

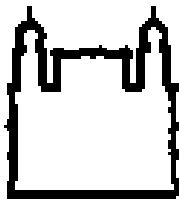
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Epidemias causadas pelo vírus dengue tipo 2 (DENV-2) no  
Estado do Rio de Janeiro: estudo da viremia após a re-  
emergência de uma nova linhagem**

**PRISCILA CONRADO GUERRA NUNES**

**Rio de Janeiro**

**2012**



**MINISTÉRIO DA SAÚDE**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**Priscila Conrado Guerra Nunes**

**Epidemias causadas pelo vírus dengue tipo 2 (DENV-2) no  
Estado do Rio de Janeiro: estudo da viremia após a re-emergência  
de uma nova linhagem**

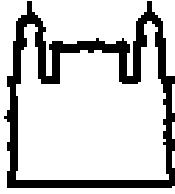
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bispo de Filippis

Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Ribeiro Nogueira

**RIO DE JANEIRO**

**2012**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical

Priscila Conrado Guerra Nunes

Epidemias causadas pelo vírus dengue tipo 2 (DENV-2) no Estado do Rio de Janeiro: estudo da viremia após a re-emergência de uma nova linhagem

**Orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bispo de Filippis**

**Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Ribeiro Nogueira**

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Leite Baptista**

**Prof. Dr. Edson Elias da Silva**

**Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa**

**Prof. Dr. Fernando do Couto Motta**

RIO DE JANEIRO

2012

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Laerte e Clarisi, e minha irmã, Ana Clara  
que sempre me apoiaram e acreditaram  
no meu potencial. Amo vocês!

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende  
o que ensina (Cora Carolina)

Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes  
coisas do homem foram conquistadas do que  
parecia impossível.  
(Charles Chaplin)

Ó Senhor Deus, eu te agradeço de todo o  
coração; Quando te chamei, tu me respondeste;  
deste-me força e coragem. (Salmos 138:1,3)

## **AGRADECIMENTOS:**

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Bispo pela paciência, pelas horas perdidas corrigindo a minha dissertação, pela atenção dispensada, pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho, pela orientação em todos os momentos, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento, pela compreensão, por sua imensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Rita Nogueira me faltam palavras para agradecer tudo o que você fez na minha vida. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a dissertação, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade e de dor. Obrigada pelos conselhos, pelas aulas, pelo apoio, pelo amor, por me tratar não só com aluna, mas como filha. Obrigada pelo crescimento profissional e pessoal que você me concedeu.

Aos coordenadores, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e Dr<sup>a</sup> Alda Maria da Cruz, da Pós graduação em Medicina Tropical pelo apoio durante a conclusão deste trabalho

A Secretária, Ingrid Santos, da PGMGT pelo apoio e disponibilidade em tirar minhas dúvidas

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa

Ao Dr. Pedro Cabello pela aplicação dos testes estatísticos.

Ao Doutor Josélio Araújo por iniciar a minha carreira científica e por aceitar ser o revisor deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo, Dr<sup>a</sup>. Márcia Leite Baptista, Dr. Edson Elias da Silva, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e ao Dr. Fernando do Couto Motta por aceitarem a participar da avaliação deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Flávia dos Santos pelo apoio, por todos os conselhos e principalmente pela amizade.

A doutoranda Monique Lima falta palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Obrigada pelos conselhos, pela confiança, estímulo, amizade e acima de tudo aturar todas as minhas lamúrias.

A mestranda Fernanda Nogueira e a IC Clarice Monteiro, pela ajuda no sequenciamento e na construção da árvore filogenética.

Aos colegas do LabFla, Carla Sousa, Manoela Heringer, Jaqueline Bastos, Anielly Ferreira, Márcia Castro, Denilde Ferreira, Solange Regina, Maria Aparecida, Ana Miranda, Simone Sampaio, Eliane Araújo, Leda Santos, Dinair Lima, Nieli Faria, Monique Lima, Bianca de Santis, José Farias, por todo apoio nas provas realizadas e pela agradável convivência.

Ao Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo, principalmente o Pesquisador Fernando Motta, e ao Laboratório de Virologia Comparada por disponibilizar o equipamento de PCR em tempo real 7500 para a realização deste trabalho.

Aos Drs Otacílio Moreira e Daniele Pita pela ajuda na compreensão da metodologia de PCR em tempo real.

A Angélica Cardoso pela ajuda na técnica de PCR em tempo real, por disponibilizar o 7500 da plataforma, pelo carinho, pelos conselhos e por todo o tempo investido esperando o termina da minha corrida.

Ao amigo Fernando Castro pela árdua ajuda e empenho em me ensinar estatística.

Aos amigos Lívia Lopes e Bruno Andrade pela amizade que ultrapassou a PGMT e que levarei para o resto da vida.

Às minhas amigas Thais Paes, Érika Casado, Janette Morais e Patrícia Monsore por todo carinho, compreensão e por sempre torcerem por mim.

Ao meu namorado Fernando Lira, por me fazer voltar a sorrir, por fazer minha vida mudar para melhor, por toda paciência, pelo amor, carinho e principalmente por cuidar de mim.

A Deus, pois se o Senhor não tivesse sido o meu refúgio, o meu porto seguro nas horas de tempestades e ventos contrários, o barco da minha vida teria se perdido na imensidão do infinito, mas na certeza de que tu Senhor nunca me abandonou é que neste momento de

vitória digo com o meu coração grato: Obrigada Senhor, bendito seja o teu nome agora e para sempre.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	xiv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	xvii
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	xix
<b>RESUMO</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1. HISTÓRICO</b>	1
<b>1.2. VÍRUS DENGUE</b>	1
1.2.1. Classificação, Morfologia e Propriedades Físico-Químicas	1
1.2.2. Estrutura do Genoma	3
1.2.3. Diversidade Genética	4
1.2.4. Replicação	7
1.2.5. Transmissão	9
<b>1.3. VETOR</b>	9
<b>1.4. EPIDEMIOLOGIA</b>	11
1.4.1. Dengue nas Américas	12
1.4.2 Dengue no Brasil	14
<b>1.5. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR DENGUE</b>	17
1.5.1. Dengue Clássico (DC)	17
1.5.2 Febre Hemorrágica do Dengue (FHD)	18
1.5.3 Dengue com Complicações (DCC)	18
1.5.4 Nova Classificação das Infecções por Dengue	19
<b>1.6 PATOGENIA</b>	19
1.6.1. Viremia e Cinética da Resposta Humoral	21
<b>1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL</b>	22
1.7.1 Isolamento Viral e Teste de Imunofluorescência Indireta	23
1.7.2. Testes Imunoenzimáticos	23
1.7.3. Inibição da Hemaglutinação (HI)	25
1.7.4. Fixação do Complemento	25

1.7.5. Teste de Neutralização em Placa (PRNT)	25
1.7.6. Técnica Imunohistoquímica	26
1.7.7 RT-PCR	26
1.7.8 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	26
<b>1.8. PREVENÇÃO E CONTROLE</b>	28
1.8.1 Profilaxia	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	31
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b>	31
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	31
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	32
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
<b>4.1 DESENHO DO ESTUDO</b>	33
<b>4.2 AMOSTRAGEM</b>	33
<b>4.3 CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE</b>	34
<b>4.4. ISOLAMENTO VIRAL</b>	34
4.4.1. Metodologia	34
4.4.2 Meio de Cultura L-15 (Leibovitz)	35
4.4.3 Antibióticos	35
4.4.4 Solução de Hanks BSS	36
<b>4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)</b>	37
4.5.1. Metodologia	37
4.5.2 Tampão Salina Fosfato 10X (Phosphate Buffer Saline-PBS)	38
4.5.3 Glicerol Tamponado	39
4.5.4 Preto de Naftaleno 1% em Tampão Salina Fosfato	39
<b>4.6 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO</b>	39
4.6.1 Captura de anticorpos da classe IgM anti-DENV	39
4.6.1.a Metodologia	40

4.6.2 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV	40
4.6.2.a Metodologia	41
4.6.3 Captura de antígenos NS1	41
4.6.3.a Metodologia	42
<b>4.7.EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL</b>	42
4.7.1. Metodologia	42
<b>4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR)</b>	43
4.8.1. Metodologia	44
4.8.2 10 mM desoxinucleotídeos (dNTPs)	46
4.8.3. Gel de agarose 1% em TBE 0,5X	46
4.8.4. Diluição do padrão de peso molecular	47
<b>4.9. RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PELO SISTEMA TAQMAN (QRT-PCR)</b>	47
4.9.1 Curva Padrão	47
4.9.2 Tampão de diluição para Curva Padrão	48
4.9.3 Metodologia da RT-PCR em tempo real	49
<b>4.10. RT-PCR PARA A TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO</b>	50
4.10.1. Iniciadores	50
4.10.2. Metodologia	51
4.10.3. Análise dos amplicons	52
4.10.4. Purificação de produto de PCR para reação de sequenciamento por extração em gel de agarose	52
4.10.4.a Metodologia	53
4.10.5. Purificação de produto de RT- PCR diretamente da reação de RT-PCR para reação de sequenciamento	53
4.10.5.a. Metodologia	53
4.10.6. Quantificação do DNA	54

4.10.7. Reação de sequenciamento do DNA	54
4.10.8. Purificação e precipitação de DNA para remoção de “dye terminators” não incorporados	55
4.10.8.a Metodologia	55
4.10.9. Análise filogenética	55
<b>4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	56
<b>4.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b>	56
<b>5. RESULTADOS</b>	57
<b>5.1 Avaliação das diferentes metodologias na confirmação dos casos estudados</b>	58
<b>5.2. Teste de Especificidade do protocolo de qRT-PCR descrito por Poersch et al. (2005)</b>	59
<b>5.3. Curva padrão</b>	60
<b>5.4 Carga viral em relação aos dias de início da doença e apresentação clínica</b>	62
<b>5.5. Relação da variável idade com a carga viral</b>	63
<b>5.6. Relação da variável sexo com a carga viral</b>	63
<b>5.7. Relação da resposta imune com a carga viral</b>	64
<b>5.8. Relação carga viral e a evolução clínica: Dengue e Dengue grave</b>	64
<b>5.9. Relação da Linhagem com a carga viral</b>	65
<b>5.10. Análise dos casos da Linhagem I</b>	66
<b>5.11. Análise dos casos da Linhagem II</b>	67
<b>5.12. Análise dos casos da Linhagem II e a sua relação entre a resposta imune e a classificação da doença</b>	67
<b>5.13. Relação entre a Densidade Ótica (DO) do teste de Captura do antígeno NS1 com a gravidade da doença</b>	68
<b>5.14. Análise Filogenética dos grupos estudados</b>	68
<b>6. DISCUSSÃO</b>	71
<b>6.1. Gravidade x Viremia</b>	72
<b>6.2. Resposta Imune x Viremia</b>	73

<b>6.3. Idade x Viremia</b>	75
<b>6.4. Sexo x Viremia</b>	76
<b>6.5. Dias de doença x Viremia</b>	77
<b>6.6. NS1 x Apresentação Clínica</b>	77
<b>7. CONCLUSÕES</b>	79
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	80
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	81

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica a proteína E, de acordo com Rico-Hesse (2003).	4
<b>Tabela 1.2:</b> Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver & Vasilakis (2009).	5
<b>Tabela 4.1:</b> Amostras (n=102) analisadas no período de 1990-2011.	33
<b>Tabela 4.2:</b> Critérios utilizados para a seleção e exclusão das amostras, utilizadas neste estudo.	34
<b>Tabela 4.3:</b> Reagentes para preparo do meio de cultura L-15.	35
<b>Tabela 4.4:</b> Antibióticos utilizados no meio de cultura.	35
<b>Tabela 4.5:</b> Reagentes A utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks.	36
<b>Tabela 4.6:</b> Reagentes B utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks.	36
<b>Tabela 4.7:</b> Reagentes C utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks.	36
<b>Tabela 4.8:</b> Reagentes utilizados para o preparo do Tampão Salina Fosfato 10X.	38
<b>Tabela 4.9:</b> Reagentes utilizados para o preparo de Glicerol Tamponado.	39
<b>Tabela 4.10:</b> Reagentes utilizados para o preparo de Preto de Naftaleno.	39
<b>Tabela 4.11:</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.	43
<b>Tabela 4.12:</b> Reagentes utilizado na RT-PCR.	44
<b>Tabela 4.13:</b> Parâmetros de ciclagem da RT-PCR.	45

<b>Tabela 4.14:</b> Parâmetros de ciclagem da Semi-nested PCR.	45
<b>Tabela 4.15:</b> Diluição dos desoxinucleotídeos em 10mM.	46
<b>Tabela 4.16:</b> Reagentes utilizados para o preparo do Gel de agarose.	46
<b>Tabela 4.17:</b> Iniciadores, da região E (Envelope), utilizados para a reação de qRT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) aplicados nos DENV-2.	47
<b>Tabela 4.18:</b> Reagentes utilizados para o tampão de diluição para a Curva Padrão.	48
<b>Tabela 4.19:</b> Reagentes utilizado na qRT-PCR em tempo real.	49
<b>Tabela 4.20:</b> Parâmetros de ciclagem da qRT-PCR em tempo real.	50
<b>Tabela 4.21:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos genes C/prM/M/E e do genoma completo dos DENV-2.	51
<b>Tabela 4.22:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos fragmentos sobrepostos do gene C/prM/M/E dos DENV-2.	51
<b>Tabela 4.23:</b> Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação do gene E e do genoma completo dos DENV-2.	52
<b>Tabela 4.24:</b> Reagentes utilizados reação em cadeia pela polimerase (PCR) para sequenciamento do genes C/prM/M/E e do genoma completo dos DENV-2.	54
<b>Tabela 5.1:</b> Definição dos casos graves de DENV-2 de acordo com seus sinais e sintomas.	57
<b>Tabela 5.2:</b> Definição dos casos de DENV-2 de acordo com seus sinais e sintomas.	57
<b>Tabela 5.3:</b> Resultados das amostras dos casos segundo a classificação clínica e o diagnóstico laboratorial.	59
<b>Tabela 5.4:</b> Amostras positivas para DENV-2 de acordo com o teste diagnóstico e sua correlação com o número de dia de início de sintomas.	59
<b>Tabela 5.5:</b> Teste de especificidade do protocolo do qRT-PCR em tempo real para a detecção de DENV-2.	60

<b>Tabela 5.6:</b> Relação do dia de doença com a classificação final do caso segundo evolução clínica.	62
<b>Tabela 5.7:</b> Relação da variável idade com a carga viral.	63
<b>Tabela 5.8:</b> Análise das variáveis pertencentes aos casos da linhagem I.	66
<b>Tabela 5.9:</b> Análise das variáveis pertencentes aos casos da linhagem II.	67
<b>Tabela 5.10:</b> Análise de variância aplicada aos casos graves da linhagem II.	67
<b>Tabela 5.11:</b> Análise da relação da DO com a Apresentação Clínica.	68
<b>Tabela 5.12:</b> Análise da relação da DO com a Linhagem.	68
<b>Tabela 5.13:</b> Casos utilizados para o seqüenciamento na confirmação das linhagens.	69



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Micrografia eletrônica e 3D da partícula viral dos DENVs.	2
<b>Figura 1.2:</b> (A) Diagrama esquemático do genoma e da (B) poliproteína dos DENV.	3
<b>Figura 1.3:</b> Esquema da Replicação viral.	8
<b>Figura 1.4:</b> Período de infecção extrínseco e intrínseco dos DENV.	10
<b>Figura 1.5:</b> Ciclos de transmissão dos DENV.	10
<b>Figura 1.6:</b> Média anual de países que notificaram casos de dengue no mundo, de 1955-2007.	11
<b>Figura 1.7:</b> País ou Áreas de Risco de infecção por DENV.	12
<b>Figura 1.8:</b> Distribuição dos <i>Ae. aegypti</i> nas Américas: 1930, 1970 e 2001.	13
<b>Figura 1.9:</b> Casos confirmados de dengue nas Américas até a 50 <sup>o</sup> semana epidemiológica de 2011.	14
<b>Figura 1.10:</b> Casos notificados de dengue no Brasil de 1981 até a *39 <sup>o</sup> semana epidemiológica de 2011.	15
<b>Figura 1.11:</b> Casos notificados de dengue na Região Sudeste, 1990-2011.	16
<b>Figura 1.12:</b> Casos confirmados de dengue no Brasil até a 39 <sup>o</sup> semana epidemiológica de 2011.	17
<b>Figura 1.13:</b> Classificação dos casos de dengue de acordo com a OMS, 2009.	19
<b>Figura 1.14:</b> Detecção da infecção por DENVs durante as respostas primárias e secundárias.	22
<b>Figura 1.15:</b> Curva de Amplificação da qRT-PCR em tempo real.	27
<b>Figura 4.1:</b> Critérios para interpretação do tipo de resposta imune de acordo com os títulos de IgG e dias de doença após o início dos sintomas.	40
<b>Figura 5.1:</b> Curva padrão da RT-PCR em tempo real utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 0,1 a 10 <sup>05</sup> .	61
<b>Figura 5.2:</b> Perfil de amplificação da curva padrão analisando a relação de concentração de RNA padrão com o Ct.	61
<b>Figura 5.3:</b> Relação do dia de doença com a carga viral.	62
<b>Figura 5.4:</b> Relação da variável sexo com a carga viral.	64
<b>Figura 5.5:</b> Resposta imune em casos confirmados de DENV-2 relacionado com	64

a carga viral.

**Figura 5.6:** Classificação dos casos estudados relacionado com a carga viral. 65

**Figura 5.7:** Linhagens dos casos estudados relacionado com a carga viral. 66

**Figura 5.9:** Árvore Filogenética dos grupos estudados. 70

## SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
acs	Anticorpos
<i>Ae aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
C	Proteína estrutural do capsídeo ou core viral
cm	Centímetros
d.C.	Depois de Cristo
DC	Dengue Clássico
DCC	Dengue com complicações
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DH	Dengue Hemorrágico
DO	Densidade Ótica
DSCA	Dengue com sinais de alerta
DSSA	Dengue sem sinais de alerta
E	Proteína Estrutural do Envelope
ECP	Efeito Citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
F	Teste F
FHD	Febre hemorrágica da dengue
g	Gramas
GL	Graus de Liberdade
HI	Inibição da Hemaglutinação
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

kDa	Kilodaltons
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos da classe IgM
NC	Não codificante
NO	Óxido nítrico
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fita de leitura aberta
PAHO	Organização Pan-americana de Saúde
pb	Pares de bases
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Ae. aegypti</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PNCD	Programa Nacional de Controle de Dengue
PrM/M	Proteínas estruturais Pré-membrana/Membrana
QM	Quadrado Médio
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase quantitativo (ou em tempo real)
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome de choque por dengue
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SQ	Soma dos Quadrados
SSRNA	Única fita de RNA
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UV	Ultra-Violeta

## RESUMO:

Desde a introdução do dengue sorotipo 2 (DENV-2) em 1990, o estado do Rio de Janeiro registrou mais duas epidemias associadas a este sorotipo em 1998 e 2008 respectivamente. A epidemia de 2008 foi considerada a de maior magnitude não apenas em número de casos notificados, como também em número de casos graves e fatais. Durante essa epidemia, o número de casos reportados em todo o país foi de 806.036, ultrapassando em número de casos da epidemia de dengue 3 (DENV-3), até então considerada a maior já registrada no país. A análise filogenética das cepas de DENV-2 isoladas no Rio de Janeiro durante as epidemias de 1990, 1998 e 2008, demonstrou que apesar de pertencerem ao mesmo genótipo (Americano/Asiático), os vírus isolados em 2008 são geneticamente distintos e, agrupados em uma linhagem distinta classificada como linhagem II, dos vírus de 1990 e 1998 pertencentes à linhagem I. Considerando-se que a epidemia de 2008 foi a mais grave já descrita no Brasil em número de casos e óbitos, o objetivo principal desse estudo é investigar se esta nova linhagem pode ter contribuído para este perfil patogênico. Para tal, utilizando o PCR em tempo real quantificamos a viremia produzida pelas duas linhagens a partir de amostras de soros agudos de 102 casos de DENV-2, confirmados por Isolamento viral e/ou RT-PCR e, selecionados de acordo com o período de circulação de cada linhagem. A quantificação do RNA viral foi realizada de acordo com o protocolo descrito Poersch, 2005. A carga viral obtida nas amostras correspondentes às duas linhagens foi correlacionada com a gravidade da doença utilizando-se como critério a classificação clínica de casos de dengue segundo a OMS, com a idade, sexo, dias de doença e tipo de infecção (primária ou secundária). Os títulos da carga viral da linhagem II foram mais elevados do que os da linhagem I ( $p=0,001$ ). A viremia foi mais elevada nas amostras da linhagem II, com significância quando correlacionada com a forma grave da doença ( $p=0,001$ ). Este estudo demonstrou que o vírus é um fator importante na complexa dinâmica da gravidade da doença. O fato de não encontramos associação entre tipo de infecção, idade, sexo e dias de doença com gravidade e carga viral durante o período em que circulou apenas a linhagem I, confirma a nossa hipótese de que a linhagem II era mais virulenta e foi um fator importante para a gravidade dos casos ocorridos na epidemia de 2008.

