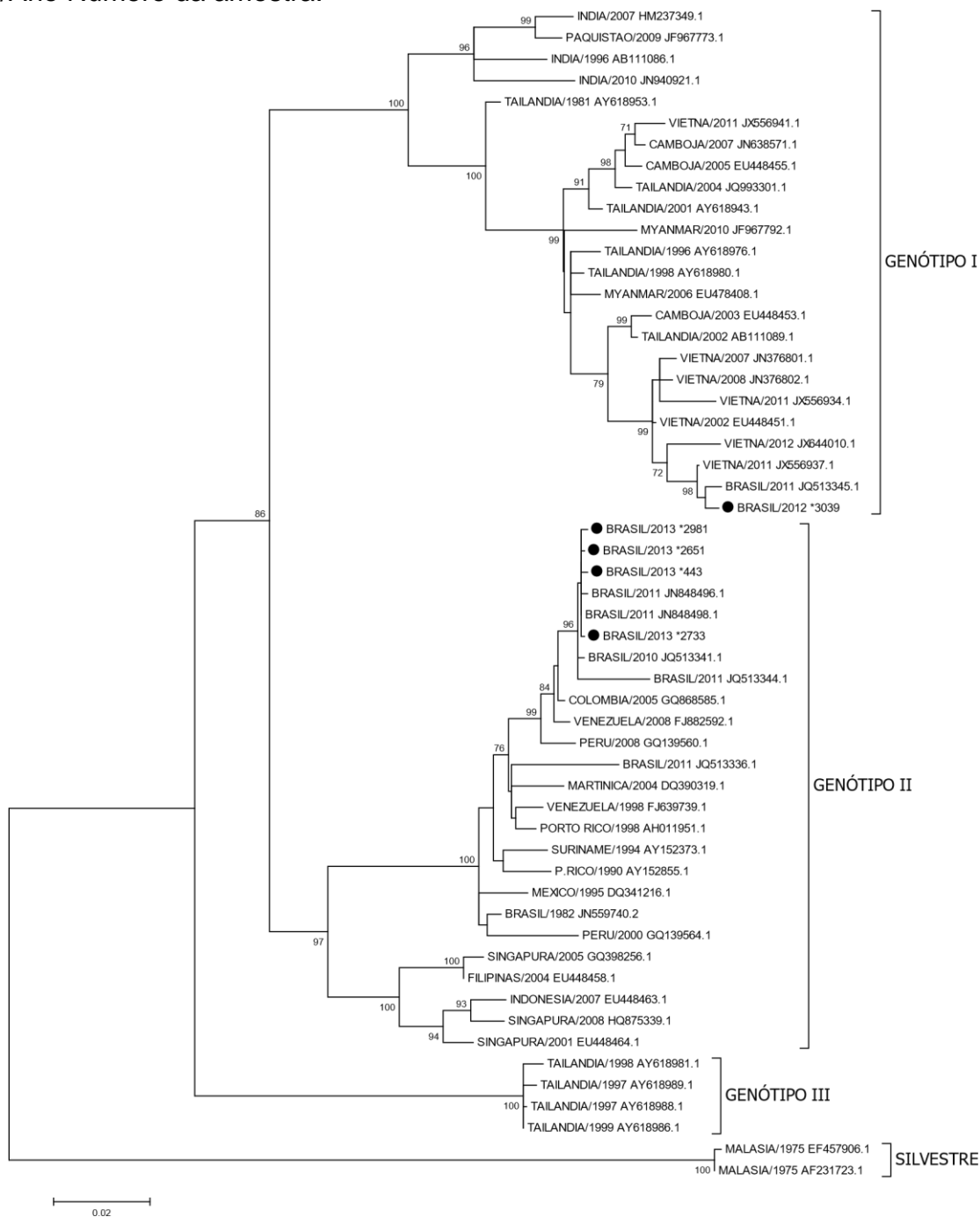


Conforme descrito anteriormente, a maioria das amostras (16) agruparam-se ao genótipo II, protótipo brasileiro (JQ513342.1), apresentando a mesma sequência nucleotídica, com exceção das amostras 2651/13, 2981/13 e 3169/12 que não apresentaram o nucleotídeo “T” na posição 17 do alinhamento demonstrado e, 392 da proteína de capsídeo (A392G), de acordo com a sequência referência retirada do GenBank (AF326825.1). Três amostras do Rio de Janeiro, além da amostra 276/11 da Bahia, pertenciam ao genótipo I e apresentaram exatamente os mesmos nucleotídeos do protótipo brasileiro demonstrado (JX026896.1). Conforme observado na figura 18, nosso controle positivo do genótipo I (D4+/GENI) apresentou uma substituição nucleotídica quando comparado ao restante das amostras analisadas.

De todas as amostras analisadas, apenas 6 foram por dispensação automática (DA). Todas as outras 17 foram pirosequenciadas por dispensação manual (DM).

A fim de comprovar os resultados do pirosequenciamento, foi realizado também sequenciamento pelo método de Sanger em algumas amostras (443/13, 2651/13, 2733/13, 2981/13 e 3039/12). A análise filogenética destas amostras analisadas confirmou o resultado pelo método proposto e comprovou que quatro amostras pertenciam ao genótipo II (todas do ano de 2013) e uma ao genótipo I (3039/12), conforme Figura 19.

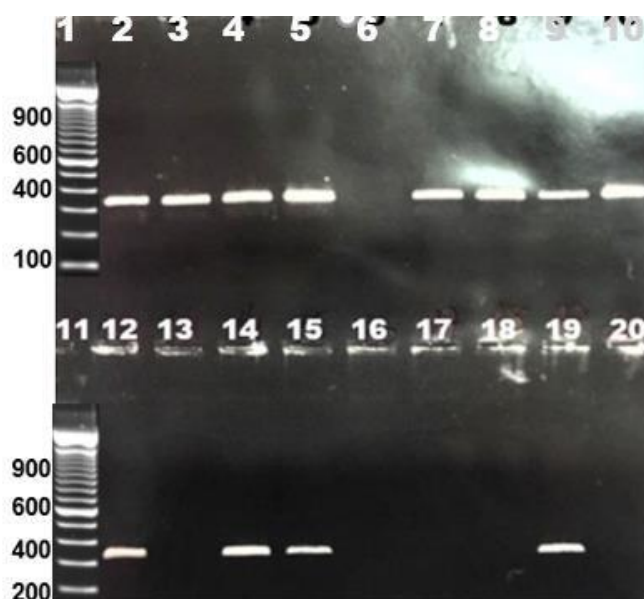
Figura 19: Árvore filogenética baseada na região do capsídeo das 5 amostras de DENV-4. Método de Máxima Verossimilhança, modelo TN93+G. *Bootstrap* com 1000 pseudo-réplicas fragmentos de até 210bp. Círculos pretos representam as amostras de DENV-4 sequenciadas neste estudo. Cepas de DENV foram nomeadas da seguinte forma: País/Ano Número de acesso ao GenBank e País/Ano Número da amostra.



5.3 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para ZIKV

No total, 33 amostras de ZIKV foram pré-selecionadas e nestas realizou-se a nested RT-PCR com o intuito de preparar as amostras para o pirosequenciamento e observar as bandas das amostras e cepas do vírus. Para isto, foram desenhados para esta metodologia iniciadores específicos, que visavam a amplificação dos produtos (apresentados na figura 20).

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR para confirmação das amostras com ZIKV (fragmento com ~309pb-nested). Poço: 1 e 11– padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 12 a 18: amostras positivas; 19: controle positivo para ZIKV; 20: controle negativo (água livre de nucleases)



5.4 Caracterização molecular

A estratégia de amplificação utilizada permitia a geração de produtos de aproximadamente 234pb para o pirosequenciamento, tendo em vista os primers desenhados.

O produto da RT-PCR das amostras amplificadas foi preservado para o ensaio de pirosequenciamento.

A origem geográfica das amostras escolhidas foi o estado do Rio de Janeiro;

Região Sudeste do Brasil (conforme tabela 12). Uma amostra proveniente da Espírito Santo, região Sudeste do país, foi também utilizada. A estratégia para o pirosequenciamento destas amostras foi baseada na amplificação da região não estrutural NS1.

Tabela 12: Amostras de ZIKV pirosequenciadas (*sem informação).