Palavras Chave: Dengue tipo 2; Viremia; Re-emergência de DENV-2; Nova Linhagem

## **ABSTRACT:**

Since the introduction of dengue serotype 2 (DENV-2) in 1990, two additional epidemics associated with this serotype occurred in 1998 and 2008 respectively. The epidemic of 2008 was considered to be of greater magnitude not only in number of reported cases, but also in number of severe and fatal cases. During this epidemic, the number of reported cases in country was 806,036, exceeding the number of DENV-3 cases reported in the 2002 epidemic, hitherto considered the largest ever recorded in the country. Phylogenetic analysis of DENV-2 strains isolated during the epidemics of 1990, 1998 and 2008 in the state of Rio de Janeiro, showed that despite belonging to the same genotype (American / Asian), the viruses isolated in 2008 are genetically distinct and grouped into a distinct lineage of viruses from 1990 and 1998. Considering that the epidemic of 2008 was the most severe reported in Brazil in number of cases and deaths, the main objective of this study was to investigate whether this new strain may have contributed to this severity observed in cases occurred during the 2008 epidemic. To this end, using real time PCR the viral load produced by the two lineages was quantified in sera of 102 DENV-2 cases previously confirmed by virus isolation and/or RT-PCR selected according the period of lineages circulation. The viral RNA quantification was performed according to the protocol described by Poersch (2005). The viral load obtained in samples corresponding to the two lineages was correlated with disease severity following WHO clinical classification criteria, with age, gender, immunological status (primary and secondary dengue infection) and day of illness. The viral load observed in lineage II were higher than those from lineage I ( $p = 0.001$ ). Higher viraemia was observed in severe cases from lineage II when those were compared to those cases from lineage I ( $p = 0.001$ ). This study demonstrated that the virus is an important factor in the complex dynamic of the disease severity and the fact that we found no association between type of infection, age, gender and day of disease severity suggests that the lineage II was more virulent and was an important factor in the severity of cases occurred in 2008 epidemic.

Keywords: Dengue type 2 viraemia; Re-emergence of DENV-2, New Lineage

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. HISTÓRICO

Os primeiros relatos de uma doença clinicamente compatível com a dengue foram descritos na Enciclopédia Médica Chinesa entre 265-420 d.C., na Dinastia Chin. A doença descrita como “Veneno da Água”, era associada com o vôo de insetos sob a água. (Gubler, 1997; Guzman *et al.*, 2010). Cerca de 2000 anos depois, os primeiros surtos desta mesma enfermidade 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), portanto, é provável que a dengue já apresentasse uma ampla distribuição geográfica antes do século XVIII, quando grandes epidemias ocorreram por todo o mundo.

A dengue foi considerada por muito tempo uma doença benigna, com grandes epidemias que aconteciam em intervalos de 10 a 40 anos (Mscherry, 1982; Gubler e Clark, 1995; Guzman *et al.*, 2010), mas o termo dengue foi introduzido na Literatura Inglesa entre 1827- 1828, pela Rainha da Espanha, durante uma epidemia caracterizada por exantema e artralgia. A palavra dengue vem da expressão “Ki-Dinga pepo” que significa uma cainbra repentina causada por um espírito mau. Antes vários nomes foram dados tais como “Knokkelkoorts” em Jarcata (1779), em 1789, Benjamin Rush relatou o primeiro caso definitivo da doença que denominou como "febre quebra-ossos", posteriormente foi utilizado o termo dunga numa epidemia em Cuba, 1827, que logo foi substituído por dengue (Gubler, 1997; Halstead, 1980).

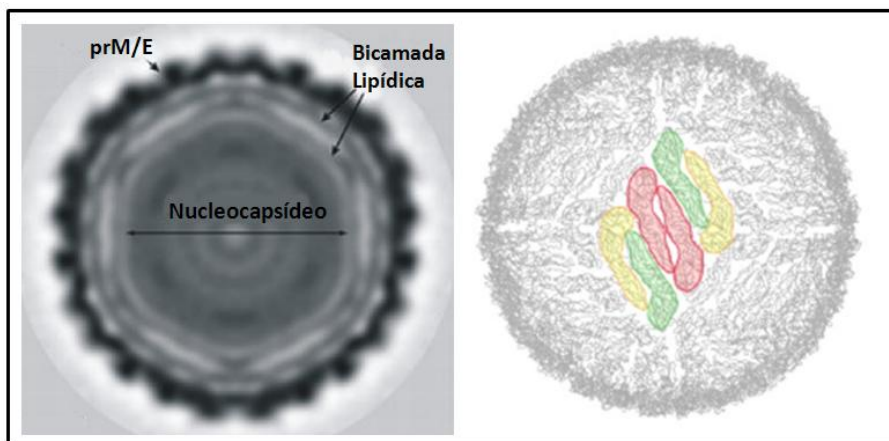
## 1.2. VÍRUS DENGUE

### 1.2.1. Classificação, Morfologia e Propriedades Físico-Químicas

Os vírus dengue (DENVs) são arbovírus, “vírus transmitido por artrópodes”, pertencentes à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, e são representados por quatro sorotipos antigênicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Calisher, 1989). 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.

O gênero *Flavivirus* possui mais de 70 vírus divididos em oito grupos sorologicamente relacionados, destes, 40 são patogênicos ao homem (Bollati *et al.*,2010). Sendo os DENVs responsáveis pelas maiores taxas de doença e mortalidade dentre todos os membros desse gênero (Mukhopadhyay *et al.*,2005).

Os DENVs são esféricos, envelopados e possuem aproximadamente 50 nm em diâmetro. Virions maduros contêm 3 proteínas estruturais: Proteína do Capsídeo ou Core (C), membrana (M) e envelope (E). A proteína C possui 11kDa (Kilodaltons) com 100 aminoácidos, que encapsula o RNA, que apresenta uma única fita com polaridade positiva (ssRNA), formando o nucleocapsídeo. Este nucleocapsídeo, que tem simetria icosaédrica, é envolto por lípideos derivados da célula hospedeira, no qual estão ancorados as proteínas de membrana (M) e do envelope (E). A proteína M, cerca de 8kDa com 75 aminoácidos, é um fragmento obtido da proteólise da proteína pré membrana (prM). Já a proteína E, além de ser a mais abundante com 53kDa e 595 aminoácidos, possui 3 domínios estruturais, que são responsáveis pela neutralização, fusão e interação com receptores da célula hospedeira (Ligon, 2005; Rodenhuis-Zybert *et al.*,2010). A proteína E tem um importante papel na virulência viral (Wengler, Nowak e Wann, 1987) e é o alvo dominante das respostas humorais contra o DENV (Clyde *et al.*,2006) (Figura 1.1).



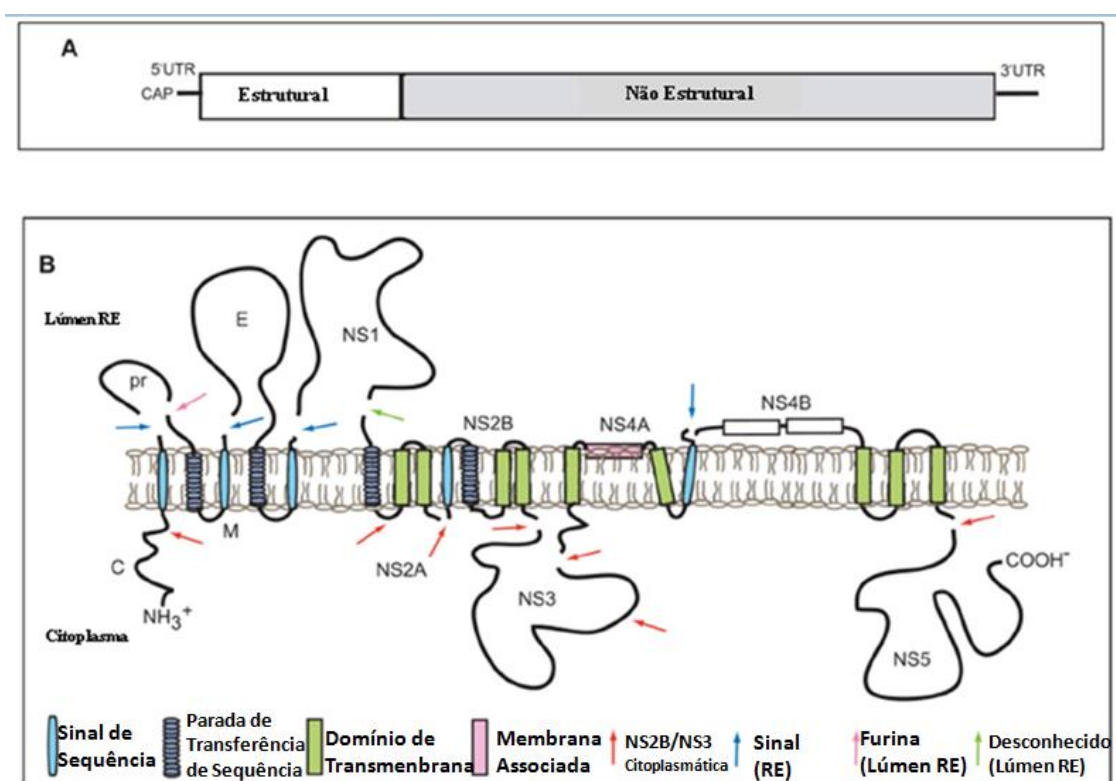
**Figura 1.1:** Micrografia eletrônica e 3D da partícula viral dos DENVs (adaptado de Yu *et al.*, 2009).

Os Flavivírus possuem densidade de flutuação de 1,22-1,24 g/cm em Cloreto de Césio e 1,18-1,20 g/cm em Sacarose. Os DENVs possuem 175-218S de coeficiente de sedimentação em Sacarose. Os vírus são inativados a 50°C com infectividade decrescendo 50% a cada 10 minutos. São sensíveis à inativação por raios ultravioletas, detergentes iônicos e não iônicos e digestão por tripsina. A infectividade dos DENV é mais estável em pH 7 a 9 e mantendo-se por 5 anos a -70°C ou liofilizado conservado a 4°C (Brinton, 1986)



## 1.2.2. Estrutura do Genoma

O genoma dos DENVs consiste numa única fita de leitura aberta (ORF) de RNA, com uma extensão de 11.000 nucleotídeos de polaridade positivo, com “cap”. Este RNA é flanqueado por 2 regiões não codificantes (NCs) de 96 e ~450 nucleotídeos, respectivamente NC 5' e NC 3'. A tradução da ORF, produz uma poliproteína que é clivada por peptidases celulares, furinas, e proteases viral, serina, durante e após a tradução, produzindo 10 proteínas virais, destas, 3 são estruturais: Capsídeo (C), Membrana (prM, processada em M) e Envelope (E); e 7 não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5) (Bollati 2010, Vaselaski *et al.*,2011), ilustrado na figura 1.2.



**Figura 1.2:** (A) Diagrama esquemático do genoma e da (B) poliproteína dos DENV (adaptado de Perera & Kuhn, 2008).

Entre as proteínas não estruturais, NS1 é dimérica, que existe sob as formas intracelular e extracelular. A função da NS1 na infecção pelo DENV ainda não é totalmente conhecida. A detecção de anticorpos anti-NS1 é muito utilizada como ferramenta para o diagnóstico precoce da doença (Lima *et al.*,2010, Weaver e Vasilakis, 2009).

A NS2A, é uma proteína de 22kDa envolvidos no empacotamento e replicação do RNA (Khromykh *et al.*, 2001) e, possivelmente, antagonista de interferon (Jones *et al.*,2005). NS2b,

é uma proteína de membrana associada a proteína NS3, formando um complexo que serve como um co-fator na ativação estrutural do DENV (Erbel *et al.*,2006, Leung *et al.*,2001).

A NS3, é uma proteína de 70 kDa multifuncional como tripsina, helicase e enzima RNA trifosfatase e está envolvida no processamento da poliproteína viral, bem como na replicação do RNA (Gorbalenya *et al.*,1989, Li *et al.*,1999).

NS4A e NS4B, são pequenas proteínas hidrofóbicas de 16 e 27 kDa, respectivamente, esta última funciona como um inibidor de sinalização de interferon (Jones *et al.*,2005, Munoz-Jordan *et al.*,2003) . Evidências recentes demonstraram a associação da NS4B com DENV silvestres, o que sugere um possível papel na distinção dos genótipos endêmicos de DENV silvestre (Vasilakis *et al.*,2007).

A NS5 é altamente conservada entre os *Flavivirus*, é uma proteína multifuncional com atividades de metiltransferase e de RNA polimerase dependente de RNA (Lindenbach e Rice, 1999).

### 1.2.3. Diversidade Genética

Os DENV apresentam alta variabilidade genética devido à falta do mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, as rápidas taxas de replicação, ao grande tamanho populacional e pressão frente à reposta imunológica do hospedeiro (Homes e Twiddy *et al.*,2003).

Baseado nessas diferenças genéticas, inicialmente detectadas por fingerprinting e agora pela técnica de sequenciamento do genoma viral, os sorotipos dos DENV são agrupados em diferentes genótipos, que são caracterizados por regiões onde foram encontrados (Trent *et al.*, 1983; Rico-Hesse 1990; Deubel, 1992; Lanciotti *et al.*, 1994; Lanciotti *et al.*, 1997)

Até 2009 era utilizada a classificação dada por Rico-Hesse (2003), realizada através do sequenciamento da região do gene E dos DENVs, que considerou cinco genótipos para DENV-1, quatro para DENV-2 e DENV-3 e três genótipos para DENV-4. (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1:** Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica a proteína E, de acordo com Rico-Hesse (2003).

<i>Sorotipo</i>	<b>Genótipos</b>
<b>DENV-1</b>	Ásia Tailândia Pacífico Sul Américas/África Malásia

<b>DENV-2</b>	Malásia/Subcontinente Indiano Sudeste Asiático Américas Oeste Africano
<b>DENV-3</b>	Sudeste Asiático/Pacífico Sul Tailândia Subcontinente Indiano Américas
<b>DENV-4</b>	Indonésia Sudeste Asiático Malásia

Atualmente uma revisão de Weaver e Vasilakis (2009) descreve cinco genótipos para DENV-1, seis para DENV-2, cinco para DENV-3 e quatro genótipos para DENV-4 (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2:** Classificação genotípica dos DENV baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver e Vasilakis (2009).

<i>Sorotipo</i>	<i>Genótipos</i>	<b>Distribuição geográfica</b>
<b>DENV-1</b>	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, Oeste da África Africano, Ásia
<b>DENV-2</b>	Asiático I	Malásia e Tailândia
	Asiático II	Vietnã, da China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950-1960),
	Sudeste Asiático/Americano Selvagem	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos) Oeste Africano e Sudeste Asiático
<b>DENV-3</b>	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul da Ilhas do Pacífico
	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)
<b>DENV-4</b>	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

Ainda, não há um consenso na utilização das diferentes classificações descritas para os genótipos de DENV. A utilização da análise filogenética com base parcial e/ou seqüências genômicas completas tem elucidado as origens, epidemiologia (diversidade genética, dinâmica de transmissão e potencial de epidemia), e as forças que moldam a evolução

molecular de DENV (as taxas de evolução, as pressões de seleção, tamanho da população, recombinação e limitações evolutivas) na natureza (Weaver e Vasilakis, 2009).

Análises de sequências do gene E de isolados brasileiros de DENV-1, de amostras obtidas durante 2009/2010, demonstrou que estas ainda pertencem ao genótipo V, mas agrupam em clades distintas (linhagem II), isolados anteriores de 2000/2001 agrupam na linhagem I, já isolados de 2011 se agrupam em clades distintas das anteriores (linhagem II) (Dos Santos *et al.*, 2011).

Recentemente, a análise filogenética das cepas de DENV-2 isoladas, no Rio de Janeiro, na epidemia de 2008 demonstrou que, apesar destes vírus ainda pertencerem ao mesmo genótipo, porém de linhagens distintas, estas se agruparam formando um grupo monofilético distinto (Oliveira *et al.*, 2010). Esta re-emergência causou a mais grave epidemia de dengue registrada no país até então, com um maior número de hospitalizações e ocorrência de óbitos em crianças e adultos (SVS, 2009).

Inicialmente os DENV-3 foram agrupados em cinco genótipos baseados na técnica de “fingerprinting” (Trent *et al.*, 1990), mas análises subsequentes baseadas nas sequências dos genes prM/M/E (Lanciotti *et al.*, 1994) e pelo sequenciamento completo do gene E (Rico-Hesse 2003) e do genoma viral completo (Chao *et al.*, 2005) caracterizaram quatro genótipos distintos para este sorotipo. Atualmente, o DENV-3 está classificado em cinco genótipos (Araújo *et al.*, 2009a; Weaver e Vasilakis 2009).

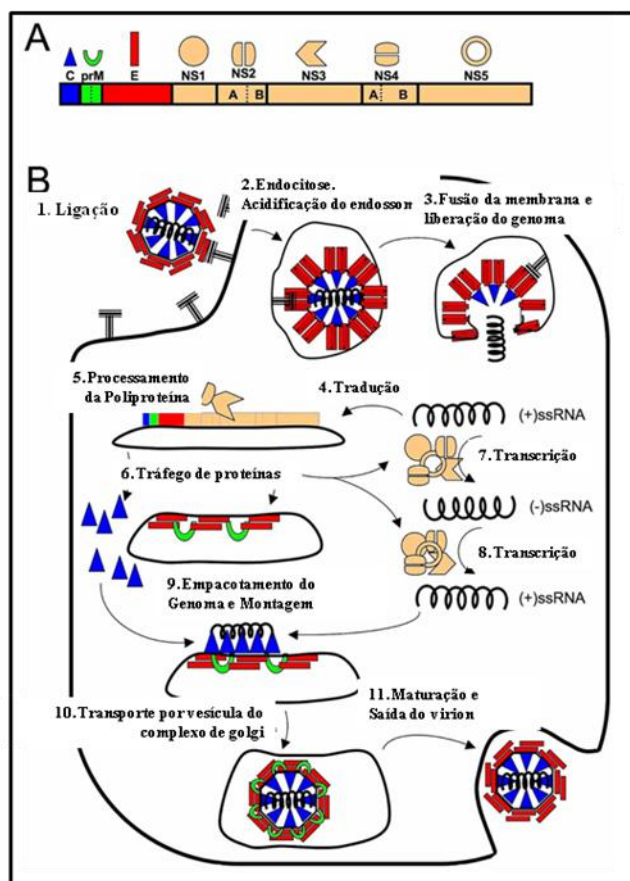
Para os DENV-4, foram caracterizados quatro genótipos distintos baseados na análise da sequência do gene E (Lanciotti *et al.*, 1997, AbuBakar *et al.*, 2002, Foster *et al.*, 2003) ou no sequenciamento completo do genoma viral (Klungthong *et al.*, 2004): (a) Genótipo I representados por cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka, casos importados do Japão, China e mais recentemente as cepas isoladas no Brasil; (b) Genótipo II representado pelas cepas do Sudeste da Ásia, China, Ilhas do Pacífico, Austrália, Caribe e Américas; (c) Genótipo III, representados por cepas recentes da Tailândia que eram diferentes das demais (Klungthong *et al.*, 2004) e (d) Genótipo IV, representado pelas cepas selvagens da Malásia (Weaver e Vasilakis 2009).

#### 1.2.4. Replicação

Após o repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus após 8-12 dias de incubação extrínseca (Gubler et al., 1997). Com a inoculação do vírus na intradérme ocorre a replicação do mesmo. As primeiras células a serem infectadas são as células de Langerhans, células dendríticas presentes na pele (Wu et al., 2000).

Existem estudos apontando as seguintes células alvos dos DENVs: Monócitos, Linfócitos B de sangue periférico, Macrófagos do baço, bem como fígado, pulmão, cérebro, rim, medula óssea e coração (Clyde et al., 2006; Jessie et al., 2004; Araújo et al., 2009b).

O processo de interação vírus célula tem início com a ligação da proteína E dos DENVs a receptores de superfície celulares. Já foram propostos diferentes receptores como sulfato de Heparan (Chen et al., 2005; Germi et al., 2002; Hilgard e Stockert 2000; Lin et al., 2002), Hsp70 e Hsp90 (Valle et al., 2005), GRP78/BiP (Jindadamrongwech, Thepparit e Smith., 2004), CD14 (Chen et al., 1999), ICAM-3 (Lozach et al., 2005) e o melhor caracterizado é o receptor DC-SIGN (Cyde et al., 2006). Após a ligação a proteína E no receptor celular, o vírus penetra na célula via fusão dependente de pH, onde ocorre a acidificação do meio, com pH em torno de 6,0 à 6,2, expondo o domínio III, associado a fusão do envelope com a vesícula endocítica, levando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. O genoma viral serve como RNA mensageiro, sendo traduzido por ribossomos celulares, gerando uma poliproteína, onde o processamento desta é realizada por proteases da célula hospedeira, que residem no lúmen do RE, e pela proteína NS3 viral com seu co-factor NS2B, que residem no citoplasma, levando a produção de três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (Tomlinson, Malmstrom e Watowich, 2009; Perera e Kuhn, 2008; Clyde et al., 2006;) (Figura 1.3.).



**Figura 1.3:** Esquema da Replicação viral. (A) Diagrama da poliproteínas, com representação das proteínas estruturais e não estruturais. (B) Visão geral do ciclo de replicação do DENV, com destaque para proteínas, que regulam cada fase da replicação (adaptado de Tomlinson, Malmstrom e Watowich, 2009).

A NS5, juntamente com outras proteínas virais e celulares associadas às membranas perinucleares, catalisa a replicação do RNA. Um RNA de polaridade negativa é produzido para servir como molde na síntese de RNAs genômico, de polaridade positiva. Os RNAs genômicos são envolvidos pelas proteínas estruturais como parte do processo de montagem das partículas, no retículo endoplasmático (Clyde *et al.*, 2006; Tomlinson, Malmstrom e Watowich, 2009)

O RNA recém-sintetizado é empacotado pela proteína C para formar uma nucleocápside. Neste mesmo momento as proteínas prM e E formam heterodímeros e são orientadas para dentro do lúmen do retículo endoplasmático, estes induzem brotamento viral. Partículas imaturas formadas viajam através de rede trans-Golgi, com pH ligeiramente ácido (5,8-6,0), provocando a dissociação da prM/E heterodímeros, esta reorganização estrutural das glicoproteínas permite que a protease celular, furina, clive a prM. A furina cliva uma Arg-X-(Lys/Arg)-Arg, sequência de reconhecimento que conduz à geração da proteína M e maturação do virion (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Perera e Kuhn, 2008). A maturação dos vírions ocorre em membranas intracelulares no aparelho de Golgi, onde as partículas virais

maduras são liberadas da célula pelo processo de exocitose (Clyde *et al.*, 2006; Tomlinson, Malmstrom e Watowich, 2009).

### **1.2.5. Transmissão**

Após a descoberta da transmissão da febre amarela por mosquitos, Graham em 1903, foi o primeiro a publicar que a transmissão dos vírus dengue (DENVs) se dava através de mosquitos. Baseado nesta hipótese, Bancroft em 1906, após colocar mosquitos *Aedes aegypti* (*Ae aegypti*), alimentados com sangue de pacientes com dengue, em contato com voluntários saudáveis, por um período de incubação de 10 dias, pode concluir que a transmissão do dengue era pelo mosquito *Ae aegypti*, (Gubler, 1997).

O primeiro experimento que demonstrou a presença de um vírus infectante na circulação sanguínea foi em 1907, onde Ashburn e Craid após descartarem a hipótese de uma infecção por bactérias e/ou protozoários, observaram que a doença era causada por um organismo filtrável e de tamanho ultramicroscópico (Ashburn e Craid 1907 apud Gubler 2004). O primeiro vírus dengue foi isolado em 1943 durante a Segunda Guerra Mundial, por Hotta e Kimura, inoculando soro de soldados japoneses com suspeita de dengue em camundongos lactentes. Posteriormente esse vírus foi identificado como sorotipo 1 (cepa Mochizuki). Em 1944, Sabin e colaboradores isolaram DENV-1 e DENV-2, de soldados americanos, na Índia, Nova Guiné e Havaí. Os vírus isolados do Havaí foram chamados de DENV-1 (protótipo Haw-DEN-1), os isolados de Nova Guiné por serem antigenicamente distintos foram classificados como DENV-2 (protótipo NG C-DEN-2) (Gubler, 1997)

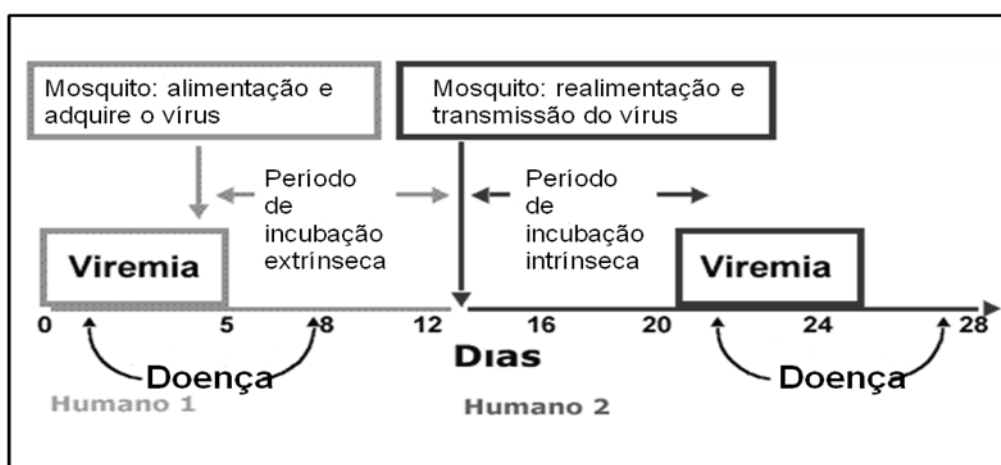
A Segunda Guerra Mundial causou mudanças ecológicas e demográficas significativas que facilitaram a transmissão e disseminação da dengue na região da Ásia-Pacífico, incluindo alta mobilidade de civis e soldados e aumento do número de indivíduos suscetíveis em áreas endêmicas. Os sorotipos 3 (cepa H87) e 4 (cepa H241) foram isolados por Hammon e colaboradores em 1956, durante epidemia nas Filipinas. (Gubler, 1997; Guzman *et al.*, 2010).

### **1.3. VETOR**

O *Ae aegypti* é uma espécie oriunda do continente africano, e está distribuído em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Provavelmente foi introduzido no Novo Mundo através do tráfico de escravos. É uma espécie doméstica, que se reproduz, preferencialmente, em água estagnada e limpa, acumulada em recipientes geralmente fabricados pelo homem, como

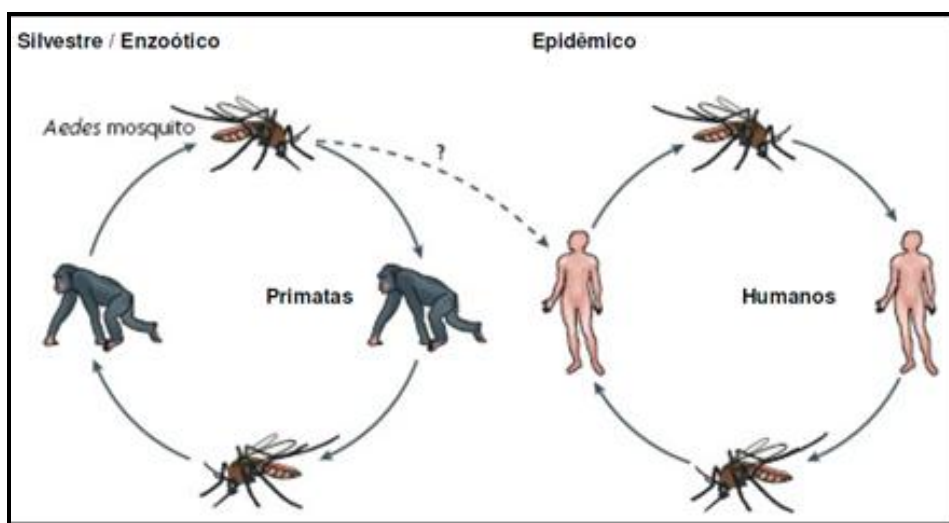
pneus, vasos de plantas, latas, cisternas, entre outros (Rigau-Perez *et al.*, 1998). As fêmeas desse mosquito são as responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode infectar várias pessoas (Gubler, 1997).

O mosquito se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia (cerca de 5 dias) e pode transmitir a doença para um indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias, figura 1.4. Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus pelo resto de sua vida (em média 45 dias). As fêmeas infectadas também podem passar os vírus à próxima geração de mosquitos por meio da transmissão transovariana, mas isso ocorre com pouca frequência e provavelmente não contribui significativamente com a transmissão humana (Rigau-Perez *et al.*, 1998).



**Figura 1.4:** Período de infecção extrínseca e intrínseca dos DENV (adaptado de CDC, 2002).

O homem é principal hospedeiro multiplicador do vírus, apesar de alguns estudos demonstrarem que os macacos de algumas partes do mundo podem ser infectados e talvez sirvam de fonte de vírus para os mosquitos (Whitehead, 2007), (Figura 1.5).



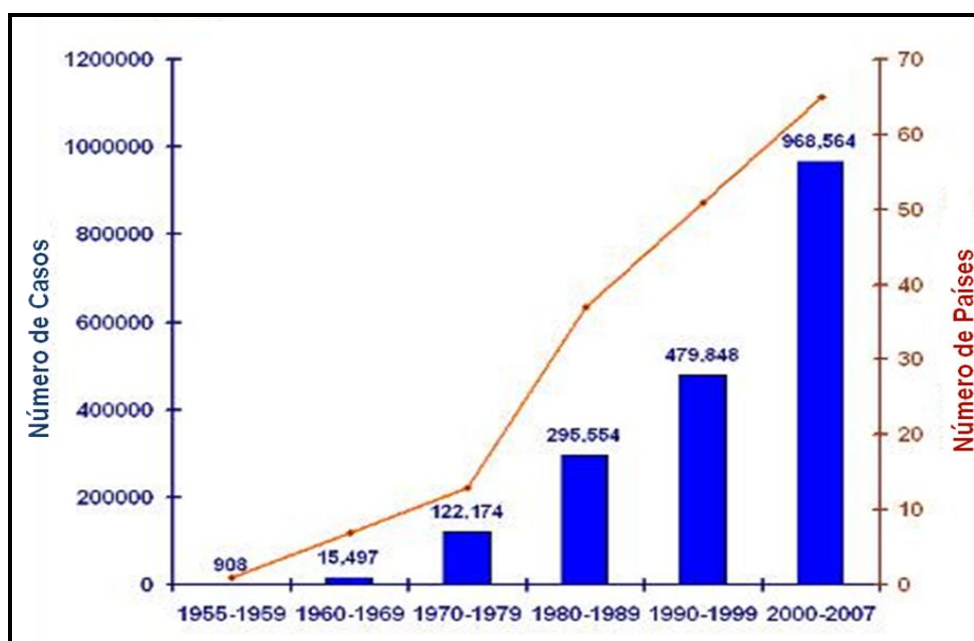
**Figura 1.5:** Ciclos de transmissão dos DENV (adaptado de Whitehead, 2007).



O *Ae. aegypti* foi declarado erradicado no território brasileiro por duas vezes. A primeira, em 1958, voltando em menos de uma década, em 1967, no Pará, e em outros 23 municípios do Estado. Dois anos depois foi detectada a presença do *Ae. aegypti* no Maranhão. Em 1973, com a eliminação do último foco de *Ae. aegypti* no Pará, o vetor foi considerado erradicado do Brasil pela segunda vez. A reintrodução foi registrada em 1976 na Bahia (FUNASA, 2001). Em 1977, foi encontrado no Rio de Janeiro e Santos; em 1979, em Natal, e em 1981, no Paraná. Durante esses anos, as medidas de controle eram esporádicas e isoladas (Rebêlo *et al*, 1999). O rápido crescimento e urbanização das populações nas áreas tropicais, sem infraestrutura básica de saneamento, ampliaram a faixa de ocorrência do dengue, em razão da difusão do *Ae. Aegypti* em áreas antes livres da doença (Rebêlo *et al.*, 1999).

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA

A dengue é hoje uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo em termos de morbidade e mortalidade. A doença é endêmica em mais de 60 países e estima-se que o vírus dengue (DENV) causa anualmente de 50-100 milhões de casos de doença febril aguda, figura 1.5 (Halstead, 2007; OMS, 2002).

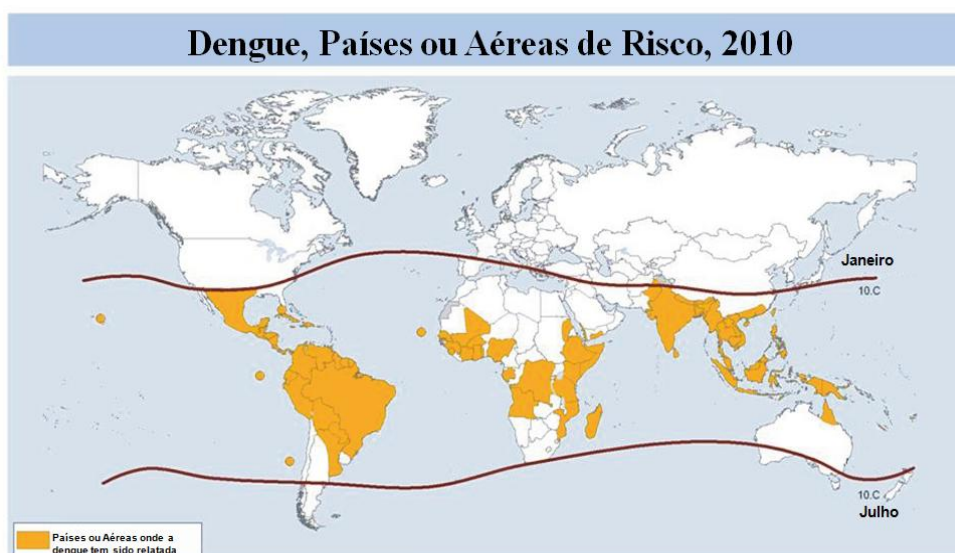


**Figura 1.6:** Média anual de países que notificaram casos de dengue no mundo, de 1955-2007 (adaptado de OMS, 2012).

A doença representa um sério problema de saúde pública pela crescente incidência global e distribuição geográfica, estando presente em quase todas as regiões tropicais e

subtropicais do mundo, com uma intensa transição de ciclo de transmissão de epidêmico para endêmico.

Parâmetros ambientais, como temperatura e precipitação, afetam a demografia e o comportamento do seu vetor, o *Ae. aegypti*. Além do clima, o aumento desordenado da população global, as viagens internacionais, pobreza e a falta de programas sustentáveis, em vários níveis, são consideráveis fatores de suma importância para entender a grande disseminação da doença em tão pouco tempo, figura 1.6 (Guzman *et al.*, 2010).



**Figura 1.7:** Países ou Áreas de Risco de infecção por DENV. A linha de contorno de Janeiro e Julho, isotérmicas, indicam áreas em risco, definida pelos limites geográficos dos hemisférios norte e sul, encontrado a presença do *Aedes aegypti*, o vetor principal do vírus da dengue (adaptado de OMS, 2010).

Estima-se que atualmente mais de 3.5 bilhões de pessoas, ou seja, aproximadamente 55% da população mundial, vivem em áreas de risco para dengue (Beaty *et al.*, 2007).

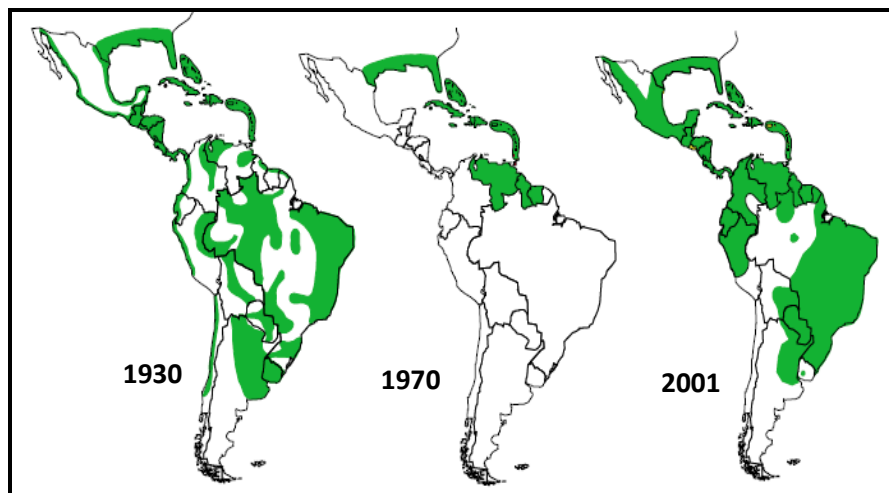
#### 1.4.1. Dengue nas Américas

Desde 1896 que existem registros de epidemias de dengue no continente americano, ocorrendo em intervalos irregulares nos Estados Unidos (EUA) e em países do Caribe, mas o sorotipo não era conhecido.

Em 1953, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-2 em Trinidad e em 1963 em Porto Rico foi isolado pela primeira vez o DENV-3, nas Américas (Gubler *et al.*, 1997).

Durante as décadas de 60 e 70, epidemias de dengue eram raras devido à erradicação do *Ae. aegypti*. Com a descontinuidade do programa de erradicação no início dos anos 70, re-

infestação e disseminação do vetor foi inevitável, conforme mostra a figura 1.7 (Gubler *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1956).



**Figura 1.8:** Distribuição dos *Ae. aegypti* nas Américas: 1930, 1970 e 2001 (adaptado de Gubler, 2002).

O DENV-1 foi introduzido na Jamaica, em 1977, causando uma Pandemia que se expandiu para todas as Ilhas do Caribe, países das Américas Central e Sul, causando epidemias principalmente nas Guianas e Venezuela. No período de 1977 até 1980, foram notificados mais de 702.000 casos da doença, praticamente todos estes causados pelo DENV-1 (PAHO,1989).

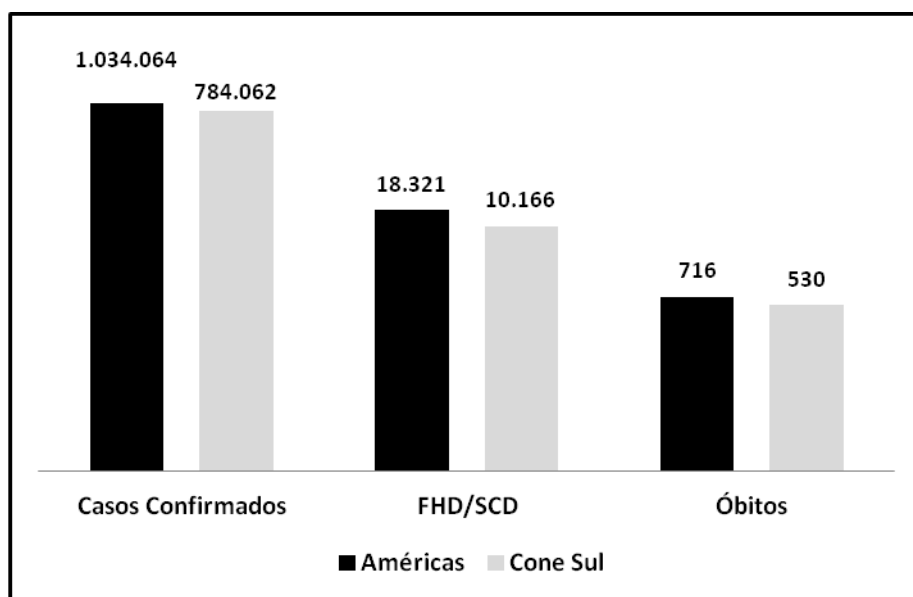
Em 1981, o DENV-4, foi introduzido nas Ilhas do Caribe (Gubler *et al.*, 1997), durante este ano ocorreu a primeira epidemia de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) em Cuba, com a introdução de uma nova variante do DENV-2, posteriormente classificado com o genótipo Asiático. Foram notificados cerca de 344.000 casos com aproximadamente 116.000 internações e 158 óbitos (Kouri *et al.*, 1986; Gubler, 2006), 98-99% foram infecções do tipo secundária (Guzman *et al.*, 2010).

No período de 1989, ocorreu na Venezuela a segunda maior epidemia de FHD/SCD (Síndrome do Choque por Dengue) das Américas, com cerca de 20 mil casos onde co-circularam os DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Malavige *et al.*, 2004).

No ano de 1994, o DENV-3 foi re-introduzido na Nicarágua e Panamá e, em 1995, no México (PAHO,1997). Esta variante de DENV-3 mostrou-se geneticamente distinta daquela que anteriormente circulava nas Américas (genótipo IV) e foi caracterizada como genótipo III (Lanciotti *et al.*, 1994; Anonymus, 1995). Este genótipo foi associado à ocorrência de epidemias de FHD/SCD no Sri Lanka e Índia e casos de FHD no México e países da América

Central (Gubler *et al.*, 1997). Nos anos seguintes, o DENV-3 foi detectado em outros países do continente, chegando à América do Sul (Pinheiro e Corber, 1997; Rigau-Perez *et al.*, 2002).

Até a 50ª semana epidemiológica de 2011, foram registrados 1.034.064 casos de dengue, 18.321 de FHD/SCD e 716 óbitos nas Américas, sendo o Cone Sul responsável pelo maior número de casos (784.062 casos de Dengue, 10.166 casos de FHD/SCD e 530 óbitos), figura 1.9 (PAHO, 2011).



**Figura 1.9:** Casos confirmados de dengue nas Américas até a 50ª semana epidemiológica de 2011 (dados obtidos de PAHO, 2011).