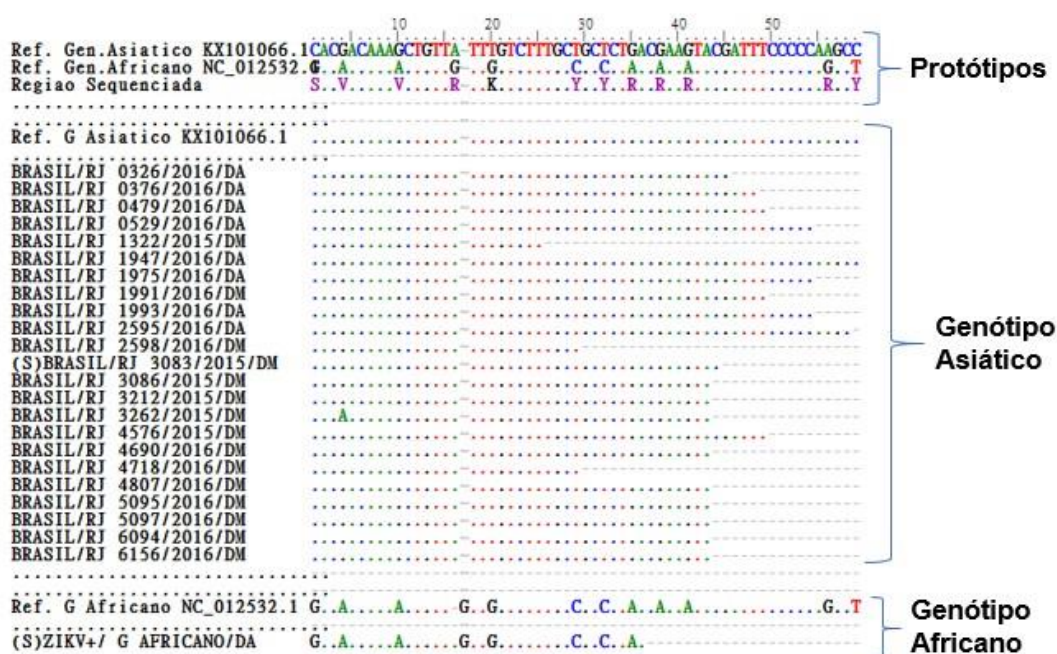
Amostras	Ano	Estado	Município	Bairro	Genótipo
1322	2015	RJ	Rio de Janeiro	Rio Comprido	Asiático
3083	2015	RJ	Rio de Janeiro	Marechal Hermes	Asiático
3086	2015	RJ	Rio de Janeiro	Marechal Hermes	Asiático
3212	2015	RJ	Rio de Janeiro	Barros Filho	Asiático
3262	2015	ES	*	*	Asiático
4576	2015	RJ	Rio de Janeiro	Campo Grande	Asiático
326	2016	RJ	Rio de Janeiro	Marechal Hermes	Asiático
376	2016	RJ	Rio de Janeiro	Gamboa	Asiático
479	2016	RJ	Niterói	Fonseca	Asiático
529	2016	RJ	D. Caxias	Jardim Panamá	Asiático
1947	2016	RJ	S. Gonçalo	Anaiá	Asiático
1975	2016	RJ	Mesquita	Vila Norma	Asiático
1991	2016	RJ	Rio de Janeiro	Freguesia	Asiático
1993	2016	RJ	S. J. Meriti	Édem	Asiático
2595	2016	RJ	Niterói	Ingá	Asiático
2598	2016	RJ	Niterói	Ingá	Asiático
4690	2016	RJ	S. Gonçalo	Engenho Pequeno	Asiático
4718	2016	RJ	Rio de Janeiro	Jacarepaguá	Asiático
4807	2016	RJ	S. Gonçalo	Manilha	Asiático
5095	2016	RJ	D. Caxias	Xerém	Asiático
5097	2016	RJ	D. Caxias	Pilar	Asiático
6094	2016	RJ	Teresópolis	Vila Muqui	Asiático
6156	2016	RJ	Magé	Piabetá	Asiático
REFERÊNCIA GENÓTIPO AFRICANO					

Conforme demonstrado na tabela 9, seis das nossas amostras pertenciam ao ano de 2015 e o restante (17) ao ano de 2016. Todas elas agruparam-se ao genótipo asiático, o mesmo que circula no restante do país.

De todas as amostras pré-selecionadas (33), 10 foram descartadas, restando 24 seguiram para a realização do pirosequenciamento.

Através do alinhamento das sequências da região “NS1” de ZIKV das 23 amostras, mais a cepa referência (genótipo africano), as quais foram realizadas pirosequenciamento, foi possível observar o genótipo existente no Brasil (asiático), bem como diferenciá-lo do genótipo africano (cepa referência MR766) (Figura 21).

Figura 21: Amostras pirosequenciadas (S: amostras sequenciadas também por SANGER; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual).



Como descrito anteriormente, todas as amostras pirosequenciadas reuniram-se no genótipo asiático, apresentando a mesma sequência nucleotídica do protótipo utilizado (KX101066.1), com exceção da amostra 3262/15, que apresentou uma substituição na posição 4 do alinhamento exposto, sendo esta uma substituição de “C” por “T”, na posição 2831 da proteína NS1 da cepa referência utilizada, obtida no GenBank (KJ776791.1).

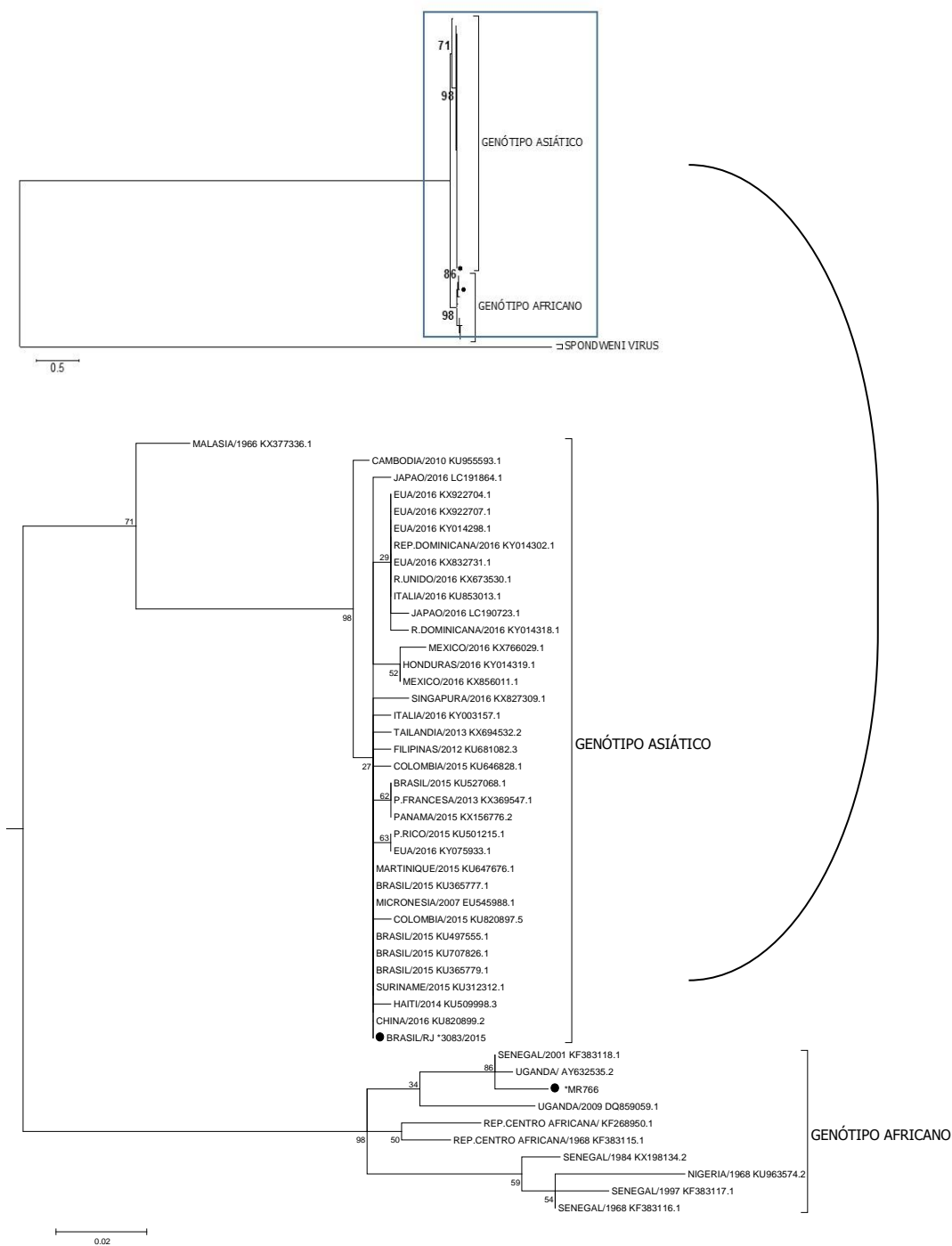
Das 24 análises realizadas no pirosequenciamento, 9 foram por dispensação automática e 15 por dispensação manual de nucleotídeos.