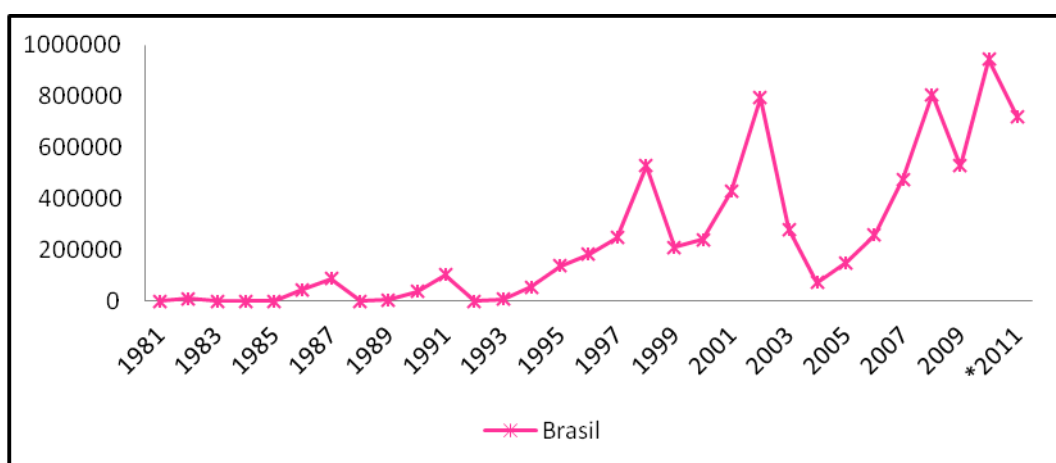
Durante as últimas quatro décadas, o continente Americano evoluiu de uma situação não-endêmica para hiperendêmica, onde se observou um aumento na densidade vetorial, a co-circulação de múltiplos sorotipos de DENV, endemicidade de FHD e em um aumento na frequência da atividade dos DENV (Gubler, 2002).

#### 1.4.2 Dengue no Brasil

Os primeiros relatos de dengue no Brasil datam de 1846, com surtos ocorridos simultaneamente nos estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e em localidades do norte do país (Mariano, 1917). Somente a partir de 1986 que o dengue se tornou um problema de Saúde Pública nacional, com a introdução do DENV-1 no município de Nova Iguaçu, (RJ), (Schatzmayr *et al.*, 1986), alcançando um elevado número de notificações em vários estados

do Brasil (Miagostovich *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 1999; Figueiredo, 2000). Em 1990, um novo sorotipo, o DENV-2 foi isolado na cidade de Niterói (Nogueira *et al.*, 1990). Esta nova situação epidemiológica resultou no agravamento do quadro clínico e a notificação dos primeiros casos de dengue hemorrágico (DH) e SCD do país. Em dezembro de 2000 mais um sorotipo, o DENV-3, foi detectado no município de Nova Iguaçu, sendo responsável até aquele momento pela maior e mais grave epidemia de dengue já descrita no país e no continente americano, não apenas pelo elevado número de notificações (794.200 casos) como pela ocorrência de casos graves e fatais (Araújo *et al.*, 2009c).

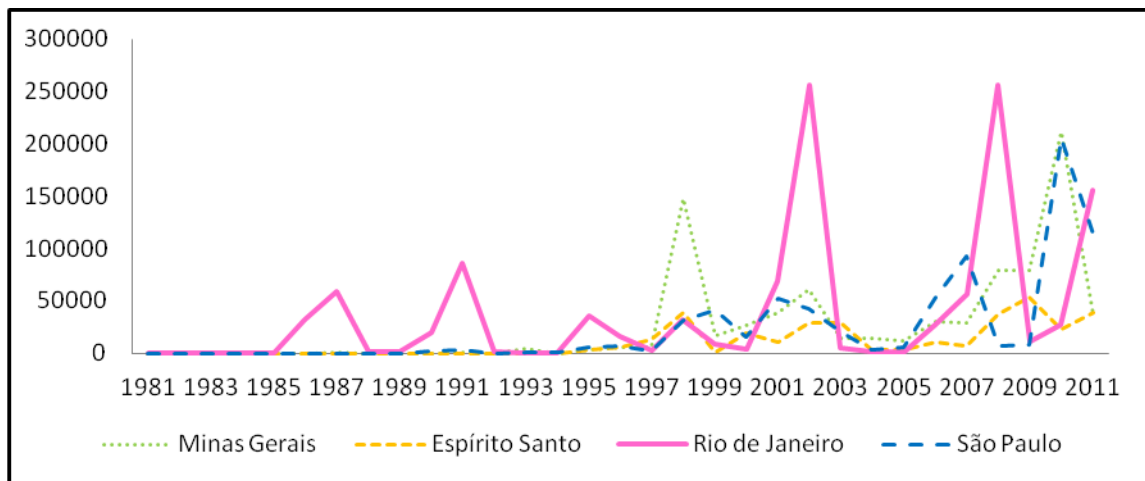
No Brasil cerca de 7.373.378 casos de dengue já foram notificados desde a sua introdução em 1981 (até a \*39° semana epidemiológica de 2011), em Roraima, figura 1.10 (SVS, 2011).



**Figura 1.10:** Casos notificados de dengue no Brasil de 1981 até a \*39° semana epidemiológica de 2011 (dados obtidos de SVS, 2011).

A epidemia de 2008, com 806.036 casos notificados, foi considerada a mais grave epidemia até então, causado pela re-emergência do DENV-2, confirmando 17.961 casos de DCC (Dengue com complicações), 4.195 casos de FHD e 478 óbitos (SVS, 2009).

Particularizando o estado do Rio de Janeiro, grandes epidemias aconteceram nos anos de: 1986-87, 1990-91, 1995-96, 1998, 2002, 2008 com gravidade variável (Figura 1.10). A Região Metropolitana entre as 8 regiões do estado tem sido a que tem apresentado um quadro mais preocupante pela co-circulação de vários sorotipos desde 1990 (SES, 2008).

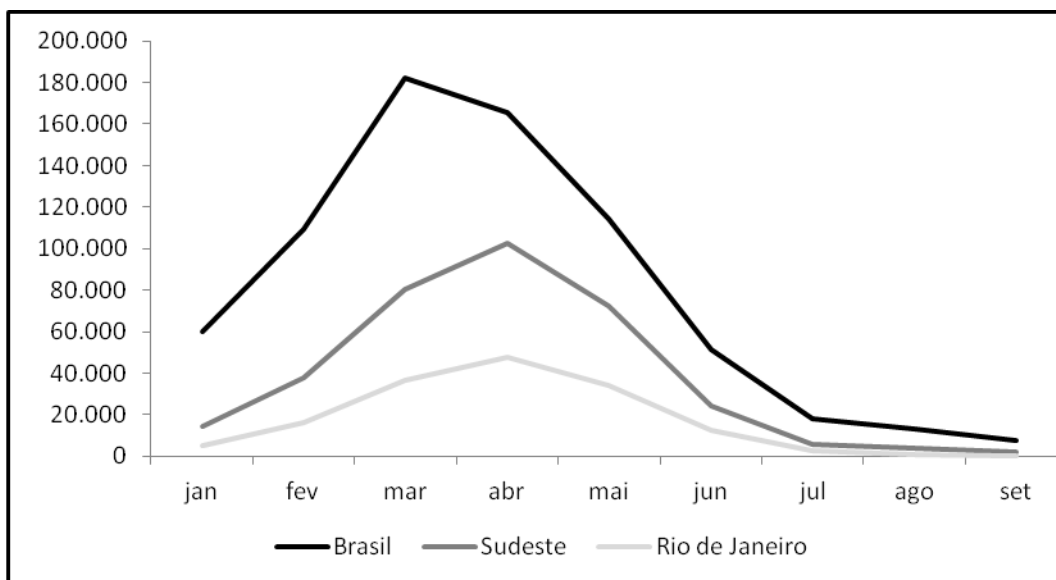


**Figura 1.11:** Casos notificados de dengue na Região Sudeste, 1990-2011 (dados obtidos de SVS 2011).

O monitoramento de sorotipos circulantes ao longo de 2009 identificou a re-emergência do DENV-1 e um alerta para a possibilidade de uma nova epidemia tendo em vista a baixa circulação deste sorotipo desde o início da década. Naquele ano, foram notificados 529.237 casos suspeitos, 5.952 casos de Dengue com Complicações (DCC), 2.271 casos de FHD e 298 óbitos (SVS, 2009).

O risco da introdução do DENV-4 no país era iminente, uma vez que este sorotipo circulava em países vizinhos como a Venezuela e Colômbia (Guzman e Kouri, 2002). Contudo, somente em 2010 ocorreram os primeiros casos de DENV-4 em Roraima e Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro, introduzidos pelo município de Niterói (SVS 2011).

Até a 39ª semana epidemiológica de 2011, foram notificados no Brasil 721.546 casos de dengue, com a confirmação de 10.069 casos graves e 468 óbitos, a Região Sudeste com o maior número de casos notificados, 343.73 (47,6%) sendo, 6.216 casos graves confirmados e 222 óbitos. Somente no Rio de Janeiro foram confirmados 141 óbitos, figura 1.11 (SVS, 2011).



**Figura 1.12:** Casos confirmados de dengue no Brasil até a 39ª semana epidemiológica de 2011 (dados obtidos de SVS, 2011).

## 1.5. MANIFESTAÇÃO CLÍNICA E CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO POR DENGUE

A dengue apresenta um espectro clínico muito amplo, desde formas oligossintomáticas até quadros graves com hemorragia e choque, podendo evoluir para o óbito. É freqüente a descrição clínica do dengue em formas polarizadas: dengue clássico e o dengue hemorrágico com manifestações de comprometimento “sangüíneo”, evoluindo freqüentemente para um quadro de choque (Rocha e Tauil, 2009; Guzman et al, 2010).

### 1.5.1. Dengue Clássico (DC)

A primeira manifestação é a febre alta (39° a 40°C), de início súbito, seguida de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema e prurido.

A doença tem duração de 5 a 7 dias, mas o período de convalescença pode ser acompanhado de grande debilidade física, e prolongar-se por várias semanas.

As manifestações hemorrágicas, apesar de incomuns na DC podem ocorrer em alguns indivíduos, sendo mais comuns petéquias, equimoses, epistaxe, hemorragia gengival e metrorragias, surgindo no final do período febril (Cunha e Nogueira, 2005).

A forma clássica é autolimitada e geralmente resulta numa completa recuperação (Nishiura e Halstead, 2007).

### 1.5.2 Febre Hemorrágica do Dengue (FHD)

Os sintomas iniciais são semelhantes aos do DC, porém há um agravamento do quadro no terceiro ou quarto dias de evolução, com aparecimento de manifestações hemorrágicas e colapso circulatório (SVS, 2010).

Nos casos graves de FHD, o choque geralmente ocorre entre o 3º e 7º dias de doença, geralmente precedido por dor abdominal (SVS, 2010).

A Organização Mundial da Saúde definiu um critério de classificação das formas de FHD, em 4 categorias, de acordo com o grau de gravidade:

- **Grau I** – febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva;
- **Grau II** – além das manifestações constantes do Grau I somam-se hemorragias espontâneas (sangramentos de pele, petéquias, epistaxe, gengivorragia e outras);
- **Grau III** – colapso circulatório com pulso fraco e rápido, diminuição da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação;
- **Grau IV** – choque profundo, com pressão arterial e pulso imperceptível (síndrome do choque da dengue).

Os Graus I e II são considerados os Graus mais brandos da FHD, enquanto os Graus III e IV representam a evolução da doença para o estágio de choque. Esta é uma classificação dinâmica e pode mudar rapidamente de acordo com a evolução e o estágio em que o paciente se encontra (Sá e Zagne, 2008).

O choque é decorrente do aumento de permeabilidade vascular, seguida de hemoconcentração e falência circulatória. É de curta duração e pode levar a óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida, após terapia antichoque apropriada. Alguns pacientes podem ainda apresentar manifestações neurológicas, como convulsões e irritabilidade (SVS, 2010).

### 1.5.3 Dengue com Complicações (DCC)

O Ministério da Saúde classifica DCC como todo caso que não se enquadre nos critérios de FHD e a classificação de DC é insatisfatória, dada a gravidade do quadro clínico-laboratorial apresentado (SVS, 2010).

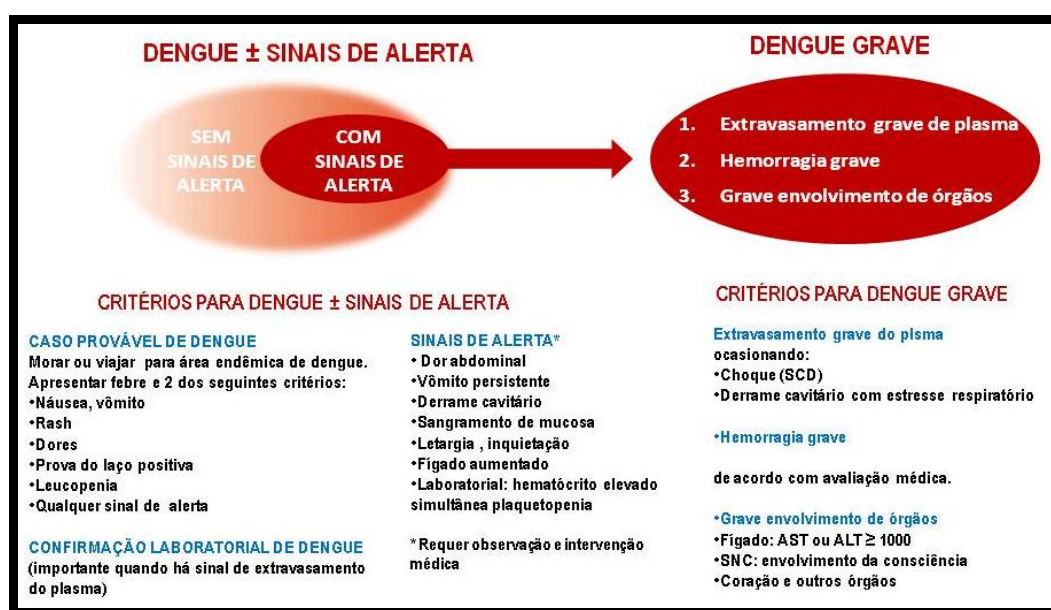
Nessa situação, a presença de um dos itens a seguir caracteriza o quadro: alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou



inferior a 50 mil/mm<sup>3</sup>; hemorragia digestiva; derrames cavitários; leucometria global igual ou inferior a 1 mil/mm<sup>3</sup>; óbito (SVS, 2010).

### 1.5.4 Nova Classificação das Infecções por Dengue

Com o objetivo de orientar os médicos na identificação precoce dos casos graves, a OMS propôs uma nova classificação dos casos de dengue, a partir da iniciativa intitulada DENCO (do inglês “Dengue Control”), utilizando um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais. Nesta classificação levou-se em conta a presença de sinais de alerta e formas grave, representados na figura 1.13. (OMS, 2009).



**Figura 1.13:** Classificação dos casos de dengue de acordo com a OMS, 2009.

### 1.6 PATOGENIA

A infecção com um sorotipo induz imunidade permanente específica ao sorotipo infectante, entretanto, confere apenas uma curta imunidade cruzada (heterotípica) para os outros sorotipos, o que possibilita às pessoas que vivem em áreas hiperendêmicas onde circulam múltiplos sorotipos do vírus dengue, serem infectadas com os quatro sorotipos durante sua vida (Gubler, 1997; Sabin, 1952).

Diversas teorias são propostas para explicar o alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelos DENV. A teoria da infecção sequencial ou da facilitação dependente de anticorpos (do inglês: “ADE - antibody dependent enhancement”, considera que há um aumento da replicação viral em macrófagos via anticorpos (acs) heterólogos. Em infecções

secundárias com o vírus de sorotipo diferente da infecção anterior, os ACS que reagem de forma cruzada com este novo sorotipo, sem neutralizá-los. Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam na infecção celular e replicação viral. Essas células infectadas liberam na corrente sanguínea, mediadores vasoativos, aumentando a permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular (Hasteed, 1988)

A teoria da virulência viral sugere que a gravidade da doença deve-se às variações genéticas e antigênicas das diferentes cepas de vírus. Uma explicação admitida, é que a evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo possa dar origem a cepas epidêmicas ou mais virulentas (Rosen *et al.*, 1977; Rico-Hesse, 1990).

A teoria da interação multifatorial considera outros fatores como predisposição genética de algumas populações, idade, sexo, estado nutricional como sendo importantes na patogênese da DH e da SCD. Entretanto, no que tange à cepa viral, estudos epidemiológicos demonstram que algumas cepas de DENV estão associadas mais frequentemente com graves epidemias, altas incidência de FDH/SCD e rápida transmissão (Gubler e Trent, 1993).

A teoria do “Pecado Original” descreve a existência de evidências “*in vivo*” da ativação de células T CD4 e CD8 durante a infecção por DENV, sendo que, tal ativação seria mais intensa em pacientes graves quando comparados a pacientes com a forma branda da doença. Sugere-se que a patogênese da doença possa ser causada pela ativação dessas células (Mentor e Kurane, 1997; Mongkolsapaya *et al.*, 2003). Durante a infecção primária as células T apresentam uma maior afinidade pelos epítomos presentes no sorotipo infectante, ocasionando a formação de células de memória para este sorotipo. Entretanto, na infecção secundária, por outro sorotipo, as células de memória, de uma infecção prévia, seriam ativadas e se multiplicariam mais rapidamente que as células específicas para o sorotipo infectante. A liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, como IFN-gama pode agir diretamente sobre o endotélio vascular e resultar no extravasamento de plasma, característico das infecções graves por DENV (Pang *et al.*, 2007; Mongkolsapaya *et al.*, 2003).

A teoria do mimetismo molecular propõe que a patogênese do dengue seja resultado de uma reação autoimune. O desenvolvimento de anticorpos de reatividade cruzada ao plasminogênio (devido a uma similaridade em 20 aminoácidos da glicoproteína do envelope viral e uma família de fatores da coagulação) poderia estar relacionado com a hemorragia do dengue. O aumento da destruição de plaquetas ou a diminuição na sua produção poderia resultar em trombocitopenia (Rothman, 2004).

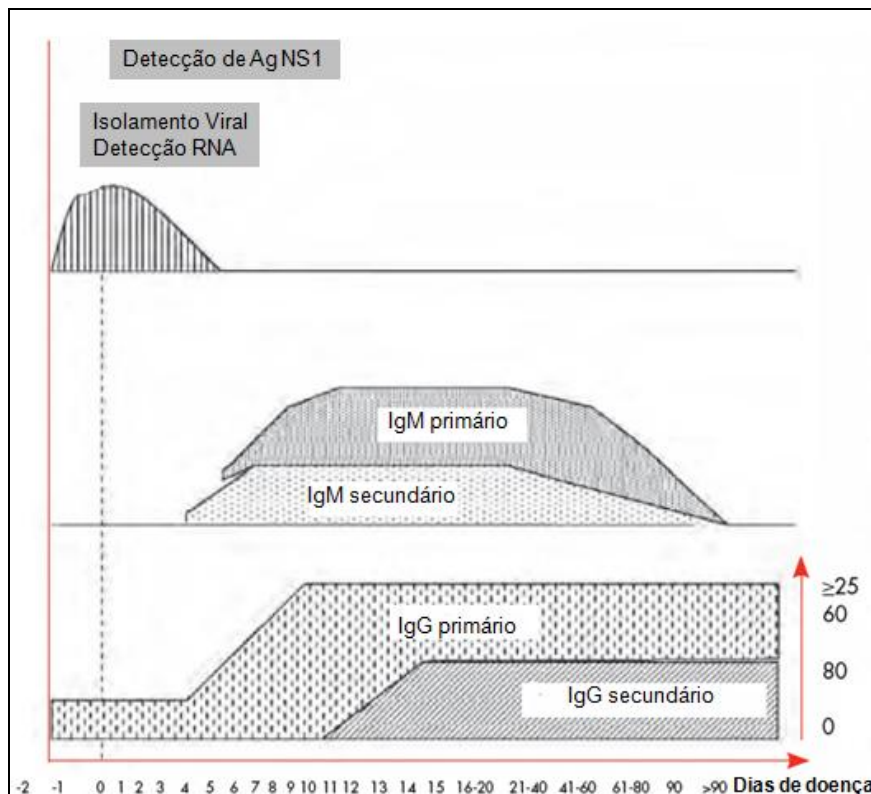
### 1.6.1. Viremia e Cinética da Resposta Humoral

A viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente recorrer a tratamento médico. Vírus circulantes permanecem, no entanto, detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (Vorndam e Kuno, 1997).

O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é a IgM. Cerca de 8% dos pacientes apresentam níveis detectáveis de IgM já nos primeiros dias de doença (principalmente no segundo dia de doença), enquanto a maioria encontra-se positivo no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (Nogueira *et al.*, 1992; PAHO, 2004). Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, sendo considerado como indicador de infecções recentes (Gubler e Sather, 1988; Nogueira *et al.*, 1992).

Em uma resposta primária, anticorpos IgG começam a aparecer a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida. Indivíduos com imunidade prévia ao DENV desenvolvem uma resposta secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG após o início dos sintomas e pelo alto grau de reação cruzada, mesmo contra outros *Flavivirus*, apresentado por esses anticorpos (Innis *et al.*, 1989).

Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária (OMS, 1997). A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos pode ser, portanto, usados na caracterização de respostas primárias e secundárias, figura 1.14 (Halstead, 2007).



**Figura 1.14:** Detecção da infecção por DENVs durante as respostas primárias e secundárias (adaptado de OMS 2009).

## 1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial do dengue é uma ferramenta importante para a confirmação dos casos e para a vigilância epidemiológica, principalmente durante períodos inter-epidêmicos.

Tradicionalmente o diagnóstico é realizado através da detecção e identificação do vírus, ácido nucléico, ou antígeno viral e, através de testes sorológicos para pesquisa de anticorpos IgM e IgG.

É importante considerar o período da doença em que o paciente se encontra para se decidir qual o tipo mais apropriado de teste que será utilizado para que se possa fazer uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento independa do diagnóstico virológico (Kao *et al.*, 2005).

### 1.7.1 Isolamento Viral e Teste de Imunofluorescência Indireta

O isolamento viral considerado o “padrão ouro” para comparação com outros métodos, uma vez que é a evidência direta da infecção viral, é capaz de diagnosticar a dengue durante a fase aguda da doença, quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis.

Quatro sistemas de isolamento do vírus dengue têm sido utilizados: inoculação intracerebral em camundongos com 1 a 3 dias de nascidos; cultura de células de mamíferos (como as linhagens de células LLC-MK2, Vero e BHK21); inoculação intra-torácica em mosquitos adultos e cultura de células de mosquito (como células AP-61, Tra-284, C6/36, AP64 e CLA-1). A inoculação de amostras diretamente em mosquitos *Toxorhynchites splendens* adultos é considerada o melhor sistema de isolamento, em termos de sensibilidade, porém exige muita experiência e não está disponível na maioria dos países endêmicos (Gubler, 1997; Guzmán; Kourí, 2002; Huang *et al.*, 2004).

A inoculação do soro, coletado na fase aguda, em linhagens celulares de mosquito, tais como *Aedes albopictus* (C6/36), *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) é comumente empregada para o isolamento viral (Guzman e Kouri, 2002). Atualmente, o isolamento viral com linhagem de células C6/36 de *Aedes albopictus* tem sido o método de escolha para a rotina, por sua facilidade de manutenção e sensibilidade (Igarashi, 1978; Kuno, 1987).

O isolamento pode ser observado pela presença do efeito citopático (ECP), no entanto algumas amostras de vírus dengue podem produzir discreto ou nenhum ECP, sendo por isso indicada a confirmação da presença do vírus através do teste de imunofluorescência que também é utilizado para identificar o sorotipo utilizando-se anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (DENV-1 a 4) (Henchal *et al.*, 1992; Gubler *et al.*, 1984).

### 1.7.2. Testes Imunoenzimáticos

Testes imunoenzimáticos (ELISA) são muito utilizados para o diagnóstico da dengue, devido a praticidade, especificidade e sensibilidade. Detectam anticorpos da classe IgM e IgG e antígenos NS1.

O teste imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA), tem sido nas últimas décadas o método de escolha para o diagnóstico precoce das infecções por DENV (Kuno *et al.*, 1987). Em casos suspeitos de dengue, a presença de anticorpos IgM anti-dengue indica infecção recente. Para a detecção de anticorpos do tipo IgM o protocolo de MAC-

ELISA descrito por Kuno *et al.*, (1987) durante vários anos foi utilizado como método de escolha por vários laboratórios.

Este utiliza antígeno dengue específico para os quatro sorotipos de dengue (DENV 1-DENV 4), produzidos por inoculação em cérebro de camundongos. Hoje os testes comerciais utilizam antígenos derivados da proteína E.

Alguns pacientes apresentam níveis detectáveis de IgM já no primeiro dia da doença e cerca de 93% , dos pacientes, encontram-se positivo no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (PAHO, 2004). Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, o que faz desses anticorpos indicadores de infecções primárias (Gubler e Sather, 1988).

O teste imunoenzimático tem sido igualmente utilizado para detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA). Esta técnica de fácil execução permite a caracterização do tipo de infecção (primária ou secundária) porque permite a detecção quantitativa e qualitativa. A detecção de anticorpos IgG pelo método de ELISA foi um bom substitutivo para o teste de Inibição da Hemaglutinação. Anticorpos IgG começam a aparecer, em uma resposta primária, alguns dias depois dos IgM, em geral, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida. (Innis *et al.*, 1989; Miagostovich *et al.*, 1999).

Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária. A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos pode ser, portanto, usados na caracterização de respostas primárias e secundárias (OMS, 1997).

O antígeno NS1 está presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas e permanece detectável até o quinto ou sexto dia. Como essa proteína aparece no início da infecção, antes do surgimento dos primeiros anticorpos, seu uso como uma ferramenta de detecção precoce da dengue vem sendo investigada (Xu *et al.*, 2006). Uma vez que NS1 induz, também, uma forte resposta humoral, o uso dessa proteína como antígeno em testes de detecção de anticorpos foi sugerido (Valdes *et al.*, 2000).

Um dos fatores mais importantes e necessários para o diagnóstico clínico e para a vigilância epidemiológica do dengue é a disponibilidade de métodos rápidos, sensíveis e específicos para detectar a infecção viral. Neste contexto, vários testes comerciais têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das infecções por DENV para pesquisa de anticorpos específicos (Wu *et al.*, 1997; Kuno *et al.*, 1998; Lam e Devine, 1998; Sang *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 1999; Cuzzubbo *et al.*, 2001).

Atualmente kits comerciais, tais como o pan-E DENGUE EARLY ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), PLATELIA™ DENGUE NS1 ANTIGEN e DENGUE NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes La Coquette, França), são utilizados para o diagnóstico precoce das infecções de dengue baseado na captura de antígeno NS1. Estes kits apresentaram maior sensibilidade e especificidade na detecção frente a outras metodologias aplicadas a sorologia, como o MAC-ELISA e detecção de IgG. As técnicas de detecção de anticorpos IgM e IgG, na infecção por DENV, apresentam limitações na fase aguda da doença. A IgM é detectada entre 3 à 5 dias de infecção e IgG de 10 à 14 dias, diferentes da detecção de antígenos NS1 que pode ser confirmado a partir 0 à 9 dias, com pico de 6 à 10 dias de infecção (Lima *et al.*, 2010).

### **1.7.3. Inibição da Hemaglutinação (IH)**

O ensaio de IH era utilizado para classificar a resposta imune das infecções por dengue, em infecções primárias ou secundárias. No entanto, IH tem várias limitações, como exigir amostras pareadas, e a trabalhosa obtenção de hemaglutininas, estas limitações acabou comprometendo a aplicabilidade desta técnica, por isto na década de 80, IH foi substituído pela pesquisa de anticorpos IgG (Clarke e Casals, 1958; De Paula e Fonseca, 2004).

### **1.7.4. Fixação do Complemento**

O teste de fixação de Complemento baseia-se na capacidade do complexo antígeno-anticorpo de fixar e inativar moléculas do sistema complemento, presentes no soro. Se o anticorpo é específico para o antígeno, o complexo antígeno-anticorpo é formado e o complemento é fixado. Numa segunda etapa, um complexo formado por hemácia-anticorpo anti-hemácia (sistema revelador), é adicionado à mistura. (De Paula e Fonseca, 2004).

Ao contrário da técnica de MAC-ELISA e IH, que detectam anticorpos a partir do 5º ao 7º dia de doença, os anticorpos detectados pela fixação do complemento aparecem mais tardiamente, entre o 7º-14º dias após o início dos sintomas e persistem por períodos curtos, não sendo indicado como marcador de infecção recente. Por ter uma baixa sensibilidade esta técnica foi substituída por outras metodologias. Para melhor interpretação necessita da obtenção de soros pareados (Teles, Prazeres e Lima-Filho, 2005).

### **1.7.5. Teste Neutralização em Placa (PRNT)**

Esta técnica é baseada no princípio da interação vírus-anticorpos, resultando na neutralização do vírus, de tal forma que este é incapaz de infectar e se replicar em cultura celular (Calisher *et al.*, 1989). Apesar de ser o método mais sensível de diagnóstico sorológico, é um teste demorado e de difícil interpretação e pode ser influenciado por vários fatores como tipo de cultura utilizada e estoque viral.

### **1.7.6. Técnica Imunohistoquímica**

A técnica de imunohistoquímica pode ser de grande utilidade para a detecção dos DENV em tecidos provenientes de casos de óbitos. Baseia-se na conjugação de marcadores, como moléculas de imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico localiza o antígeno tecidual. Atualmente há disponibilidade de grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos parafina, permitindo o estudo de blocos arquivados por longos períodos, principalmente em casos fatais (Miagostovich *et al.*, 1997).

### **1.7.7 RT-PCR**

A técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) é utilizada rotineiramente em laboratórios, para a identificação do sorotipo de dengue. O protocolo mais utilizado é o descrito por Lanciotti *et al.* (1992), sugerido pela Organização Pan-Americana de Saúde, onde é realizado em duas etapas, no qual a primeira etapa ocorre uma amplificação inicial, utilizando primers de regiões conservadas das proteínas C e prM do genoma viral, numa segunda etapa (semi-nested) ocorre a identificação dos vírus, com primers específicos para cada sorotipo (DENV1-DENV4). Os produtos da reação são submetidos a eletroforese, em gel de agarose, para a diferenciação, pelo peso molecular, permitindo a visualização, através de moléculas intercalantes de DNA, como o brometo de etídeo, revelados em luz U.V. (Guzman *et al.*, 2004; De Paula e Fonseca, 2004).

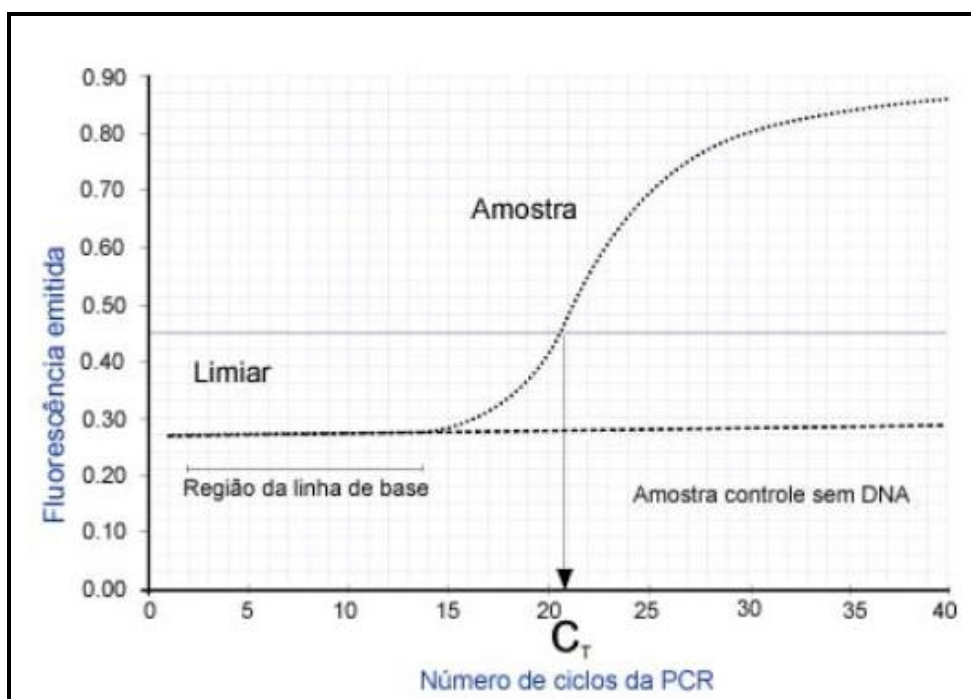
### **1.7.8 RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR)**

É um sistema de análise, em tempo real, onde utiliza primers e sondas específicos para cada sorotipo de dengue, ou específico numa região conservadas de todos os sorotipos. O uso



da fluorescência, na sonda, permite a detecção dos produtos, conforme eles são produzidos, ou seja, em tempo real, sem a necessidade da eletroforese (Holland *et al.*, 1991).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de Ct (do inglês “Cycle Threshold”), que permite a quantificação exata. O Ct é proporcional ao número de cópias do alvo presente na amostra (Novais; Pires-Alves, 2004). Quanto mais alta é a quantidade inicial do alvo, mais cedo o produto acumulado é detectado no processo de PCR, e mais baixo é o valor do Ct (Dorak, 2006).



**Figura 1.15:** Curva de Amplificação da PCR em tempo real (Novais e Pires-Alves 2004)

A eficiência da amplificação da reação de PCR em tempo real deve ser de 90 a 100%, podendo ser calculada usando-se dados coletados de uma curva padrão com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = [10 (-1/\text{slope})] - 1$$

O *slope* é o indicador da amplificação real, representa o coeficiente angular da reta composta pelos pontos da curva padrão. Uma alta eficiência está associada à inclinação de aproximadamente 3,32 para cada diluição do alvo de 10 vezes – fator 10 (Gomes, 2008).

É apresentado em dois sistemas: sistema SYBR Green, que se liga entre a dupla fita de DNA, ligando-se de forma inespecífica, são semelhantes ao corante Brometo de etídio. Já o sistema TaqMan<sup>TM</sup>, usa sondas duplamente marcadas por corantes fluorescentes distintos, um

repórter (ex: FAM) e um quencher (ex: TAMRA), hibridiza em regiões amplificadas flanqueadas pelos iniciadores. Quando os dois corantes estão próximos, e a sonda ainda intacta, o quencher absorve a energia liberada pelo repórter, evitando assim a emissão da fluorescência. A atividade 5' exonuclease da enzima Taq polimerase degrada a sonda durante o curso da PCR, separando os fluoróforos, propiciando a liberação da fluorescência (Holland *et al.*, 1991).

Existem muitos protocolos que detectam apenas um sorotipo (do inglês “Singleplex”) ou outros detectam mais de um sorotipo na mesma reação (do inglês “Multiplex”), o último costuma ser menos sensível que o nested RT-PCR (Johnson *et al.*, 2004; De Paula e Fonseca, 2004).

Quando comparado ao PCR convencional, podemos citar como vantagem dessa metodologia a rapidez, maior sensibilidade e a capacidade de determinar a carga viral presente na amostra. E por ser um sistema fechado, o risco de contaminação cruzada é menor (De Paula e Fonseca, 2004).

## **1.8. PREVENÇÃO E CONTROLE**

O controle da dengue ainda é baseado em controle vetorial e programas comunitários, para manter o ambiente livre de potenciais fontes de criadouro (Machado *et al.*, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde propôs em 1996, o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa) com o objetivo de reduzir sua infestação, a incidência da doença e a letalidade por FHD. Entretanto, a introdução do DENV-3 no país e a re-emergência do DENV-2 e sua rápida disseminação, facilitou a circulação de novos sorotipos ou cepas virais. Neste cenário epidemiológico, o Ministério da Saúde, em 2002, criou o Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD), para a intensificação e implantação de medidas de controle, visando à redução do impacto do dengue no país (FUNASA, 2002).

### **1.8.1 Profilaxia**

É essencial a obtenção de uma vacina tetravalente, capaz de gerar uma resposta de anticorpos elevada e duradoura, tendo em vista a possibilidade de uma reinfecção nas áreas endêmicas. Enquanto uma vacina eficaz não for desenvolvida, as medidas de controle ao vetor consistem no principal instrumento para a prevenção da infecção pelos DENV, além da melhoria dos serviços de saneamento básico e a rápida identificação dos pacientes que apresentem formas clínicas graves da doença.

Do ponto de vista epidemiológico é importante se definir a origem dos vírus, o espalhamento das cepas e o impacto sobre a população. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina que seja capaz de interromper a transmissão de cepas com potencial epidêmico.

Testes clínicos de candidatas a vacinas atenuadas começaram na década de 1980. Enquanto cepas atenuadas têm sido desenvolvidas, a identificação de uma formulação tetravalente que não apresente interferência significativa entre os quatro vírus tem sido um desafio. Mais recentemente, abordagens para a aplicação de DNA recombinante para desenvolvimento de uma vacina têm proporcionado avanços significativos, e os candidatos a vacinas estão progredindo em ensaios clínicos (Coller e Clements, 2011).

O produto mais avançado é o da Sanofi Pasteur, a vacina tetravalente ChimeriVax-Dengue, que encontra-se em testes de eficácia de campo na Tailândia (Senior, 2009; Guy *et al.*, 2010) e mais recentemente entrou na fase 3 dos testes clínicos (Lang, 2009). A tecnologia ChimeriVax é baseada em quatro vírus recombinantes contendo os genes prM/E de cada um dos quatro tipos dos DENVs inserido no vírus vacinal da Febre Amarela, a cepa 17D vacinal (Guy *et al.*, 2010a; Guy *et al.*, 2010). Um dos principais desafios no entanto, é o esquema de administração prolongada (3 doses em intervalos de 6 meses). Além disso, a imunidade incompleta ao longo de 12 meses pode colocar vacinados, de áreas endêmicas, em risco de uma infecção grave (Coller e Clements, 2011).

O Laboratório de Doenças Infecciosas (LID) do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) está desenvolvendo uma vacina atenuada tetravalente, molecularmente definida com base na recombinação viral, onde eliminações da região 3 não-codificante do vírus e/ou quimerização dos genes prM e E dos tipos de dengues como ChimeriVax, mas usando um protótipo de dengue 4 (DEN4Δ30) no vírus vacinal da Febre amarela 17DD (Blaney *et al.*, 2006). Dados preliminares desses estudos sugerem que a vacina tetravalente é segura e pode oferecer vantagens em termos de respostas equilibradas em comparação com outros vírus vivos atenuados. O LID forneceu a tecnologia para várias empresas desenvolverem, incluindo Instituto Butantan, no Brasil, E Panacea Biotech Biológica na Índia, e VaBiotech no Vietnã (Coller e Clements, 2011).

Várias empresas/ instituições também estão buscando o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue. A Inviragen está desenvolvendo DENVax, outra vacina atenuada, quimérica, tetravalente com base na utilização de um tipo de vírus atenuado do DENV-2 (Huang *et al.*,

2003). DENVax está atualmente em testes de clínico de fase 1 nos EUA e Columbia com opções de aplicações subcutânea e intradérmica (Coller e Clements, 2011).

Merck & Co está desenvolvendo a vacina recombinante com subunidade de proteínas produzidas originalmente pela Hawaii Biotech, Inc., que compreende a utilização da proteína C-terminal junto com glicoproteínas do envelope (DEN-80E) dos quatro vírus do dengue (Clements *et al.*, 2010). A abordagem de subunidades proteicas é projetado para evitar os problemas de interferência viral, que têm sido observadas com todas as vacinas de vírus atenuados testadas até à data, e fornece um mecanismo alternativo para a indução de respostas equilibradas tetravalente (Coller e Clements, 2011).

Apesar do grande otimismo, a liberação de uma vacina efetiva contra os quatro sorotipos do DENV, ainda requer anos de pesquisa e testes clínicos em seres humanos (Coller e Clements, 2011).

## **2.OBJETIVOS**

### 2.1.Objetivo Geral:

- Estudar a viremia induzida por duas linhagens de DENV-2 circulantes em dois períodos distintos, no estado do Rio de Janeiro e, sua associação com a apresentação clínica da doença.

### 2.2.Objetivos específicos:

- Quantificação direta do RNA viral em amostras de soros agudos de pacientes com infecção por DENV-2 nos períodos de 1990-2002 e 2007-2011;
- Analisar a viremia induzida pelas duas linhagens de DENV- 2 em casos de dengue e grave;
- Classificar a resposta imune dos casos de DENV-2 com diferentes apresentações clínicas;
- Correlacionar título de viremia com o tipo de infecção primária e/ou secundária, idade, sexo e dias de doença.

### 3. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos mais de sete milhões de casos foram registrados no Brasil durante epidemias de dengue causadas pelos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SVS, 2011). O DENV-2 foi inicialmente introduzido no estado do Rio de Janeiro em 1990, neste período, foram registrados os primeiros casos de FHD/SCD e um aumento no número de hospitalizações (Nogueira *et al.*, 1990, Zagne *et al.*, 1994, Vasconcelos *et al.*, 1995). Após sete anos sem atividade, este sorotipo re-emergiu em 2007 e causou, em 2008, a epidemia mais grave de dengue já registrada no país (Teixeira *et al.*, 2009; SVS, 2009). A análise filogenética baseada no gene E demonstrou que, apesar dos DENV-2 de 2007-2008 ainda pertencerem ao mesmo genótipo, o genótipo asiático, circulante anteriormente, estes se agruparam formando uma linhagem distinta (Oliveira *et al.*, 2010).

Estudos de quantificação viral para dengue realizados por Vaughn *et al.* (1999, 2000) e Araújo *et al.*, 2009c, evidenciaram uma correlação entre quantidade de partículas virais e gravidade da doença. No entanto, estudos sobre viremia induzida por linhagens distintas dentro de um mesmo genótipo e sua associação com a gravidade da doença até o momento não haviam sido realizados.

Neste novo cenário, para entender a progressão da doença para as formas mais graves no estado do Rio de Janeiro, a quantificação da magnitude da replicação viral produzidas pelas duas linhagens de dengue circulantes no estado é fundamental. Para isso, foi utilizado um teste com alta sensibilidade, o método de PCR quantitativo para DENV-2, descrito por Poersch *et al.*, (2005), na fase precoce da doença, com a finalidade de avaliar o impacto desta nova linhagem (Linhagem II) no estado do Rio de Janeiro.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo é do tipo analítico, observacional e transversal.