Para corroborar com os resultados do pirosequenciamento, foi realizado sequenciamento pelo método de Sanger em uma amostra e no controle positivo de zika. A análise filogenética delas confirmou o resultado do pirosequenciamento

e, atestou que a amostra 3083/2016 pertencia ao genótipo asiático e nosso controle (protótipo MR766), ao genótipo africano, conforme Figura 22.

O vírus Spodweni foi utilizado como outgroup por ser um vírus próximo, no entanto, conhecidamente mais distante ao zika vírus.

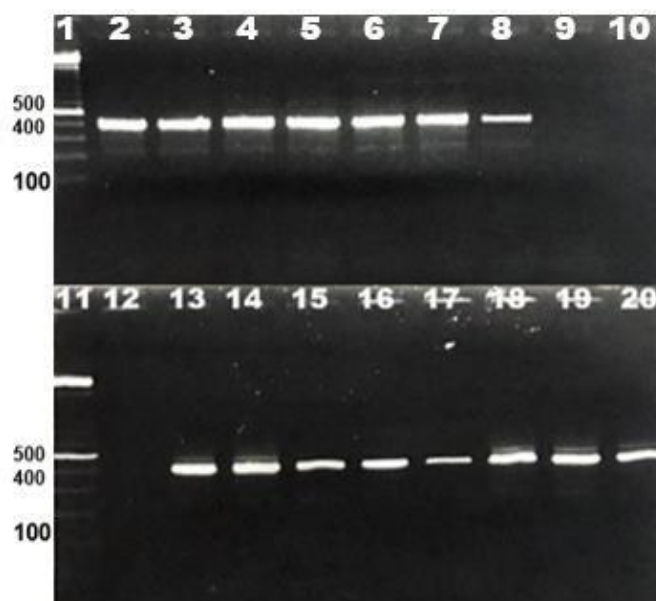
Figura 22: Árvore filogenética baseada na região NS1 das amostras de ZIKV. Método de Máxima Verossimilhança, modelo TN93+G. *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas e fragmentos de até 234pb. Círculos pretos representam as sequências de ZIKV analisadas. Cepas referência de ZIKV foram nomeadas da seguinte forma: país/ano, número de acesso ao GenBank e País/Estado *Número da amostra/Ano.



5.5 Desenvolvimento e avaliação dos ensaios de RT-PCR para CHIKV

Para todas as amostras de CHIKV pré-selecionadas (n=42) realizou-se uma nested RT-PCR para confirmação e observação das bandas das amostras e cepas do vírus. Para isto, foram utilizados iniciadores específicos, descritos por Collao e colaboradores (2010). Os produtos das amplificações estão exemplificados na Figuras 23.

Figura 23: Eletroforese em gel de agarose a 2,0% dos produtos amplificados por RT-PCR (Collao 2010) para confirmação das amostras positivas para chikungunya (fragmento com ~470pb). Poços: 1 e 11 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 10, 13 a 19: amostras positivas; 20: controle positivo para CHIKV (cepa referência genótipo ECSA); 12: controle negativo (água livre de nucleases).



5.6 Caracterização molecular

A estratégia de amplificação utilizada permitia a geração de produtos de aproximadamente 470pb para o pirosequenciamento, tendo em vista os primers utilizados.

O produto da RT-PCR das amostras amplificadas foi preservado para o ensaio de pirosequenciamento.

A origem geográfica das amostras escolhidas foi o estado do Rio de Janeiro; Região Sudeste do Brasil (conforme tabela 13). Todas estas amostras do RJ, após

a realização do pirosequenciamento, mostraram pertencer ao genótipo ECSA. Foram utilizadas 5 amostras, do ano de 2015, provenientes do Oiapoque (AP), região Norte do país, como referências do genótipo asiático. A estratégia para o pirosequenciamento destas amostras foi baseada na amplificação da região da proteína E1 do genoma.

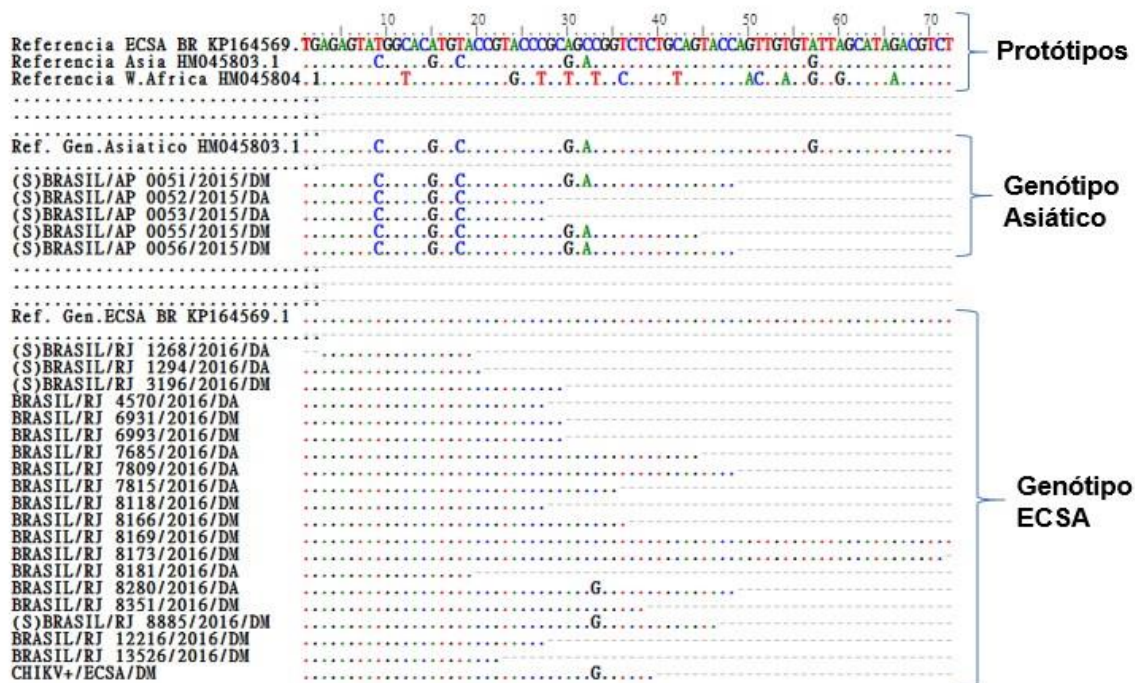
Tabela 13: Amostras de CHIKV pirosequenciadas (*sem informação).

Amostras	Ano	Estado	Município	Bairro	Genótipo
51	2015	AP	*	*	Asiático
52	2015	AP	*	*	Asiático
53	2015	AP	*	*	Asiático
55	2015	AP	*	*	Asiático
56	2015	AP	*	*	Asiático
1268	2016	RJ	*	*	ECSA
1294	2016	RJ	N. Iguazu	Riachão	ECSA
3196	2016	RJ	Mesquita	Chatuba	ECSA
4570	2016	RJ	Cabo Frio	Monte Alegre	ECSA
6931	2016	RJ	Cabo Frio	Monte Alegre	ECSA
6993	2016	RJ	Rio de Janeiro	Vilar dos Teles	ECSA
7685	2016	RJ	Rio de Janeiro	Rio Cumprido	ECSA
7809	2016	RJ	N. Iguazu	Ouro Preto	ECSA
7815	2016	RJ	Rio de Janeiro	Piedade	ECSA
8118	2016	RJ	Rio de Janeiro	Anchieta	ECSA
8166	2016	RJ	Mesquita	Chatuba	ECSA
8169	2016	RJ	B. Roxo	São Jorge	ECSA
8173	2016	RJ	S. J. Meriti	Édem	ECSA
8181	2016	RJ	B. Roxo	São Francisco	ECSA
8280	2016	RJ	Búzios	Cem Braças	ECSA
8351	2016	RJ	Mesquita	Jacutinga	ECSA
8885	2016	RJ	Rio de Janeiro	Costa Barros	ECSA
12216	2016	RJ	Rio de Janeiro	São Cristovão	ECSA
13526	2016	RJ	Rio de Janeiro	*	ECSA
REFERÊNCIA GENÓTIPO ECSA					

A princípio, 42 amostras foram selecionadas, no entanto 18 amostras foram posteriormente descartadas, sendo assim, somente as 24 amostras restantes puderam seguir para a técnica de pirosequenciamento.

Através do alinhamento das sequências da região “E1” de CHIKV das 24 amostras, mais a cepa referência (genótipo asiático), as quais foram realizadas pirosequenciamento, foi possível observar e diferenciar os genótipos existentes no Brasil; genótipo asiático e genótipo ECSA (Figura 24).

Figura 24: Amostras pirosequenciadas (S: amostras sequenciadas também por SANGER; DA: dispensação automática; DM: dispensação manual).



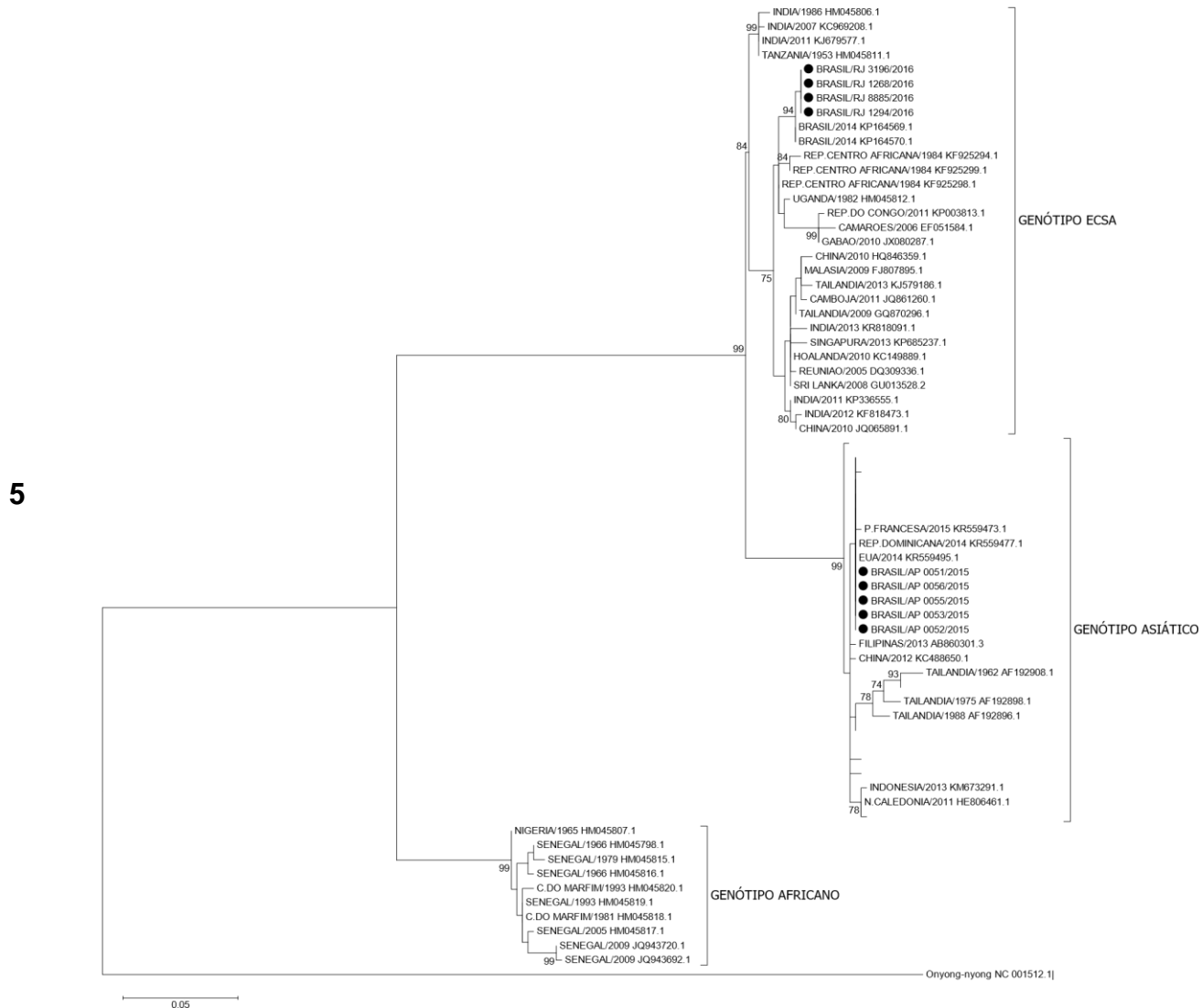
Conforme descrito anteriormente, todas as amostras do Rio de Janeiro pertencem ao genótipo ECSA, protótipo brasileiro (KP164569.1), demonstrando a mesma sequência nucleotídica, com exceção das amostras 8280/16, 8885/16 e do nosso controle (cepa referência), que apresentaram uma substituição na posição 33 do alinhamento demonstrado acima; posição 10665 na proteína E1 do genoma de referência retirado do GenBank (NC 004162.2). Todas as amostras utilizadas como referência para o genótipo asiático (AP) apresentaram exatamente a mesma sequência nucleotídica do protótipo asiático utilizado (HM045803.1).

Das 25 análises por pirosequenciamento, 10 foram por dispensação automática de nucleotídeos e o restante, por dispensação manual. Destas, duas amostras por dispensação manual apresentaram-se relativamente maiores, quando comparadas as restantes, como observado na figura 24.

Para certificar os resultados obtidos no pirosequenciamento, foi realizado sequenciamento pelo método de Sanger em algumas amostras de CHIKV (n=9). A análise filogenética de todas as amostras pesquisadas confirmou o resultado do pirosequenciamento e, comprovou que as amostras do Oiapoque pertenciam ao genótipo asiático e as amostras em estudo do Rio de Janeiro, ao genótipo ECSA, conforme Figuras 25.

Figura 25: Árvore filogenética baseada na região E1 das 9 amostras de CHIKV. Método de Máxima Verossimilhança, modelo GTR+I. *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas, e fragmentos de até 470pb. Círculos pretos representam as sequências de CHIKV analisadas. Cepas referência de CHIKV foram nomeadas da seguinte forma:

País/Ano Número de acesso ao GenBank e País/Estado Número da amostra/Ano.



6 DISCUSSÃO

As novas plataformas de sequenciamento se caracterizam pelo sequenciamento por síntese em tempo real e pela construção de bibliotecas genômicas, que permitem o sequenciamento de genomas extensos. Estas plataformas apresentam como grande vantagem, um sequenciamento altamente representativo de genomas, em um único passo, o que é extremamente importante em virtude da grande redução de custo destas metodologias. A rapidez com que essas novas tecnologias são introduzidas, tanto para coleta, processamento e interpretação dos dados, está permitindo solucionar e até prevenir dificuldades que antes existiam na obtenção de boas amostras de DNA e/ou RNA, por exemplo.

A identificação de variantes virais permite a vigilância epidemiológica, que é fundamental para várias questões, como na escolha de uma cepa vacinal, na identificação da emergência e reemergência de um vírus em determinada região, bem como na identificação de epidemias, por exemplo. Além disso, as pesquisas por sequenciamento permitem a realização de estudos de análise filogenética e evolutiva, importante para saber a origem de novos vírus ou variantes, bem como classificá-los.

Apesar do pirosequenciamento oferecer sequências relativamente menores, em relação a outros tipos de sequenciamento, ele apresenta uma série de vantagens quando comparado ao método de Sanger, por exemplo, que é um método demorado e altamente laborioso. O pirosequenciamento é uma técnica rápida, capaz de ser realizada com protocolos simples de PCR, tendo em vista que os produtos desta, são posteriormente utilizados, isto é, os fragmentos amplificados pela PCR, são os mesmos utilizados no pirosequenciamento, não havendo necessidade de etapas como purificação e corte das bandas, o que leva a uma economia significativa de tempo e necessidade de equipamentos, o que não acontece com o método de Sanger. Em um único experimento de pirosequenciamento é possível sequenciar até 96 amostras, num espaço de tempo que não ultrapassa 2 horas e meia.