### 4.2 AMOSTRAGEM

Foram utilizados, neste estudo, soros de 102 pacientes confirmados como DENV-2, classificados como casos dengue e dengue grave e pelo tipo de infecção primária ou secundária, residentes no estado do Rio de Janeiro e ocorridos em dois períodos distintos, 1990 a 2002 e 2007 a 2011 (Tabela 4.1), períodos correspondentes à circulação das linhagens I e II de DENV-2. Essas amostras eram provenientes do banco de soros do Laboratório de Flavivírus, armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 4.1:** Amostras (n=102) analisadas

<b>Amostras 1990-2002</b>	<b>Amostras 2007-2011</b>
Dengue n= 43	Dengue n= 27
Dengue Grave n= 9	Dengue Grave n= 23
Total: 52	Total: 50

As amostras foram selecionadas quanto o sorotipo infectante através do isolamento viral em cultivo de células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978) e posterior identificação do vírus pelo método de imunofluorescência indireta (Henchal et al, 1982; Gubler *et al.*, 1984) e/ou pelo método de RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992). Os casos positivos para DENV-2 foram classificados quanto ao tipo de infecção (primária ou secundária), através do método de IgG anti-dengue “*in-house*” descrito por Miagostovich *et al.*, 1999.

Os soros que atendiam os critérios de inclusão foram utilizados para quantificação da carga viral pelo método de qRT-PCR em tempo real sistema TaqMan.

Os critérios utilizados para a seleção e exclusão das amostras, utilizadas neste estudo estão representados na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Critérios utilizados para a seleção e exclusão das amostras, utilizadas neste estudo

Inclusão	Exclusão
<b>Confirmação do sorotipo 2 por isolamento e/ou RT-PCR</b>	Amostras negativas ou positivas para os sorotipos DENV-1, DENV-3 e DENV-4.
<b>Amostras recebidas no período de 1990-2002 e 2007-2011, do estado do Rio de Janeiro</b>	Amostras encaminhadas fora do período de 1990 à 2011 e outro estado
<b>Amostras colhidas até 7 dias de doença</b>	Amostras colhidas após 7 dias de doença
<b>Ficha epidemiológica informando os sinais e sintomas</b>	Pacientes sem a ficha epidemiológica ou não preenchida corretamente.

### 4.3. CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS DE DENGUE

A seleção dos casos de dengue clássico e dengue grave seguiram os critérios estabelecidos pela OMS (2009) conforme a figura 1.13.

### 4.4. ISOLAMENTO VIRAL

A inoculação de soros de fase aguda da infecção em cultura de células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 foi utilizado o método para o isolamento viral descrito por Igarashi (1978).

#### 4.4.1. Metodologia

As células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 2,0 ml de meio L-15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). Após a formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB. Os soros diluídos 1/10 em meio L-15 foram inoculados em alíquotas de 0,1ml na monocamada celular. Para cada grupo de amostras inoculadas, foram incluídos controles de vírus (C+) e de células (C-). Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período de dez à quatorze dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Alemanha), com aumento de até 400 vezes.



#### 4.4.2 Meio de Cultura L-15 (Leibovitz)

Foi utilizado o meio L-15 modificado com L-Glutamina e sem triptose fosfato (TPO<sub>4</sub>) e antibióticos, adquirido sob a forma desidratada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

**Tabela 4.3: Reagentes para preparo do meio de cultura L-15**

Reagente	Peso/Vol
Leibovitz 15	14,69g
Água tridestilada q.s.p.	1L

O meio foi filtrado em membrana Milipore (0,22 $\mu$ ) e conservado a 4°C a este meio foi adicionado SFB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) nas concentrações de 2% e 10%, conforme utilizado para manutenção ou crescimento celular, respectivamente.

#### 4.4.3 Antibióticos

**Tabela 4.4: Antibióticos utilizados no meio de cultura**

Reagente	Peso/Vol
Penicilina Sódica Cristalina (Gibco BRL, USA)	1.000.000 unidades
Sulfato de estreptomicina (Gibco BRL, USA)	1g
Solução de Hanks BSS 1x (autoclavado) q.s.p.	100mL

A solução foi filtrada em membrana Milipore (0,22 $\mu$ ) e conservado a -20°C.

#### 4.4.4 Solução de Hanks BSS

**Tabela 4.5: Reagentes A utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks**

<b>Reagente A</b>	<b>Peso/Vol</b>
Cloreto de Cálcio (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	1,4g
Água tridestilada q.s.p.	200mL

**Tabela 4.6: Reagentes B utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks**

<b>Reagente B</b>	<b>Peso/Vol</b>
Fosfato de Sódio Dibásico (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	0,47g
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	0,6g
Água tridestilada q.s.p.	400mL

**Tabela 4.7: Reagentes C utilizadas na mistura para o preparo da Solução de Hanks**

<b>Reagente C</b>	<b>Peso/Vol</b>
Dextrose (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	10 g
Cloreto de sódio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	80g
Cloreto de Potássio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	4g
Sulfato de magnésio com 7 H <sub>2</sub> O (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	2g
Água tridestilada q.s.p.	400mL

As soluções foram preparadas separadamente, reunindo-se inicialmente as soluções A e B e, em seguida a solução C, mantendo-se em agitação constante. Para cada litro de solução foram adicionados 20mL de solução aquosa de vermelho de fenol a 1% a 2 mL de clorofórmio como preservativo. Após o preparo, a solução estoque foi diluída 10 vezes em água tridestilada, autoclavada a 115°C durante 20 minutos. O pH de solução foi ajustado a 7,2 com solução de bicarbonato de sódio 1,4%.

## 4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

As células inoculadas foram submetidas ao teste de imunofluorescência para identificação e/ou confirmação da presença do vírus, utilizando anticorpos monoclonais tipo-específicos para DENV-1 a 4 (Gubler *et al.*, 1984).

### 4.5.1. Metodologia

Promoveu-se o descolamento das células inoculadas, com auxílio da pipeta Pasteur. Aproximadamente 0,025mL da suspensão celular foi colocado sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26x76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). A lâmina foi seca a temperatura ambiente durante a noite, no dia seguinte as lâminas foram fixadas em acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) por 20 minutos a -20°C, em seguida foram secas em temperatura ambiente.

No dia seguinte, inicialmente foi adicionado 20 µL dos “pools” de monoclonais (dengue 1-4) ou , do inglês “mouse immune ascitic fluid” (MIAF) diluído 1:50 em PBS pH 7,5. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, em seguida, retirou o excesso de anticorpos, lavando 2X com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC- Antibodies Incorporated, Davis, USA) diluído em 1:20 de preto de naftaleno 12B 0,1%, incubando em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, retirou o excesso do conjugado, lavando 2X com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Em seguida enxagou-se rapidamente em água tipo II, para a montagem da lâmina com lamínula em glicerol tamponado, para posterior observação em microscópio de imunofluorescência.

Para a tipagem viral foi colocado 0,025mL da suspensão celular sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26x76 mm (Biolab Merieux, New Zealand). A lâmina foi seca a temperatura ambiente durante a noite, no dia seguinte as lâminas foram fixadas em acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) por 20 minutos a -20°C, em seguida foram secas em temperatura ambiente.

Foram adicionados 20 µL dos anticorpos monoclonais (diluído em PBS pH 7,5 - 1x concentrado) para os quatro sorotipos de dengue em orifícios distintos (Ex. monoclonal de DENV-1 no orifício 1; monoclonal de DENV-2 no orifício 2; e sucessivamente até o monoclonal de DENV-4. No orifício 5 pingou PBS pH 7,2 (1x concentrado) e no orifício 10

pingou o “pool” de monoclonais ou MIAF). As Lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, em seguida, retirou o excesso de anticorpos, lavando 2X com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC- Antibodies Incorporated, Davis, USA) diluído em 1:20 de preto de naftaleno 12B 0,1%, incubando em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, retirou o excesso do conjugado, lavando 2X com PBS, pH7,2, e deixou secar em temperatura ambiente. Em seguida enxagou-se rapidamente em água tipo II, para a montagem da lâmina com lamínula em glicerol tamponado, para posterior observação em microscópio de imunofluorescência.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss, Alemanha), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50W e jogo de filtro convencional (FT 510/LP 520).

#### 4.5.2 Tampão Salina Fosfato 10X (Phosphate Buffer Saline-PBS)

**Tabela 4.8: Reagentes utilizados para o preparo do Tampão Salina Fosfato 10X**

Reagentes	Vol/Peso
Cloreto de sódio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	80,0 g
Cloreto de potássio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	2,0 g
Fosfato de potássio monobásico (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	2,0 g
Fosfato de sódio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	11,5 g
Água tridestilada q.s.p.	1 L

Após autoclavação a 121°C durante 20 minutos (1atm), a solução foi conservada à temperatura ambiente.

A solução deve ser diluída 1:10, para que a mesma seja utilizada 1x concentrada.

### 4.5.3 Glicerol Tamponado

**Tabela 4.9: Reagentes utilizados para o preparo de Glicerol Tamponado**

Reagentes	Vol/Peso
Glicerol (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	9 volumes
Tampão Salina Fosfato pH 7,5	1 volume

Após o preparo, a solução foi conservada à temperatura ambiente.

### 4.5.4 Preto de Naftaleno 1% em Tampão Salina Fosfato

**Tabela 4.10: Reagentes utilizados para o preparo de Preto de Naftaleno**

Reagentes	Vol/Peso
Preto de Naftaleno (BDH Chemicals Ltda, England)	1,0 g
Tampão salina fosfato pH 7,5 q.s.p.	100 mL

Após distribuição em frascos de 10mL, as soluções foram autoclavadas a 115°C durante 15 minutos e estocadas à temperatura ambiente. Para uso, esta solução foi diluída 10x no mesmo tampão.

## 4.6. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

### 4.6.1 Captura de anticorpos da classe IgM anti-DENV

Os anticorpos IgM foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgM, utilizando-se o kit ELISA-IgM anti-dengue ® (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália).

#### 4.6.1.a Metodologia

Em placa de 96 poços já sensibilizada com anti-IgM humana, foi adicionado 100µL da amostra diluída em diluente da amostra (10µL de soro em 1000µL do diluente da amostra

diluído) e mesma diluição é aplicada para os controles e calibradores. Foi aplicado 100µL controles negativo, positivo e para os calibradores em seus respectivos poços. Logo em seguida a placa foi incubada durante uma hora a 37°C.

Após a incubação a placa foi lavada seis vezes com Tampão de Lavagem, logo em seguida foi adicionado 100µL do complexo antígeno-anticorpo monoclonal M conjugado (antígeno-MAb) em cada poço, incubando a 37°C, durante uma hora. Posteriormente a placa foi lavada seis vezes com Tampão de Lavagem. Foi pipetado 100µL, em cada poço, do substrato TMB, incubando durante dez minutos à temperatura ambiente, onde formará uma coloração azul. Após esse tempo foi adicionado 100µL da Solução para Interrupção da enzima, mudando de cor azul para amarelo. Dentro de 30 minutos foi realizada leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 450 nm (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) e títulos de IgM anti-DENV foram determinados, de acordo com o fabricante.

#### 4.6.2 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV

Foi utilizado o ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV conforme descrito por Miagostovich *et al.* (1999).

A classificação da resposta imune como primária ou secundária é resultante da análise dos títulos de IgG de acordo com o número de dias de doença após o início dos sintomas, conforme a figura 4.1, ou com a observação da cinética de anticorpos IgM e IgG.

	Dias após o início dos sintomas			Resposta Imune
	≤ 5 dias	6 - 9 dias	≥ 10 dias	
Títulos de IgG	< 160	< 10.240	≤ 40.960	Primária
	≥ 160	≥ 10.240	>40.960	Secundária

**Figura 4.1:** Critérios para interpretação do tipo de resposta imune de acordo com os títulos de IgG e dias de doença após o início dos sintomas (Miagostovich *et al.*, 1999).

#### **4.6.2.a Metodologia**

Microplacas Immulon II (Dynatech Ind.) foram lavadas uma vez com PBS pH 7.4. Foram adicionados 0,1mL de fluido ascítico hiperimune (mistura de anti-DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9.6 e as placas foram incubadas em câmara úmida à 4 °C por 18 horas.

Após 3 lavagens com PBS pH 7,4 os poços da placa foram bloqueados adicionando-se diluente padrão (PBS pH 7.4, Tween 20 a 0,05%, soro normal de cabra a 3%). Após incubação em câmara úmida por 1 hora a 37°C, 0,075 mL de uma mistura de antígeno (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) diluída em diluente padrão, foram aplicadas a cada orifício e as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C.

Após serem lavadas 3 vezes em PBS 7,4, 0,1mL de soro diluído 1:40 em tampão de diluição (PBS pH 7.4, Tween 20 a 0,05%, leite em pó desnatado a 3%) foi adicionado ao primeiro orifício e 0,075 mL nos orifícios restantes. Foram realizadas diluições seriadas na razão 4, até o último orifício, transferindo e misturando 0,025 mL da amostra.

As placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C, lavadas 3 vezes com PBS 7,4 e 1 vez com diluente padrão. Foram adicionados 0,04mL de anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), diluído 1/1500 em tampão de diluição.

Após incubação em câmara úmida por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS pH 7,4 e 0,1 mL de substrato, resultante da mistura de iguais volumes de ABTS (2,2' -azino-di[3-etil-benthiazoline sulfonate]) e peróxido de hidrogênio (Kirkegaard & Perry Laboratories) foi adicionado a cada orifício. Após 30 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura visual e em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 410 nm (Multiskan MCC, Thermo Electron Corporation) e títulos de IgG anti-DENV determinados, de acordo com as diluições máximas obtidas para cada amostra.

#### **4.6.3 Captura de antígenos NS1**

Para detecção do antígeno NS1 foi utilizado o teste Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) e que é um método imunoenzimático em fase única, do tipo sanduíche. O teste utiliza anticorpos monoclonais de camundongo (Mab) para a captura e a revelação.

### **4.6.3.a Metodologia**

Foram adicionados a cada orifício previamente sensibilizado com Mab (anticorpo monoclonais de camundongo), 50 µL do diluente, 50 µL do soro e 100 µL do conjugado simultaneamente. As placas foram incubadas durante 90 minutos a 37°C. Na presença do antígeno NS1 na amostra, forma-se um complexo imune Mab-NS1-Mab/peroxidase. Após as 6 lavagens, a presença do complexo imune é revelada por adição de 160µL, em cada poço, de uma solução reveladora (Tetrametilbenzidina/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação é parada por adição de 100 µL da solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

A DO (Densidade Ótica) obtida a 450/620 nm é proporcional a quantidade de antígeno NS1 presente na amostra testada. A presença do antígeno NS1 numa amostra individual é determinada por comparação entre a DO da amostra com a DO do controle.

O valor de corte corresponde ao valor médio das densidades ópticas das duplicatas de calibradores. Os resultados são expressos sob a seguinte forma, divide-se o valor da densidade óptica da amostra pelo valor da média dos calibradores. Os valores calculados e com resultados <0.5, 0.5 – 1.0, e ≥ 1.0 são definidos como negativo, inconclusivo e positivo, respectivamente.

## **4.7.EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL**

O RNA viral foi extraído de amostra de soro plasmático, utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit, (Qiagen, Alemanha) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

### **4.7.1. Metodologia**

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560 µL de Tampão de Lise AVL+ 5,6 µL de Carrier/AVE; 140 µL do soro. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 560 µL de álcool etílico PA à 100% e a suspensão foi homogeneizada. 630 µL da mistura foram transferidos para uma coluna previamente numerada. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi colocado na coluna e os 630 µL restantes da mistura foram transferidos para a coluna. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm o eluído foi

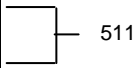


descartado. Adicionou-se 500 µL do Tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minuto a 14000 rpm o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para novo tubo coletor e após centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm, a coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 ml previamente identificado. Adicionou-se 60 µL de Tampão de eluição (AVE) e após centrifugação por 1 minuto a 8000 rpm a coluna foi descartada e o RNA a -70°C.

#### 4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR)

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti *et al.* (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir dos espécimes clínicos. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento “*semi-nested*”, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV. Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento *nested*, são utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 4.11). Os produtos obtidos após a amplificação por RT-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo, revelados em luz UV.

**Tabela 4.11:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue (Lanciotti *et al.*,1992).

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	 511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	616-644	
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392 (D1 + TS4)

### 4.8.1. Metodologia

Em um tubo tipo eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do RNA extraído. Este foi aquecido, em bloco térmico, a 75°C por 5 minutos e posteriormente foi mantido em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 45 $\mu\text{L}$  da mistura RT-PCR, conforme tabela 4.12. Posteriormente colocou-se os microtubos no termociclador, conforme o ciclo da tabela 4.13

**Tabela 4.12:** Reagentes utilizados na RT-PCR

Reagentes	Mistura para RT-PCR (1X)	Mistura para Semi-nested (1X)
Água livre de nucleases (Promega)	34,39 $\mu\text{L}$	33,12 $\mu\text{L}$
10 X PCR Buffer sem $\text{Mg}^{++}$ (Gibco)	4 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
10 mM desoxinucleotídeos (dNTPs) (Gibco)	4 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Gibco)	0,25 $\mu\text{L}$	-
10 $\mu\text{M}$ iniciador D1(Gibco)	0,13 $\mu\text{L}$	0,13 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ iniciador D2(Gibco)	0,13 $\mu\text{L}$	-
10 $\mu\text{M}$ iniciadores TS1-4(Gibco)	-	0,5 $\mu\text{L}$
40 U/ $\mu\text{L}$ RNAsin(Gibco)	0,25 $\mu\text{L}$	-
5 U/ $\mu\text{L}$ Taq DNA Polimerase(Gibco)	0,25 $\mu\text{L}$	0,25 $\mu\text{L}$
2,5 U/ $\mu\text{L}$ enzima AMV-RT(Gibco)	0,1 $\mu\text{L}$	-
50 mM Cloreto de magnésio(Gibco)	1,5 $\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{L}$

**Tabela 4.13:** Parâmetros de ciclagem da RT-PCR

Parâmetros para a RT-PCR		
Temperatura	Tempo	Ciclos
42°C	60 min	1

94 <sup>0</sup> C	30 sec	
56 <sup>0</sup> C	1 min	30
72 <sup>0</sup> C	2 min	
72 <sup>0</sup> C	10 min	1
4 <sup>0</sup> C	Até Retirar do Termociclador	

Numa segunda etapa de amplificação (Semi-nested PCR), para tipagem dos vírus dengue, diluiu-se os produtos, em microtubos de 1,5 mL diluir os produtos obtidos em 1:100 (5 µL produto e 495 µL água free).

Em microtubos de 200 µL, adicionou-se 45 µL da mistura semi-nested PCR e 5 µL do produto da primeira reação diluído. Colocou-se os microtubos no termociclador, conforme o ciclo da tabela 4.14

**Tabela 4.14:** Parâmetros de ciclagem da Semi-nested PCR

Parâmetros para a Semi-nested PCR		
Temperatura	Tempo	Ciclo
94 <sup>0</sup> C	30 sec	
56 <sup>0</sup> C	1 min	18
72 <sup>0</sup> C	2 min	
72 <sup>0</sup> C	10 min	1
4 <sup>0</sup> C	Até Retirar do Termociclador	

Após a semi-nested realizou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%), onde numa bandeja acrílica adicionou-se a mistura de 1,5 g de agarose com 100 mL de TBE (0,5X), onde foi previamente aquecido e solubilizado, quando a mistura estava resfriada foi adicionado 5 µL de brometo de etídeo. Após a solidificação, colocou-se o gel imerso em TBE (0,5X) na cuba de eletroforese.

Aplicou-se 10 µL da reação, obtida após a semi-nested, + 2µL azul de bromofenol e procedeu a eletroforese a 100 V-50mA /45 min. No primeiro orifício, aplicou-se 3,5 µL do

peso molecular + 2  $\mu$ L azul de bromofenol. Após a corrida realizou-se a captura da imagem num trans-iluminador, leitura feita em luz UV.

#### 4.8.2 10 mM desoxinucleotídeos (dNTPs)

**Tabela 4.15: Diluição dos desoxinucleotídeos em 10mM**

Reagentes	Peso/Vol
dNTP estoque	25 $\mu$ L
Água livre de nucleases	900 $\mu$ L

Adicionar 25  $\mu$ L de cada dNTP estoque a 900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Homogeneizar bem e estocar a -20°C.

#### 4.8.3. Gel de agarose 1% em TBE 0,5X

**Tabela 4.16: Reagentes utilizados para o preparo do Gel de agarose**

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

Em um erlenmeyer, dissolver a agarose em TBE 0,5X, aquecendo a solução microondas (temperatura máxima) por 2 min.. Resfriar a solução e adicionar 5  $\mu$ L de brometo de etídio 1%.

#### 4.8.4. Diluição do padrão de peso molecular

Para utilização, o peso molecular (100pb DNA ladder) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) foi diluído 1/10 com água livre de nucleases.

#### 4.9. RT-PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL PELO SISTEMA TAQMAN (qRT-PCR)

A concentração RNA viral foi estimado pela quantificação absoluta do DNA complementar, realizada pela técnica de qRT-PCR em um único etapa, sistema TaqMan, onde primeiramente ocorre a transcrição do RNA viral em DNA complementar e posterior amplificação do cDNA. Os iniciadores e a sonda marcada com os corantes 3'FAM e 5'TAMRA (Tabela 4.17.), específicos para DENV-2, foram descritos por Poersch *et al.*(2005). Os mesmos foram validados, testando sua sensibilidade e especificidade.

**Tabela 4.17:** Iniciadores, da região E (Envelope), utilizados para a reação de qRT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan<sup>TM</sup>) aplicados nos DENV-2 (Poersch *et al.*, 2005).