A emergência destas arboviroses em locais antes intactos representa um grande desafio para a Saúde Pública em muitos aspectos. A recente entrada de CHIKV e ZIKV no Brasil e em outros países das Américas expôs a população a infecção, uma vez que todos os indivíduos eram vulneráveis, além de não existirem

ainda vacinas disponíveis como método profilático, por exemplo. A entrada desses arbovírus em países já endêmicos para dengue, como o Brasil, pode desencadear uma crise aos serviços de saúde durante epidemias simultâneas. Outro fator preocupante é o impacto econômico destas novas arboviroses, pois, apesar de a maioria dos pacientes infectados com CHIKV, ZIKV e DENV apresentar recuperação completa após a fase aguda da doença, alguns sintomas, como a forte artralgia do chikungunya, que podem durar semanas ou meses, além do desenvolvimento da síndrome de origem autoimune e de ordem neurológica, conhecida como síndrome de Guillain-Barré em alguns pacientes, que causa fraqueza muscular generalizada e paralisia. Adicionalmente, o risco da microcefalia em recém nascidos, causados pelo zika vírus. Estes fatores interferem diretamente nas atividades ocupacionais da população.

Considerando-se todos os problemas relacionados, o zika vírus é hoje um grave problema de saúde pública, tendo em vista os vários problemas decorrentes desta infecção, além da sua rápida dispersão em vários países, podendo ainda, se espalhar por muitos outros, por ser um vírus “novo” e, pelo fato de apresentar diferentes formas de transmissão para os seres humanos; não somente por mosquitos (Basu & Tumban 2016).

Com relação ao zika vírus, nosso estudo corrobora com anteriores, os quais demonstraram que o patógeno que se espalhou por toda a América é intimamente relacionado ao que circulou em várias ilhas do Pacífico em 2013 e 2014. Estes mesmos estudos demonstraram uma homologia de 99,7% com a cepa responsável pelo surto ocorrido na Polinésia Francesa em 2013 (Enfissi A et al., 2016).

Após análise da região NS1, a substituição (C2831T) encontrada em nossa amostra 3262/2015 apresentou-se como uma substituição sinônima.

É inquestionável que a dengue é a doença que mais causa óbitos, no entanto a incapacidade que o chikungunya pode trazer aos pacientes, e as consequências neurológicas resultantes de complicações da zika, são fatores preocupantes. Ações mais eficazes de combate ao vetor, identificação precoce pelos agentes de controle epidemiológico de novas áreas afetadas, buscas de tratamentos mais eficientes com maior especificidade e pesquisas para o desenvolvimento de vacinas se mostram necessários e urgentes.

Nos últimos 20 anos, o estado do Rio de Janeiro foi marcado por extensas epidemias, resultantes da introdução dos DENV-1 em 1986, DENV-2 em 1990,

DENV-3 em 2000 e DENV-4 em 2011, sendo a Região Metropolitana a mais afetada (Nogueira et al., 2005).

O DENV-4 não era detectado no Brasil há 28 anos, após serem relatados os primeiros casos clínicos e laboratoriais de dengue no estado de Roraima, nos anos de 1981-1982. Desde então, nenhum caso adicional foi relatado no país até o reaparecimento do vírus em Boa Vista, estado de Roraima, em 2010. Posterior a estas primeiras detecções do DENV-4 no Brasil, o vírus foi identificado em 2011 nos estados do Amazonas, Amapá e Pará. Além disso, DENV-4 foi detectado sorologicamente em pessoas de vários outros estados, demonstrando o potencial para o vírus se espalhar rapidamente para várias regiões (Nunes et al., 2012).

Desde a primeira detecção do sorotipo 4 no Brasil em 1982, estudos genômicos parciais confirmaram que o vírus inicial estava diretamente associado às estirpes do Caribe, conhecidos como o genótipo II. Este genótipo foi responsável por vários surtos em muitos países do Caribe e da América do Sul (Shu et al., 2009). Análises filogenéticas de diferentes estirpes demonstrou a presença de 2 genótipos diferentes (I e II) de DENV-4 no Brasil (Nunes et al., 2012).

Na época, a introdução de um novo sorotipo no Brasil (DENV-4), depois de quase três décadas de ausência de circulação, além da ocorrência dos dois genótipos se apresentava como um risco de aumento do número de infecções por vírus dengue, incluindo casos graves, no entanto, estes casos graves associados a este novo sorotipo não ocorreram.

Não se conhece exatamente quando nem de onde o genótipo I foi introduzido. Para tanto, estudos de coalescência seriam necessários, além de uma amostragem mais abrangente.

Nosso estudo demonstrou a circulação dos genótipos I e II de DENV-4, nos anos de 2011 e 2012. As amostras de 2012, pertencentes ao genótipo I eram originárias do bairro de Padre Miguel, Zona Oeste do Rio de Janeiro. Este achado é semelhante ao estudo realizado por Campos e colaboradores (2013), que apresentaram a primeira circulação deste genótipo na mesma localidade. Além disto, outras amostras existentes em nosso laboratório demonstraram pertencer ao mesmo genótipo (I), e faziam parte da região de Realengo, localidade vizinha a Padre Miguel (dados não publicados). Este achado nos leva a crer que nestes anos (fim de 2011 e 2012), houve a circulação dos genótipos I e II naquela localidade e até mesmo no estado do Rio de Janeiro. Mais amostras da região e bairros

vizinhos, nestes anos, seriam necessárias para que pudéssemos realizar uma pesquisa completa e confirmar tal hipótese.

As amostras 2651/2013 e 3169/2013 apresentaram uma substituição nucleotídica (A392G) na proteína de capsídeo, quando comparada ao restante das amostras analisadas, assim como nosso controle positivo para o genótipo I (D4+/GENI) que apresentou uma inserção na mesma posição. No entanto, mesmo as outras amostras analisadas para o mesmo genótipo não tendo demonstrado esta inserção, ela é observada também em outras sequências do mesmo genótipo, encontradas no GenBank (AY947539.1 e GQ868594.1, p. ex.), o que pode revelar-se como uma característica particular de cepas de certas regiões da Ásia.

A hiperendemicidade do vírus dengue no Brasil, além do alto potencial de replicação deste vírus, são fatores que contribuem na diversidade viral, levando a um potencial risco de surgimento de novos genótipos.

Diante deste atual cenário no Brasil, onde há circulação simultânea de seis vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, ZIKV e CHIKV) potencialmente danosos a população, faz-se necessária a realização de estudos das características e potencialidades dos mesmos, bem como os efeitos que ainda podem causar ao país.

A vigilância molecular destes vírus é muito importante porque fornece dados sobre os genótipos circulantes dos mesmos em países endêmicos, bem como ajuda na ativação de medidas de controle em casos de possíveis surtos ou epidemias.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, tanto o zika, quanto o chikungunya e o dengue 4 estão presentes de forma ativa em todo território brasileiro, assim como no estado do Rio de Janeiro. Com relação ao CHIKV, observam-se diferentes apresentações (genótipo ECSA e asiático) deste arbovírus no país, onde há a cocirculação de dois genótipos distintos (Nunes et al., 2015).

A atual epidemia CHIKV nas Américas é de grande importância para a saúde pública devido à falta de estratégias de controle e prevenção sustentáveis e eficazes, a grave morbidade da doença, associada a uma população totalmente susceptíveis, e o seu potencial para artralgia persistente, leva a longo prazo, a um prejuízo físico e funcional dos indivíduos.

A introdução nas Américas do vírus chikungunya, genótipo asiático, ocorreu no Caribe e se espalhou pelo restante dos continentes até chegar ao Brasil pelo

estado do Amapá. No entanto, um outro genótipo; Centro-Leste-Sul Africano (ECSA) foi introduzido no país diretamente de outro continente (Rodrigues et al. 2016).

De acordo com nossos estudos, o genótipo ECSA foi detectado pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro, em janeiro de 2016, a partir da genotipagem utilizando pirosequenciamento e confirmado posteriormente por sequenciamento.

Alguns outros estudos demonstraram uma maior similaridade genética entre os *Ae. aegypti* nos estados da Bahia e do Rio de Janeiro, quando comparados aos seus homólogos nos Estados do Norte do Brasil (Monteiro et al. 2014). Esta semelhança poderia estar associada à ocorrência de casos deste genótipo do vírus nestes estados em particular. Uma única substituição (A226V) na proteína E1 de certas estirpes do genótipo ECSA aumentou a transmissibilidade de CHIKV por mosquitos de *Ae. albopictus* (Maha et al. 2015; Madariaga et al. 2016). Esta observação nos leva a considerar a possibilidade de que a substituição particular relatada, possa aumentar a transmissibilidade dos genótipos ECSA no sudeste do Brasil. Para confirmar esta hipótese, devem ser estudadas sequências CHIKV de outros estados brasileiros. No entanto, o significado biológico e epidemiológico desta mutação deve ser investigado.

É importante relatar que para as sequências de CHIKV do Rio de Janeiro, uma única mutação de nucleotídeo (A10625C) foi encontrada e promove a substituição na proteína E1, K277T (dados não publicados), após análise por sequenciamento de Sanger. Esta mutação única não foi relatada anteriormente em nenhuma sequência dos mesmos genótipos de chikungunya. Observando essa substituição, destaca-se a importância do sequenciamento genômico completo das cepas de CHIKV do Rio de Janeiro, o que poderia revelar outras mutações não sinônimas que criassem uma vantagem adaptativa para o vírus.

Nossa pesquisa demonstrou também uma substituição (C10665G) na proteína E1 do genoma de chikungunya, que após análise revelou-se uma substituição sinônima.

O aumento do turismo no Brasil pode explicar a descoberta do genótipo ECSA no Rio de Janeiro. Nunes et al. (2015) propuseram que um indivíduo que viajava de Angola para Feira de Santana, foi o caso índice que importou o genótipo para o Brasil. Sequências de casos do Rio de Janeiro analisadas neste estudo agruparam-se com as sequências ECSA de Feira de Santana, conforme descrito

anteriormente. Uma possível rota de transmissão da Bahia ao Rio de Janeiro deve ser estudada.

Este estudo avaliou duas formas de dispensação para realização do pirosequenciamento, a fim de considerar a que melhor atendesse nossos objetivos.

Para DENV-4, foram pré-selecionadas para o pirosequenciamento 33 amostras, além da cepa referência, no entanto, posteriormente, 22 foram pesquisadas. Destas, 17 foram por dispensação manual e 5 por dispensação automática de nucleotídeos.

Para ZIKV, um total de 24 amostras foram pirosequenciadas, onde, 15 foram por dispensação manual e o restante por dispensação automática.

Por fim, um total de 42 amostras de CHIKV foram pré-selecionadas para o pirosequenciamento, porém, 25 amostras, incluindo a cepa referência, foram investigadas pela metodologia, sendo destas, 10 por dispensação automática e 15 por dispensação manual de nucleotídeos.

Observou-se que o tipo de dispensação influenciava no resultado das sequências, tendo em vista que algumas amostras sequenciadas por dispensação automática muitas vezes apresentaram sequências ruins, a partir de um certo número de nucleotídeos, ou nem mesmo era possível serem analisadas, justificando assim a maior quantidade de amostras que foram realizadas por dispensação manual, para os três agravos estudados.

Ainda que com sequências menores que esperadas, foi possível diferenciar os genótipos de todos os vírus pesquisados, como demonstrado nos resultados. Isso confirma que a técnica de pirosequenciamento demonstrou-se como um método de triagem rápido e eficaz para tal objetivo.

7 PERSPECTIVAS

- Embora se conheça os genótipos dos DENV-4, CHIKV e ZIKV que circulam no Brasil e no estado do Rio de Janeiro, a introdução de novos genótipos pode ocorrer, levando-se em consideração que são vírus relativamente novos no país. Pretendemos, desta forma, continuar a vigilância destes arbovírus circulantes, através da genotipagem de cepas isoladas durante períodos epidêmicos e interepidêmicos, por meio do pirosequenciador PyroMark Q96 ID;
- Validar a técnica de pirosequenciamento para triagem de genótipos dos vírus DENV-4, CHIKV e ZIKV, bem como para os outros sorotipos dengue.

8 CONCLUSÕES

- A análise realizada em nossas amostras de DENV-4, demonstrou a cocirculação dos genótipos I e II do vírus, nos anos de 2012 e 2013, no estado do Rio de Janeiro;
- Esta pesquisa corroborou com o atual cenário brasileiro, bem como com estudos anteriores, os quais só demonstraram até o momento a circulação do genótipo asiático do vírus zika no país;
- A investigação feita nas amostras de chikungunya evidenciaram que as mesmas pertenciam ao genótipo ECSA, além de revelar também uma mutação única, não relatada anteriormente em nenhuma sequência do mesmo genótipo vírus;
- A técnica de pirosequenciamento revelou-se uma metodologia bastante eficiente para a abordagem proposta e pode ser utilizada como uma técnica de genotipagem rápida e confiável para a detecção de diferentes genótipos virais;
- Em função das leituras curtas produzidas por esta tecnologia, bem como seu custo relativamente alto, seu uso na genômica se restringe a triagem de genótipos e de possíveis variantes virais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez DE, Lodeiro MF, Ludeña SJ, Pietrasanta LI, Gamarnik AV. 2005. Long-range RNA–RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* V.79, p. 6.631–43.

Anderson CR & Rico-Hesse R. 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 75(5):886-92.

Anderson CR, Downs WG, Hell AE. 1956. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science.* 124(3214):224-5

Araújo, J. et al. 2009. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol* [S.l.], v. 9, n. 4, p. 716-25.

Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB. 2013. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PLoS One.* 8(2):e57548.

Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparç-Goffart I, de Lamballerie X. 2014. Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc.* 2(3). pii: e00500-14.

Basu R & Tumban E. 2016. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Virology Journal.* 13:165

Beaty B, Trent D, JT R. 1988. Virus variation and evolution: mechanisms and epidemiological significance. *In: Arboviruses Epidemiol. Ecol.*, Boca Raton: CRC Press, Monath TP, pp. 59–85.

Brault AC, Powers AM, Holmes EC, Woelk CH, Weaver SC. 2002. Positively charged amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of venezuelan equine encephalitis virus. *J. Virol.* 76: 1718–1730.

Calisher C H, Karabatsos N, Dalrymple J M, Shope R E, Porterfield J S, Westaway E G & Brandt W E. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross- neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology.* 70, 37-43.

Calisher C, Karabastos N. 1988. Arbovirus serogroups: Definition and geographic distribution. *In: Arboviruses Epidemiol. Ecol.*, Boca Raton, Florida, pp.

19–57.

Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ES, de Sequeira PC, de Mendonça MC, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, Dos Santos FB, Nogueira RM, Tanuri A, de Filippis AM. 2016. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis.** 16(6):653-60.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. 2015. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 21(10):1885-6.

Campos R de M, Veiga CS, Meneses MD, de Souza LM, Fernandes CA, Malirat V, Albuquerque JP, Tanuri A, Schmidt-Chanasit J, Ferreira DF. 2013. Emergence of Dengue virus 4 genotypes II b and I in the city of Rio de Janeiro. **J Clin Virol.** 56(1):86-8.

Cangussu LR. 2016. Revisão sobre o zika vírus. Disponível em: <http://www.luciacangussu.bio.br/index.php/materias/275-tudo-sobre-zika>.

Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA, Musso D. 2014. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerg Infect Dis.** 20:1085–1086.

Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, Vial AL, Decam C, Choumet V, Halstead SK, Willison HJ, Musset L, Manuguerra JC, Despres P, Fournier E, Mallet HP, Musso D, Fontanet A, Neil J, Ghawché F. 2016. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet.** 387(10027):1531-9.

Carvalho MCCG, Silva DCG. 2010. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural.** V.40, n.3, p.735-744.

Casseb ADR, Casseb LMN, Silva SP Da, Vasconcelos PFDC. 2013. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootec.** 20: 391–403.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann Rev Microbiol.** V.44, p.649-688.

Chan M & Johansson MA. 2012. The incubation periods of dengue viruses. **PLoS ONE.** 7(11): e50972.

Chiu WW, Kinney RM, Dreher TW. 2005, Control of translation by 5'and 3'terminal regions of the dengue virus genome. **J. Virol.** Vol. 79, n. 13, p. 8.303-15.

Collao X, Negredo AI, Cano J, Tenorio A, Ory F, Benito A, Masia M, SánchezSeco MP. 2010. Short Report: Different Lineages of Chikungunya Virus in Equatorial Guinea in 2002 and 2006. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 82(3), 2010, pp. 505–507.

Cordeiro JS. 2010. Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. Dissertação de Mestrado, Ministério da Ciência e Tecnologia – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

de Paiva TM. 2015. Use of molecular test for adenovirus detection between different pediatric patients. **Rev Paul Pediatr.** 33(2):134-5.

Dias CN, Moraes DF. 2014. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. **Parasitol Res.** 113: 565–92.

Dick GW. 1952. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 46:521–534.

Enfissi A, Codrington J, Roosblad J, Kazanji M, Rousset D. 2016. Zika virus genome from the Americas. **Lancet.** 387(10015):227-8.