INICIADORES	SEQUÊNCIA	POSIÇÃO
DEN2-R	5-ACCATAGGAACGACACATTTCC-3	864-885
DEN2-F	5-CAACGCATTGTCATTGAAGGA-3	923-943
DEN2-P	FAM-5-AGGGCCTTGATTTTCATCTTACTGACAGC-3-TAMRA	888-916

##### 4.9.1 Curva Padrão

As amostras controle de DENV-2, cepa 40247, utilizada nos experimentos, para a construção da curva padrão, foram cedidas por Bio-Manguinhos, onde foram previamente cultivadas em Vero e tituladas por plaqueamento, com o título de  $8,7 \times 10^6$  PFU/mL.

Para o preparo da curva padrão, foi aplicado o modelo descrito por Johnson e colaboradores (2004 e 2005), onde 1 RNA infeccioso corresponde a 1 PFU. Foram aplicados os cálculos, abaixo, para verificar a quantidade de RNA real utilizada na reação final:

Para 140 $\mu$ L, utilizado na Extração:

$$\begin{array}{l} 1000\mu\text{L} \text{-----} 8,7 \times 10^6 \text{ PFU/mL} \\ 140 \mu\text{L} \text{-----X} \end{array}$$

$X = 1,2 \times 10^6$  PFU/ mL, eluído em 60 uL de tampão de eluição (AVE)

Para 5  $\mu$ L, utilizado na Reação:

$$\begin{array}{l} 1,2 \times 10^6 \text{ PFU/ mL} \text{-----} 60 \text{ uL} \\ X \text{-----} 5 \text{ uL} \\ X = 1,0 \times 10^5 \text{ PFU/Reação} \end{array}$$

Foram realizadas diluições seriadas, 1:10, ( $10^5$ - $10^{-6}$ ) do RNA padrão viral, diluídos em tampão de diluição. Inicialmente foram utilizados todos os controles diluídos para determinar o limiar de detecção, onde foi possível visualizar a amplificação até a concentração de  $10^{-2}$ . Logo, foi estabelecido 5 pontos na curva padrão partindo da concentração inicial de  $10^4$  até  $10^0$ .

#### 4.9.2 Tampão de diluição para Curva Padrão

**Tabela 4.18. Reagentes utilizados para o tampão de diluição para a Curva Padrão**

Reagentes	Vol
Reaction Mix (Invitogen)	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O livre de nucleases (Promega)	890 $\mu$ l
RNaseOUT(Gibco)	10 $\mu$ l

#### 4.9.3 Metodologia da qRT-PCR em tempo real

A reação foi realizada conforme indicação do fabricante, com concentrações ideais dos iniciadores e sonda determinadas por ensaios de otimização. Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA), de 96 micropoços, primeiramente, foram adicionados 20  $\mu$ l da mistura, reagentes conforme a tabela 4.19, contendo os iniciadores, sonda, água e o kit SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR

(Invitogen Corporation, USA) em cada poço. Logo após, foram acrescentados 5µl do RNA extraído, obtendo assim um volume final de 25µl/ reação. Cada amostra e controles foram aplicados em triplicatas. Após a montagem da placa, coloca-se o filme, do inglês “Optical Adhesive Cover”, (PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA), na parte superior para selagem, logo em seguida é levada em centrífuga de placa, colocando na opção de “spin”. As placas foram colocadas na plataforma ABI PRISM 7500 e 7500 fast, para a reação de qRT-PCR em tempo real, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na tabela 4.20 e posterior coleta de dados e análise dos resultados.

**Tabela 4.19:** Reagentes utilizado na qRT-PCR em tempo real

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>	<b>µl/ tubo</b>
Reaction Mix(Invitrogen)	2X	12,5
H <sub>2</sub> O(Promega)	---	3,65
MgSO <sup>4</sup> (Invitogen)	5mM	1
Sonda DEN2-P(Sigma)	300nM	0,75
RNaseOUT(Gibco)	---	0,5
Primer DEN2-F(Sigma)	200nM	0,5
Primer DEN2-R(Sigma)	200nM	0,5
Super Script III RT/ Platinum Taq Mix (Invitogen)	---	0,5
ROX Reference Dye <sup>A</sup> (Invitogen)	50nM	0,1

**Tabela 4.20:** Parâmetros de ciclagem da qRT-PCR em tempo real

<b>Etapas</b>	<b>Temp</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclo</b>
RT	45° C	30 min	1 ciclo
Ativação da Enzima	95° C	10 min	1 ciclo
Desnaturação	95° C	15 seg	45 ciclos
Anelamento/Extensão	57° C	1 min	
Extensão final	72° C	1 min	1 ciclo
Temperatura final	25° C	9 min	-

#### **4.10. RT-PCR PARA A TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO**

O RNA viral extraído do soro foi amplificado em uma etapa única de acordo com protocolo descrito por dos Santos *et al.* (2002).

##### **4.10.1. Iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Araújo *et al.*, 2009d (Tabela 4.21) foram utilizados para a amplificação dos genes C/prM/M/E (iniciadores região 1 a 4) e do genoma completo (iniciadores região 1 a 15). Os iniciadores foram desenhados para amplificar fragmentos de aproximadamente 900 pares de base (pb), com regiões sobrepostas de aproximadamente 200 pb. Alternativamente, para o sequenciamento dos genes C/prM/M/E foram utilizados os iniciadores descritos por dos Santos *et al.*, 2002 (Tabela 4.22).



**Tabela 4.21:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos genes C/prM/M/E e do genoma completo dos DENV-2

<i>Iniciador Região</i>	<i>Primer sense A (5'- 3')</i>	<i>Primer antisense B (5'- 3')</i>	<i>Posição no genoma</i>	<i>Amplicon (pb)</i>
1	CGT GGA CCG ACA AAG ACA GA	GGA GCG ACG GCT GTC AGT AA	14 – 906	892
2	GAT CAG TGG CAC TCG TTC CA	CTC CGG GTAGCCATGGTAAC	708 – 1586	878
3	ATG GCA CTG TCA CGA TGG AG	CAC TAT CAG CCTGCACCATAGCT	1467 – 2405	938
4	GGA TCC CTG GGA GGA GTG TT	TCC ATT GCT CCA GAG GGT GT	2202 – 3106	904

**Tabela 4.22:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cDNA para amplificação dos fragmentos sobrepostos do gene C/prM/M/E dos DENV-2 (dos Santos *et al.*, 2002).

<i>Iniciador</i>	<i>Primer sense (5'- 3')</i>	<i>Primer antisense (5'- 3')</i>	<i>Posição no genoma</i>	<i>Amplicon (pb)</i>
<b>D2-1+ D2-2</b>	CAGATCTCTGATGAATAACCAACG	GGGGACACTTGTACGTGATTGT	87-601	514
<b>D2-3+ D2-4</b>	CAATCACGTACAAGTGTCCCCT	CAGTACTTCCTTAGGGTGGCA	581-1115	534
<b>D2-5+ D2-6</b>	CCTGCCACCCTMGGAAGTACT	GCAGGTCTAGGAACCATTGCCT	1093-1583	490
<b>D2-7 +D2-8</b>	GGTTCCTAGAACTGCCRT	CGGCTCTACTCCTATGATGAT	1571-2088	517
<b>D2-9+ D2-10</b>	GCCGGGACAATTGAAGCTCAA	GATYCCACAAATKCCCTCT	2085-2573	488

#### 4.10.2. Metodologia

Em um tubo tipo eppendorf foram adicionados 45 µL da mistura para a RT-PCR (Tabela 4.23) e acrescentados 5 µL de RNA extraído. Os tubos foram imediatamente colocados no bloco aquecido do termociclador (GeneAmp modelo 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para a realização da transcrição reversa e amplificação. As condições de termociclagem consistiram de um ciclo de transcrição reversa a 42<sup>0</sup> C por 60 min, seguido de quarenta ciclos de 30 seg a 94<sup>0</sup> C, 1 min a 63<sup>0</sup> C e 2 min a 72<sup>0</sup> C com uma extensão final de 10 min a 72<sup>0</sup> C.

**Tabela 4.23:** Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para amplificação do gene E e do genoma completo dos DENV-2.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume</b>
Água livre de nucleases (Promega Corporation, Madison, EUA)	14 µl
10 µM iniciador Sense ( Invitrogen, EUA)	2,5 µl
10 µM iniciador Antisense (Invitrogen, EUA)	2,5 µl
5 U/µl enzima AMV-RT (Promega Corporation, Madison, EUA)	1 µl
Accessquick Master Mix™ (2x) (Promega Corporation, Madison, EUA)	25 µl
Volume final	45µl

#### **4.10.3. Análise dos amplicons**

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese à 100Vpor 45 minutos onde 10µl do produto amplificado acrescido com 1µl de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) foi aplicado em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5 X, acrescido de brometo de etídio 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). Os amplicons foram visualizados em transiluminador com luz ultravioleta e a imagem foi registrada em capturador de imagens Biorad, EUA.

#### **4.10.4. Purificação de produto de PCR para reação de sequenciamento por extração em gel de agarose**

Na presença de mais de um amplicon na análise por eletroforese em gel de agarose, o amplicon de interesse foi cortado e foi realizada a purificação do DNA utilizando o kit QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Alemanha).

#### **4.10.4.a Metodologia**

O fragmento de DNA de interesse foi cortado do gel de agarose com lâmina limpa e pesado em um tubo incolor. Foram adicionados 3 volumes de Tampão QG para 1 volume de gel (100mg ~ 100 µL), ou seja, 300 µL para 100mg de gel. O fragmento foi incubado a 50°C por 10 minutos com agitações em vortex a cada 2- 3 minutos. Após a completa dissolução do gel, a coloração da mistura foi checada, tendo que estar com a coloração do Tampão QG (amarela). Caso a mistura estivesse laranja ou violeta, 10 µL de 3M acetato de sódio era adicionado. Foi adicionado 1 volume isopropanol e as colunas foram colocadas nos tubos de coleta. A suspensão foi transferida para a coluna e centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm em microcentrifuga. O eluído do tubo coletor foi descartado e 500 µL de tampão QG foi adicionado na coluna. Após centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, 750 µL de Tampão PE foram adicionados. Após nova centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm o eluído foi descartado. Após incubação de 2 a 5 minutos, nova centrifugação foi realizada. A coluna foi transferida para um microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado, e o DNA purificado foi eluído pela adição de 30 µL de água livre de RNases e DNases. Após centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, o DNA foi estocado a -20 °C até utilização.

#### **4.10.5. Purificação de produto de RT- PCR diretamente da reação de RT-PCR para reação de sequenciamento**

Caso o produto de amplificação da RT-PCR apresentasse apenas o amplicon de interesse, a purificação do DNA era realizado diretamente do produto de RT-PCR utilizando o kit comercial QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Alemanha).

##### **4.10.5.a. Metodologia**

Foram adicionados 5 volumes do Tampão PB a 1 volume da reação de PCR (250 µL de Tampão para 50 µL de reação e a mistura homogeneizada. A mistura foi transferida para a coluna e após centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, o eluído foi descartado. Foram adicionados 750 µL de Tampão PE a coluna e após centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm o eluído foi descartado e a coluna transferida para um microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL previamente numerado. O DNA foi eluído pela adição de 30 µL de água livre de RNases e DNases, incubação por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm. O DNA purificado foi estocado a -20 °C até utilização.

#### 4.10.6. Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA purificado (resultante de purificação direta do produto de PCR ou do gel-purificação), o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, EUA) a 2% em Tris-Ácido Bórico-EDTA TBE 1X corado com brometo de etídio por 40 minutos à 100V. No primeiro orifício do gel foi aplicando 4 µl do peso molecular de massa “Low Mass DNA” (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 4 µl do DNA a ser quantificado nos demais orifícios. Os amplicons foram visualizados em transiluminador com luz UV e a imagem foi registrada em capturador de imagens Biorad, EUA. A concentração do DNA foi estimada de acordo com a comparação com a concentração apresentada pelo peso molecular de massa.

#### 4.10.7. Reação de sequenciamento do DNA

Após quantificação os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados em ambos os sentidos utilizando o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit” (Applied Biosystems, EUA), Tabela 9. As condições de termociclagem consistiram de 30 ciclos de 96°C a 30 seg, 50° C a 1 min e 60°C por 4 min.

**Tabela 4.24:** Reagentes utilizados reação em cadeia pela polimerase (PCR) para sequenciamento do genes C/prM/M/E e do genoma completo dos DENV-2.

Reagentes	Volume
Água livre de nucleases (Promega Corporation, Madison, EUA)	20 µl q.s.p
3.2 pmol iniciador Sense ( Invitrogen, EUA)	2 µl
3.2 pmol iniciador Antisense (Invitrogen, EUA)	2 µl
BigDye Terminator Versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA)	1 µl
DNA purificado	2-8 µl (dependente da concentração)

#### **4.10.8. Purificação e precipitação de DNA para remoção de “dye terminators” não incorporados**

Após a reação de sequenciamento, o DNA foi purificado utilizando colunas Centri-Sep (Princeton Separations, EUA).

##### **4.10.8.a Metodologia**

Inicialmente foi realizada a hidratação da coluna. Após remoção da tampa superior da coluna, foram adicionados 800 µL de água livre de RNases e DNases. Após homogeneizar por inversão, as colunas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente (entre 20-25 °C). Após incubação, as tampas superior e inferior da coluna foram removidas. O eluído foi descartado e a coluna foi centrifugada a 3000 rpm. A coluna foi posteriormente transferida para um microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL, previamente identificado e o todo o volume da reação de sequenciamento transferido para a coluna. Após centrifugação por 2 minutos a 3000 rpm, a coluna foi descartada e o DNA purificado foi seco a 37°C por 18 horas. O DNA foi ressuspenso em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems P/N 4311320) e após aquecimento por 2 minutos a 95 °C, o DNA foi mantido em banho de gelo até que fosse aplicado na placa para seqüenciamento. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático Applied Biosystems Prism 3100 (Perkin-Elmer, Applied biosystems, Foster City, CA) da Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

##### **4.10.9. Análise filogenética**

A análise dos eletroferogramas gerados foi realizada utilizando o Programa Chromas versão 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>). O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o Programa CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o Programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Foi estipulado um “bootstrap” de 1000 pseudoréplicas utilizado o método

“Neighbor-joining”, modelo Tamura Nei. Para a análise filogenética individual dos genes foi utilizado o modelo “Maximum likelihood (ML)”.

#### **4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Foram utilizados os testes estatísticos Análise de Variância (ANOVA), teste- t e qui-quadrado, com erro máximo adotado para os testes de  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ). O programa estatístico utilizado no processamento e análise dos dados foi o SPSS-PC versão 18.

#### **4.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

As amostras de soro e vírus isolados utilizados neste estudo provêm da demanda espontânea do Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue e Febre Amarela, armazenados, a  $-70^{\circ}\text{C}$ , após a realização de testes diagnósticos. O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 274/05) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, sendo aprovado pela resolução CSN196/96.

## 5. RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 102 soros de casos de DENV-2, confirmados previamente pelos métodos de isolamento viral e/ou RT-PCR. As amostras compreenderam dois períodos distintos, 1990-2002, quando havia a circulação de apenas uma linhagem de DENV-2 (linhagem I) e o período de 2007-2011, quando foi identificada a introdução de uma segunda linhagem (II) de DENV-2.

As idades variaram de 1 à 88 anos e em relação ao sexo, 49% (50/102) eram homens e 51% (52/102) mulheres.

Através da detecção de anticorpos da classe IgG anti-DENV e do MAC-ELISA, os 102 casos estudados tiveram sorologia indicativa de infecção primária em 29,4% (30/102) e secundária em 70,6% (72/102) dos casos.

Do total de casos estudados, 39 (38%) foram classificados como dengue grave e 63 (62%) como dengue, segundo a classificação do DENCO (OMS, 2009) e conforme apresentados nas tabelas 5.1. e 5.2.

**Tabela 5.1:** Definição dos casos graves de DENV-2 de acordo com apresentação clínica/ evolução

<b>Sinais e Sintomas</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
Óbitos	21	53,8
Choque	6	15,4
Hipotensão	4	10,2
Alteração do SNC	2	5,1
Síndrome respiratória	1	2,5
Hemorragias graves	5	12,8
Total	39	

**Tabela 5.2:** Definição dos casos de DENV-2 de acordo com seus sinais e sintomas

<b>Sinais e Sintomas</b>	<b><i>n</i></b>	<b>%</b>
Cefaléia	48	76,2
Febre	46	73,0
Mialgia	44	69,8
Prostração	29	46,0

Dor Retro-Orbitária	28	44,4
Artralgia	27	42,8
Náuseas/Vômito	24	38,1
Anorexia	22	34,9
Astenia	20	31,7
Exantema	13	20,6
Lombalgia	13	20,6
Diarréia	11	17,5
Parestesia	02	3,2
Edema	01	1,6
Prurido	01	1,6
<b>Total</b>	<b>63 casos</b>	

### 5.1 Avaliação das diferentes metodologias na confirmação dos casos estudados

O RNA viral foi detectado pelo método de qRT-PCR em tempo real em todas as amostras testadas. Com o objetivo de comparar os resultados obtidos no qRT-PCR em tempo real em termos de positividade e período de detecção, quatro métodos de diagnóstico de dengue foram utilizados nas amostras que apresentassem volume suficiente. Os métodos escolhidos foram: captura de antígeno NS1, captura de anticorpos IgM, detecção de anticorpos IgG, isolamento viral, RT-PCR e qRT-PCR em tempo real. O teste de captura de antígeno NS1 confirmou 75,5% (74/98) dos casos estudados de 0 à 7 dias. A técnica de captura de IgM confirmou 40,2%(41/102), já a técnica de detecção de IgG detectou 74,5%(76/102), o isolamento viral em cultura de células C6/36, 68,3% (56/82) e a técnica de RT-PCR 89,6% (78/87) dos casos. O qRT-PCR foi capaz de detectar vírus durante toda a fase aguda da doença.

O NS1 foi o método que apresentou melhor sensibilidade na confirmação dos casos de dengue independente de ser dengue ou dengue grave. Foi interessante observar que alguns métodos apresentaram um melhor desempenho nos casos de dengue do que dengue grave, como pode ser visto no isolamento viral, que teve maior taxa de isolamento nos casos de dengue do que os casos de dengue grave. Também notamos que o teste captura de IgM confirmou mais casos de dengue grave do que de dengue. Já a técnica de qRT-PCR foi capaz de detectar 100% tanto dos casos de dengue como os casos de dengue grave.

Os percentuais de confirmação da infecção por dengue por diferentes metodologias e classificação clínica dos casos estão presentes na tabela 5.3.



Na tabela 5.4. observa-se a positividade de acordo com o dia de obtenção das amostras.

**Tabela 5.3:** Resultados das amostras dos casos segundo a classificação clínica e o diagnóstico laboratorial

<b>Técnica de Diagnóstico</b>	<b>Dengue grave</b>	<b>Dengue</b>
IgG	69,2%(27/39)	71,4% (45/63)
IgM	41,0%(16/39)	28,6% (18/63)
NS1	82,0%(32/39)	71,2% (42/59)
ISOL	61,3%(19/31)	72,5% (37/51)
RT-PCR	96,1% (25/26)	86,9% (53/61)
qRT-PCR	100%(39/39)	100% (63/63)

**Tabela 5.4** Amostras positivas para DENV-2 de acordo com o teste diagnóstico e positividade em relação ao dia de início de sintomas.

<b>Dia</b>	<b>IgG</b>	<b>IgM</b>	<b>NS1</b>	<b>ISOL</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>qRT-PCR</b>
0	100%(01/01)	100%(01/01)	100%(01/01)	0% (0/1)	100%(01/01)	100%(01/01)
1	83,3%(20/24)	16,6%(4/24)	65,4%(15/23)	76,1%(10/14)	98,7% (17/18)	100%(24/24)
2	44,0% (11/25)	56,0% (14/25)	75% (18/24)	91,3%(21/23)	76,2% (16/21)	100%(25/25)
3	88,2% (15/17)	29,4%(5/17)	75%(12/16)	57,1%(8/14)	87,5%(14/16)	100%(17/17)
4	88,2% (15/17)	41,1%(7/17)	87,5%(14/16)	78,6%(11/14)	100% (15/15)	100%(17/17)
5	55,5% ( 5/9)	44,4%(4/9)	88,8% (8/9)	55,5%(3/7)	100%(8/8)	100%(9/9)
6	60,0%(3/5)	60,0%(3/5)	92%(4/5)	58,4%(2/5)	75%(3/4)	100%(5/5)
7	50,0%(2/4)	75%(3/4)	68,7% (2/4)	42,2%(1/4)	100%(4/4)	100%(4/4)
<b>Total</b>	74,5%(76/102)	40,2%(41/102)	75,5%(74/98)	68,3%(56/82)	89,6%(78/87)	100%(102/102)

## 5.2 Teste de Especificidade do protocolo de qRT-PCR descrito por Poersch et al. (2005)

Para o teste de especificidade foram utilizadas amostras de DENV-1, DENV-3, DENV-4 e o vírus da Febre Amarela. O qRT-PCR apresentou uma especificidade de 100% para o DENV-2, Tabela 5.5.