Faria NR, Azevedo Rdo S, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami FG, Macedo FL, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz AC, Nunes BT, Medeiros DB, Rodrigues DS, Nunes Queiroz AL, da Silva EV, Henriques DF, Travassos da Rosa ES, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LM, Simith Dde B, Messina JP, Abade L, Lourenço J, Carlos Junior Alcantara L, de Lima MM, Giovanetti M, Hay SI, de Oliveira RS, Lemos Pda S, de Oliveira LF, de Lima CP, da Silva SP, de Vasconcelos JM, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Júnior JL, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, de Oliveira WK, Tesh R, Pybus OG, Nunes MR, Vasconcelos PF. 2016. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science.** 352(6283):345-9.

Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, Zanotto PM, Sall AA. 2014. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLoS Negl Trop. Dis.** 8:e2636.

Figueiredo L. 2000. The Brazilian flavivirus. **Microbes Infect [S.I.]**, v. 2, n. 13, p. 1643-9.

Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. 2016. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**. 352(6287):816-8.

Goupil BA, Mores CN. 2016. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **Open Rheumatol J**. 10:129-140.

Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, Fontenille D, Paupy C, Leroy EM. 2014. Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. **PLoS Negl Trop Dis**. 8:e2681.

Gubler DJ. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: **Cab. International**. p. 1-21.

Gubler DJ. 2002 (a). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res**. 33: 330–342.

Gubler DJ. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **TRENDS in Microbiology**. 10:100-103.

Gubler DJ. 2006. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Found Symp**. 277:3-16.

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

Gubler DJ, Trent DW. 1993. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect Agents Dis**. 2(6):383-93.

Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. 2011. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**. 29(42):7229-41.

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

Guzman MG, Kouri G. 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol**. 27(1):1-13.

Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Álvarez M, Rodríguez R, Kourí G, los Reyes J, Acevedo F. 1997. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**. 1(3).

Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. 2012. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 6:e1477.

Halstead SB. 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 239: 476-481.

Handler MZ, Handler NS, Stephany MP, Handler GA, Schwartz RA. 2016. Chikungunya fever: an emerging viral infection threatening North America and Europe. *International Journal of Dermatology.* 56(2):e19-e25.

Harris AF, Nimmo D, McKemey AR, et al. 2011. Field performance of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol.* 29: 1034–37.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, et al. 2011. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 476: 454–57.

Holmes EC 1998. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. *Br Med Bull.* 54(3):533-43.

Holmes EC, Twiddy SS. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol.* 3(1):19-28.

Hurk AF van den, Ritchie S a, Mackenzie JS. 2009. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu. Rev. Entomol.*54: 17–35.

Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, Ande SR, Alizadeh J, Wiechec E, Lindsay R, Drebot M, Coombs KM, Ghavami S. 2016. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev. Mol. Med.* 18: e1.

Jaffar-Bandjee MC, Das T, Hoarau JJ, Krejbich Trotot P, Denizot M, Ribera A, Roques P, Gasque P. 2009. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes Infect/Inst Pasteur.* 11(14-15): 1206-8.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nat. Lett.*451: 990–994.

Karabastos N. 1985. *International catalogue of arboviruses: including certain other viruses of vertebrates* (N Karabastos, Ed.). Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, In: *Am Soc Trop Med Hyg.* San Antonio, Tex.

Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**. 83: 3075-3084.

Korhonen EM, Huhtamo E, Smura T, Kallio-Kokko H, Raassina M, Vapalahti O. 2016. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. **Euro Surveill**. 21(2).

Kuno G, Chang GJJ. 2005. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin. Microbiol. Rev.** 18: 608–637.

Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, de Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P.. 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**. 120(3):894-906.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. 2007. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis**. 13(5): 764–767.

Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, del Carmen Castillo Signor L. 2016. Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerg Infect Dis**. 22(5):933-5.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 30(3), p. 545-551.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 virus. **J Gen Virol [S.I.]**. v. 75 (Pt 1), p. 65-75.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. 2008. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**. 14(8):1232-9.

Levada PM, Moraes CF, Corvino SM, Grotto RM, Silva GF, Pardini MI. 2010. Reverse hybridization and sequencing for genotyping the hepatitis C virus. **Rev Soc Bras Med Trop**. 43(2):135-8.

Lima-Camara TN. 2016. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Rev. Saúde Pública.** 50: 1–7.

Madariaga M, Ticona E, Resurrecion C. 2016. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Braz J Infect Dis.** 20(1), 91-8.

Maha MS, Susilarini NK, Hariastuti NI Subangkit. 2015. Chikungunya Virus Mutation, Indonesia. 2011. **Emerg Infect Dis.** 21(2), 379–81.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL 2004. Dengue viral infections. **Postgrad Med J.** 80(948):588-601.

Mavalankar D, Shastri P, Bandyopadhyay T, Parmar J, Ramani KV. 2008. Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. **Emerging Infectious Diseases.** V. 14, n. 3.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus 2003. **Emerging Infectious Diseases.** V.9, p.800–809.

Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, Withana N, Gubler DJ, De Silva AM. 2002. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg [S.I.].** v. 66, n. 6, p. 765-73.

Monteiro FA, Schama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. 2014. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: patterns following an eradication program. **PLoS Negl Trop Dis.** 18;8(9), e3167.

MS - Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Guia de Vigilância Epidemiológica. 4.ed, 547p.

MS/SVS. 2014 – Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2014. Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil.

Musso D, Gubler DJ. 2016. Zika virus. **Clin Microbiol Rev.** 29:487–524.

Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2011;106(3):255-6.

Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Rev Panam Salud Publica.** 2007; 22:358-363.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. 2001. Dengue virustype3 in Rio de Janeiro, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 96: 925-926.

Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, Azevedo Rdo S, da Silva DE, da Silva EV, da Silva SP, Carvalho VL, Coelho GE, Cruz AC, Rodrigues SG, Vianez JL Jr, Nunes BT, Cardoso JF, Tesh RB, Hay SI, Pybus OG, Vasconcelos PF. 2015. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine.** 13: 102.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC Jr, Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF. 2012. Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging Infectious Diseases.** Vol. 18, No. 11.

Oliveira CS, Vasconcelos PFC. 2016. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de Pediatria.** 92:103---5.

Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1983;25(1):53-4.

Pan American Health Organization, PAHO. 2015. Number of reported cases of CHIK fever in the Americas by country or territory 2013-2014, and 2015. Disponível

em:http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en

Paniz-Mondolfi AE, Rodriguez-Morales AJ, Blohm G, Marquez M, VillamilGomez WE. 2016. ChikDenMaZika Syndrome: the challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** 15: 42.

Papavero N, Guimarães JH. 2000. The Taxonomy of Brazilian Insects Vectors of Transmissible Diseases (1900-2000) - Then and Now. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95: 109–118.

Pei-Yun Shu, Chien-Ling Su, Tsai-Ling Liao, Cheng-Fen Yang, Shu-Fen Chang, Chien-Chou Lin, Mei-Chun Chang, Huai-Chin Hu, Jyh-Hsiung Huang. 2009. Molecular Characterization of Dengue Viruses Imported Into Taiwan during 2003–

2007: Geographic Distribution and Genotype Shift. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 80(6), pp. 1039–1046.

Pfeffer M, Dobler G. 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasit Vectors.** 3(1):35.

Rambaut A. 2000. Estimating the rate of molecular evolution: incorporating noncontemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies.

Bioinformatics. 16(4):395-9.

Regenmortel M van, Fauquet C, Bishop D, Carstens E, Estes M, Lemon M, Maniloff J, Mayo M, McGeogh D, Pringle C, Wickner R. 2000. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego.

Rice CM, Aebersold R, Teplow DB, Pata J, Bell JR, Vorndam AV, Trent DW, Brandriss MW, Schlesinger JJ, Strauss JH. 1986. Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. **Virology [S.I.]**, v. 151, n. 1, p. 1-9.

Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology.** 230(2):244-51.

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

Rico-Hesse R. 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv Virus Res.** 59:315-41.

Rocco IM, Kavakama BB, Santos CL. 2001. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 43(1):55-7.

Rodrigues FN, Lourenço J, Marques CE, Maia LM, Pybus O, Carlos JAL. 2016. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLOS Currents Outbreaks.** Edition 1.

Rogers YH, Venter JC. 2005. Genomics: massively parallel sequencing. **Nature.** 437(7057):326-7.

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P. 1996. Realtime DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. **Anal Biochem.** 242(1):84-9.

Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. 1998. A sequencing method based on realtime pyrophosphate. **Science.** 281(5375):363, 365.

Rosen L. 1977. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. ***American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***. 26:337-343.

Rossini G, Landini MP, Sambri V. 2016. Chikungunya Virus: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Evolution and Epidemiology of Chikungunya Virus. ***Springer Protocols***. Vol. 1426.

Rupsa B, Ebenezer T. 2016, Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. ***J. Virol***. 13:165.

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J. 2012. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. ***Lancet***. 380: 1559–67.

Sabin AB. 1952. Research on dengue during World War II. ***Am J Trop Med Hyg***. 1(1):30-50.

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. ***BMC Microbiology***. 7:9.

Sanofi Pasteur. 2016. Sanofi Pasteur dengue vaccine: frequently asked questions. Disponível em: <http://www.dengue.info/sites/default/files/media-faqsdenqueinfo-july2016.pdf>.

Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, Medina F, Colón C, Margolis H, Muñoz-Jordán JL. 2013. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. ***PLoS Negl Trop Dis***. 11;7(7):e2311.

Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***. 81(2):245-6.

Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. ***PLoS Med***. 3 (7): e263.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2009. Informe Epidemiológico da Dengue – Análise de situação e tendências.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2010. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências. Disponível em: http://www.dengue.org.br/informe_da_dengue_2010.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2015. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990-2014.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. 2016. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---DengueSE49-publicacao.pdf>.

Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. 2009. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*. 393. 183–197.

Sousa DMC. 2014. Caracterização genética e evolução dos vírus dengue no estado do Rio Grande do Norte. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Strauss EG, Rice CM, Strauss JH. 1984. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*. 133(1):92-110.

Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology na Evolution*. 10:512-526.

Teixeira MG, Andrade AM, Costa Mda C, Castro JN, Oliveira FL, Goes CS, Maia M, Santana EB, Nunes BT, Vasconcelos PF. 2015. East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis*. 21(5):906-7.

Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF. 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 17(5):938-40.

Thomas SJ, Endy TP. 2011. Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis*. 24: 442–50.

Uniscience. 2016. Disponível em: <http://www.uniscience.com/pdf/HRM.pdf>.

Valle D, Pimenta DN, Cunha RV. 2015. Dengue: teorias e práticas. Editora Fiocruz, Brasil.

Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. 2011. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**. 9:532-541.

Vasilakis N, Weaver SC. 2008. The history and evolution of human dengue emergence. **Adv Virus Res**. 72:1-76.

Veerakumar K, Govindarajan M, Rajeswary M. 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Sida acuta* (Malvaceae) leaf extract against *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles tephensi*, and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**. 112: 4073–85.

Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever 1999. **Lancet**. V.354, p.1431–1434.

Waymouth HE, Zoutman DE, Towheed TE. 2013. Chikungunya-related arthritis: case report and review of the literature. **Semin Arthritis Rheum**. 43(2): 273-8.

Weaver SC, Barrett ADT. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nat. Rev. Microbiol**. 2: 789–801.

Weaver SC, Powers ANNM, Brault AC, Barrett ADT. 1999. Molecular Epidemiological Studies of Veterinary Arboviral Encephalitides. **Vet. J.**157: 123–138.

Weaver SC, Vasilakis N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect Genet Evol**. 9(4):523-40.

Weaver SC. 2006. Evolutionary influences in arboviral disease. **Curr Top Microbiol Immunol**. 299: 285–314.

World Health Organization (WHO). 1985. Arthropod-borne and rodent borne viral diseases. Report of a WHO Scientific Group. 719: 1–115.

World Health Organization (WHO). 2009. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Bolivia. 170 pp. Disponible em: <http://www.who.int/denguecontrol/en/>.

World Health Organization (WHO). 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva: World Health Organization ISBN 978 92 4 156454 0.

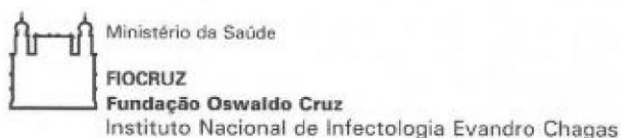
Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. 2016. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *J Infect Dis.* 214(suppl 5):S441S445.

Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. 2009. A protective role for dengue virusspecific CD8+ T cells. *J Immunol.* 182: 4865–73.

Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110:569–572.

10 ANEXOS

10.1 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2015.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

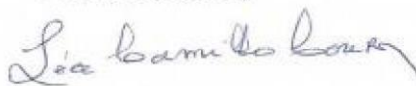
Para: Dra. Patrícia Brasil

Prezada Dra. Patricia,

Com referência ao projeto “**Detecção de formas não usuais de dengue a partir da vigilância de síndrome febris agudas**”, CAAE 0026.0.009.000-07, aprovado por este Comitê em 04/06/2007 – Parecer 027/2007, acusamos o recebimento da NOTIFICAÇÃO de inclusão de amostras de saliva e urina e eventualmente lágrima, para investigação de novas viroses como a infecção por Zika, recentemente demonstrada no soro dos participantes do projeto mencionado. Foi apresentado um novo TCLE (Versão de 20 de outubro de 2015).

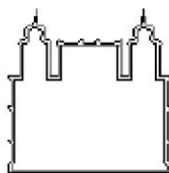
Este documento foi apreciado e aprovado por esta Coordenação na presente data.

Atenciosamente,



Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

10.2 Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2014.

Solicitação de extensão do prazo de execução de projeto e emenda

Título do Projeto: *"Dengue no Brasil: vigilância virológica, epidemiologia molecular e padronização de método sorológico utilizando antígenos recombinantes".*

Protocolo de pesquisa: 274/05

Pesquisador Responsável: Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira.

Instituição: Laboratório de Flavivirus do IOC/Fiocruz

Foi submetido à apreciação do CEP Fiocruz/IOC e APROVADA a solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado até 2016, e a emenda solicitando a inclusão de Biomanguinhos como colaborador do projeto.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação da solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado.

Informamos que deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

José Henrique da Silva Pilotto

Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
(CEP Fiocruz-IOC)

10.3 Resumo enviado e aceito ao Congresso de Medicina Tropical 2016

Detecção do genótipo ECSA do vírus chikungunya em casos autóctones do Rio de Janeiro

Cintia D.S. Rodrigues^{1,2}, Marcos César L. de Mendonça¹, Maria Celeste Torres^{1,2}, Rita MR Nogueira¹, Ana Maria B. de Filippis¹

¹ Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz, Caixa Postal 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Email: cintia.damasceno@ioc.fiocruz.br. ²Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Fundação Oswaldo Cruz Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

O vírus Chikungunya (CHIKV), é um vírus RNA fita simples pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Seus principais vetores são os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. A particularidade mais significativa da febre chikungunya (CHIK) é caracterizada por fortes dores articulares que podem persistir por semanas e até anos. Embora sorotipo único, três genótipos foram identificados até o momento; genótipo do Centro-Leste-Sul-Africanos (ECSA), genótipo do Oeste Africano e genótipo Asiático. O genótipo asiático de CHIKV foi introduzido na região das Américas pela Ilha de San Martin, no final de 2013 e se espalhou por todos os países da América Central e Caribe, sendo o genótipo dominante. Em Setembro de 2014 foram confirmados no Brasil casos autóctones de chikungunya nas cidades do Oiapoque e Feira de Santana, com a detecção dos genótipos Asiático e ECSA, respectivamente. O genótipo asiático detectado no Oiapoque foi introduzido pela Guiana Francesa e o ECSA, em Feira de Santana, importando de Angola. No Rio de Janeiro, casos autóctones de CHIKV foram confirmados por sorologia em Novembro de 2015, mas somente em Janeiro de 2016 foram confirmados os primeiros casos por qRT-PCR, permitindo posterior determinação do genótipo circulante, através do sequenciamento da região E1 do genoma pela técnica de pirosequenciamento em PyroMark Q96 ID e sequenciamento de Sanger. Através da análise filogenética, identificamos o genótipo de 8 amostras do Rio de Janeiro. Todas as amostras pertencem ao genótipo ECSA, apresentando uma única substituição nucleotídica quando comparadas com outras sequências do mesmo genótipo circulante em Feira de Santana. Considerando que as amostras analisadas do RJ apresentaram o mesmo padrão quando comparadas com as de Feira de Santana, pretendemos realizar o sequenciamento total do genoma dessas cepas para pesquisar a presença de outras substituições ao longo do genoma.

Palavras-chave: vírus, chikungunya, genótipo, autóctone, Rio de Janeiro.

Apoio: FAPERJ, CNPq, Capes, IOC/FIOCRUZ