**Tabela 5.5 Teste de especificidade do protocolo do qRT-PCR em tempo real para a detecção de DENV-2.**

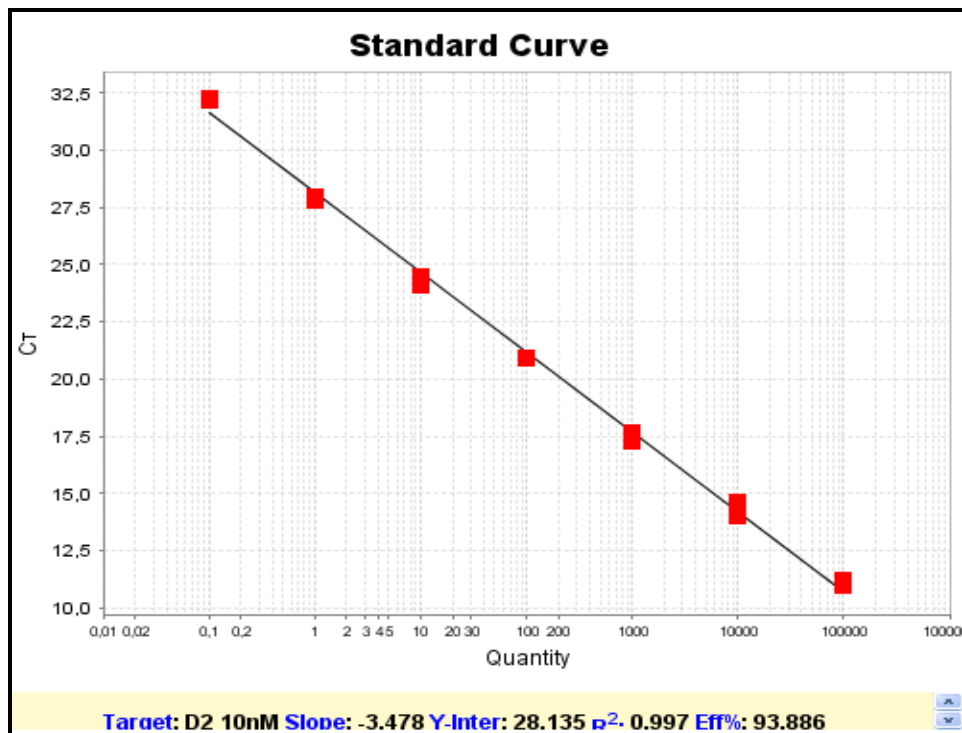
<b>Vírus</b>	<b>Positividade</b>
DENV-1	0% (0/3)
DENV-2	100% (102/102)
DENV-3	0% (0/3)
DENV-4	0% (0/3)
FA	0% (0/3)

### **5.3 Curva padrão**

Para a preparação da curva padrão foi aplicado o modelo descrito por Johnson e colaboradores (2004 e 2005). Inicialmente obteve-se um controle de RNA quantificado com base nos títulos obtidos por PFU, considerando que uma molécula de RNA infeccioso corresponde a um PFU. Contudo para o qRT-PCR em tempo real, além do RNA infeccioso, é quantificado o RNA não-infeccioso, produzido durante o processo de replicação viral e não incorporado aos novos virions. Estudo realizado por Linen et al. (2008), estima que 1 PFU corresponde a 300 cópias de RNA.

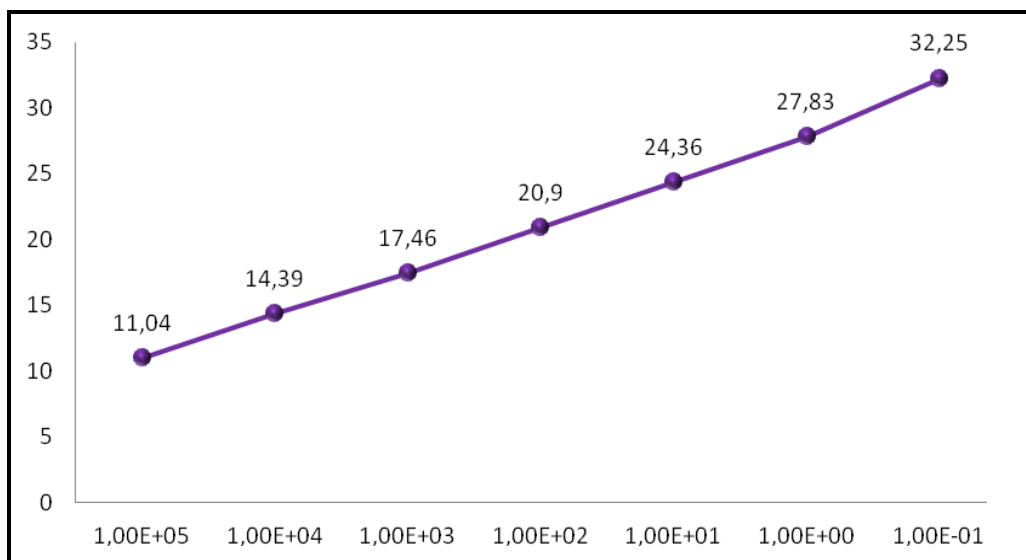
Na tentativa de obtenção de um controle de RNA foram realizadas quantificações de RNA viral utilizando-se um espectrofotômetro, aparelho Picodrop®. Contudo, os níveis de RNA obtidos foram discrepantes quando correlacionado com a diluição da curva padrão. Dessa forma mantivemos a metodologia descrita por Johnson e colaboradores (2004 e 2005).

A curva apresentou os seguintes parâmetros: coeficiente angular da reta (Slope) = -3,478 e  $R^2$  (Coeficiente de determinação da reta)= 0,997. A eficiência da reação alcançou 93,9% (Figura 5.1).



**Figura 5.1** Curva padrão da qRT-PCR em tempo real utilizando diluições seriadas de fator 10 do RNA padrão equivalentes às concentrações de 0,1 a 10<sup>05</sup>

O perfil de amplificação da curva foi dado pelo Ct crescente correlacionado com a concentração decrescentado RNA padrão viral, demonstrado pela figura 5.2.



**Figura 5.2** Perfil de amplificação da curva padrão analisando a relação de concentração de RNA padrão com o Ct.

#### 5.4 Carga viral em relação aos dias de início da doença e apresentação clínica

Quando comparado os dias de doença e a carga viral, no total de 102 casos, não foi possível determinar uma relação significativa entre estas duas variáveis, figura 5.3. No entanto, quando correlacionamos dias de doença com a classificação final do caso segundo a evolução clínica houve uma relação significativa no 5° e 6° dias de doença ( $p = 0,04$  para o 5° dia e  $p = 0,01$  para o 6° dia de doença), tabela 5.6.

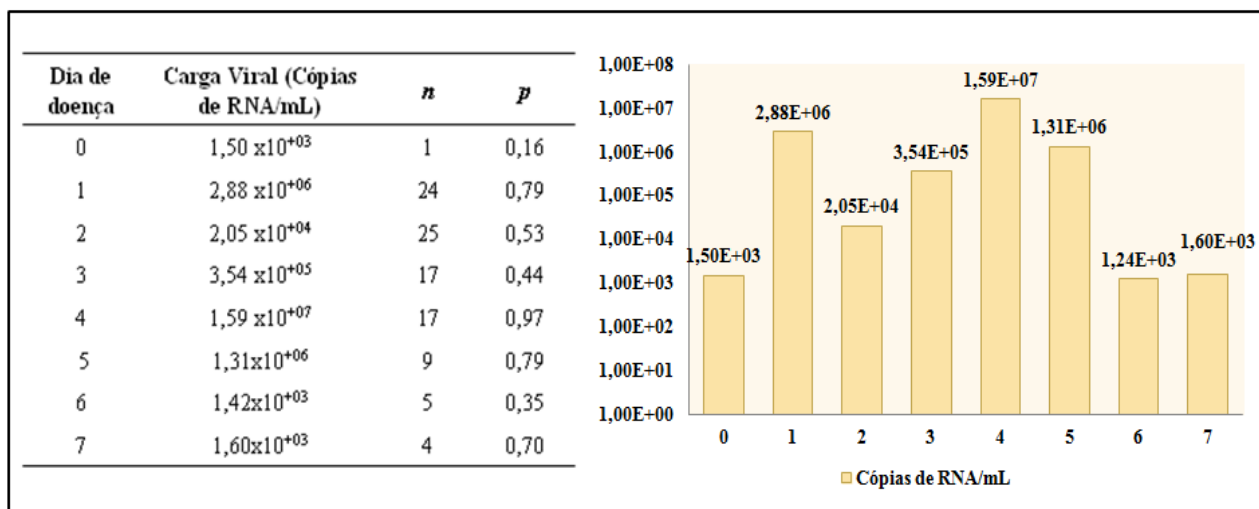


Figura 5.3: Relação do dia de doença com a carga viral.

Tabela 5.6: Relação do dia do início de doença com a classificação final do caso segundo evolução clínica

Dias de doença	Classificação	<i>p</i>
0	Dengue Grave (2)	-
1	Dengue Grave (8) e Dengue (16)	0,40
2	Dengue Grave (5) e Dengue (20)	0,48
3	Dengue Grave (5) e Dengue (12)	0,48
4	Dengue Grave (8) e Dengue (9)	0,16
5	Dengue Grave (6) e Dengue (3)	<b>0,04</b>
6	Dengue Grave (4) Dengue (1)	<b>0,01</b>
7	Dengue Grave (2) e Dengue (2)	0,43

### 5.5. Relação da variável idade com a carga viral

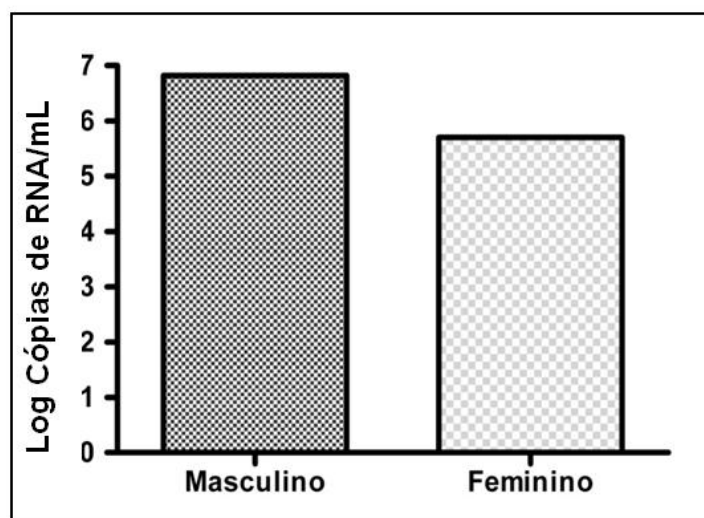
Pela distribuição da quantificação da carga viral por faixa etária dos casos estudados utilizando-se um intervalo de 5 anos, observou-se um aumento da carga viral na idade acima dos 11 anos, embora não tenha sido observado significância estatística ( $p=0,16$ ), tabela 5.7

**Tabela 5.7: Relação da variável idade com a carga viral**

<b>Idade</b>	<b><i>n</i></b>	<b>Carga Viral (cópias de RNA/mL)</b>
0-5 anos	2	$5,86 \times 10^{01}$
06-10 anos	5	$9,10 \times 10^{02}$
11-15 anos	11	$5,88 \times 10^{05}$
16-20 anos	8	$2,24 \times 10^{05}$
21-30 anos	12	$5,40 \times 10^{05}$
31-40 anos	19	$3,28 \times 10^{05}$
41-50 anos	13	$2,48 \times 10^{07}$
acima de 51 anos	15	$2,03 \times 10^{05}$

### 5.6. Relação da variável sexo com a carga viral

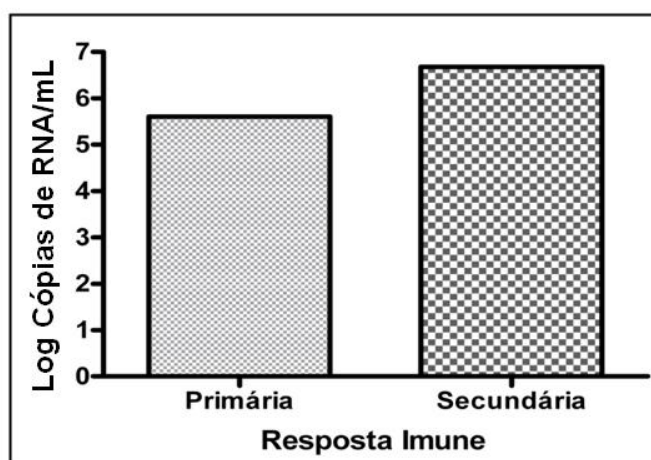
Não foi observada uma relação entre o sexo dos pacientes com a carga viral quantificada ( $p =0,09$ ). O sexo masculino apresentou  $6,63 \times 10^{06}$  cópias de RNA/mL para  $5,00 \times 10^{05}$  cópias de RNA/mL do sexo feminino, figura 5.5.



**Figura 5.4: Relação da variável sexo com a carga viral.**

### 5.7 Relação da resposta imune com a carga viral

Embora a carga viral presente nas respostas secundárias ( $4,80 \times 10^6$  cópias de RNA/mL) tenha sido dez vezes maior do à observada na resposta primária ( $4,06 \times 10^5$  cópias de RNA/mL), não houve diferenças estatísticas entre elas ( $p = 0,105$ ), figura 5.5.



**Figura 5.5: Resposta imune em casos confirmados de DENV-2 relacionado com a carga viral.**

### 5.8. Relação carga viral e a evolução clínica: Dengue e Dengue grave

Embora a carga viral dos casos de dengue grave ( $8,78 \times 10^6$  cópias de RNA/mL) tenha sido maior do que a carga viral dos casos de dengue ( $2,48 \times 10^5$  cópias de RNA/mL),

não houve diferenças estatísticas entre a quantificação da carga viral e as formas clínicas ( $p=0,16$ ) (figura 5.6).

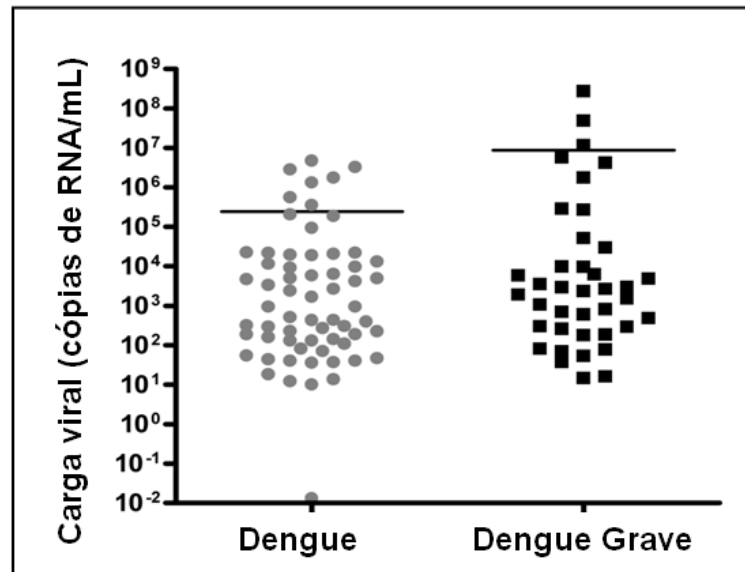


Figura 5.6: Classificação dos casos estudados relacionado com a carga viral.

### 5.9. Relação da Linhagem com a carga viral

Quando estudamos as amostras separadas por período, ou seja, período I amostras de 1990 a 2002 (Linhagem I) e período II amostras de 2007-2011(Linhagem II), foi possível identificar uma carga viral maior nas amostras do segundo período o que coincide com o período em que foi detectada a circulação da linhagem II de DENV-2 (carga viral de  $7,10 \times 10^6$  cópias de RNA/mL) quando comparado com os resultados das amostras do período I, em que havia a circulação predominante da linhagem I (carga viral de  $4,70 \times 10^4$  cópias de RNA/mL) ( $p=0,001$ ) (Figura 5.7).

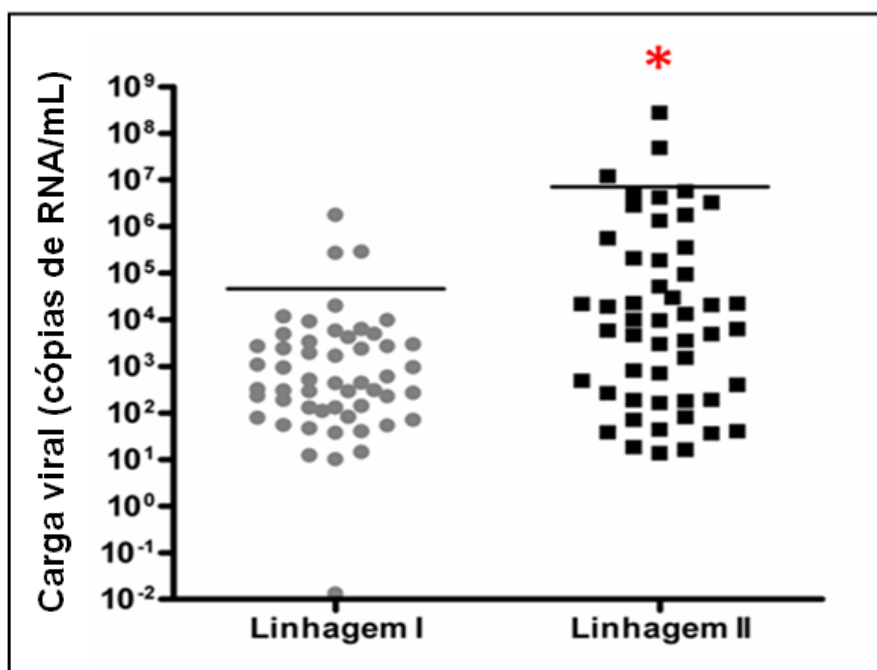


Figura 5.7 Linhagens dos casos estudados relacionado com a carga viral

### 5.10. Análise dos casos da Linhagem I

A correlação entre classificação da doença com a carga viral, das amostras que pertencem a ao período de circulação da Linhagem I, não apresentou diferenças significativas entre estes grupos, da mesma forma ocorreu com a resposta imune deste grupo. (tabela 5.8)

Tabela 5.8. Análise das variáveis pertencentes aos casos da linhagem I

Classificação	Carga Viral			Resposta Imune	Carga Viral		
	(cópias de RNA/mL)	<i>p</i>	<i>n</i>		(cópias de RNA/mL)	<i>p</i>	<i>n</i>
Dengue	$5,0 \times 10^4$	0,140	37	Primária	$2,2 \times 10^3$	0,530	12
				Secundário	$7,2 \times 10^4$		25
Dengue Grave	$3,9 \times 10^4$	0,140	15	Primária	$4,6 \times 10^2$	0,140	05
				Secundário	$5,7 \times 10^4$		10



### 5.11. Análise dos casos da Linhagem II

Na correlação da classificação da doença com a carga viral das amostras que correspondiam ao período de circulação da linhagem II, foi possível observar que as amostras dos casos classificados como dengue grave, apresentaram uma carga viral maior do que as amostras dos casos de dengue. Porém, quando correlacionamos cada grupo, separadamente, com a resposta imune, não foi possível visualizar diferenças estatísticas entre elas. (tabela 5.9)

**Tabela 5.9 Análise das variáveis pertencentes aos casos da linhagem II**

Classificação	Carga Viral			Resposta Imune	Carga Viral		
	(cópias de RNA/mL)	<i>p</i>	<i>n</i>		(cópias de RNA/mL)	<i>p</i>	<i>n</i>
Dengue	5,2x10 <sup>05</sup>	0,242	26	Primária	0,910	6,7x10 <sup>04</sup>	06
				Secundário		6,5x10 <sup>05</sup>	20
Dengue Grave	1,4x10 <sup>07</sup>	<b>0,001</b>	24	Primária	0,280	1,7x10 <sup>06</sup>	07
				Secundário		1,9x10 <sup>07</sup>	17

### 5.12. Análise dos casos do período de circulação da Linhagem II e a sua relação entre a Resposta Imune e a Classificação da doença

Através da análise de variância foi possível identificar que o aumento da carga viral, dos casos graves, está diretamente relacionado ao período de circulação da Linhagem II, não apresentando interferência da variável resposta imune (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10 Análise de variância aplicada aos casos graves da linhagem II**

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	<i>p</i>
Entre todos os grupos	23,925	3	7,975	2,496	<b>0,006</b>
Resposta Imune	0,600	1	0,600	0,188	0,578

Linhagem	22,177	1	22,177	6,940	<b>0,001</b>
Interação	1,148	1	1,148	0,359	0,442
Dentro (erro)	111,236	58	1,918		
Total	135,161	61			

### 5.13. Relação entre a Densidade Ótica (DO) do teste de Captura do antígeno NS1 com a gravidade da doença

Quando correlacionamos a DO do NS1 com a apresentação clínica não encontramos diferenças entre amostras dos dois grupos (dengue e dengue grave), tabela 5.11. O mesmo resultado foi encontrado quando correlacionamos com as duas linhagens (Tabela 5.12.).

**Tabela 5.11 Análise da relação da DO com a Apresentação Clínica**

Classificação	Média da DO	Mediana	n
Dengue Grave	3,48	2,89	37
Dengue	3,49	3,36	59

**Tabela 5.12 Análise da relação da DO com a Linhagem**

Linhagem	Média da DO	Mediana	n
Linhagem I	3,54	3,40	47
Linhagem II	3,53	2,62	49

### 5.14. Análise Filogenética dos grupos estudados

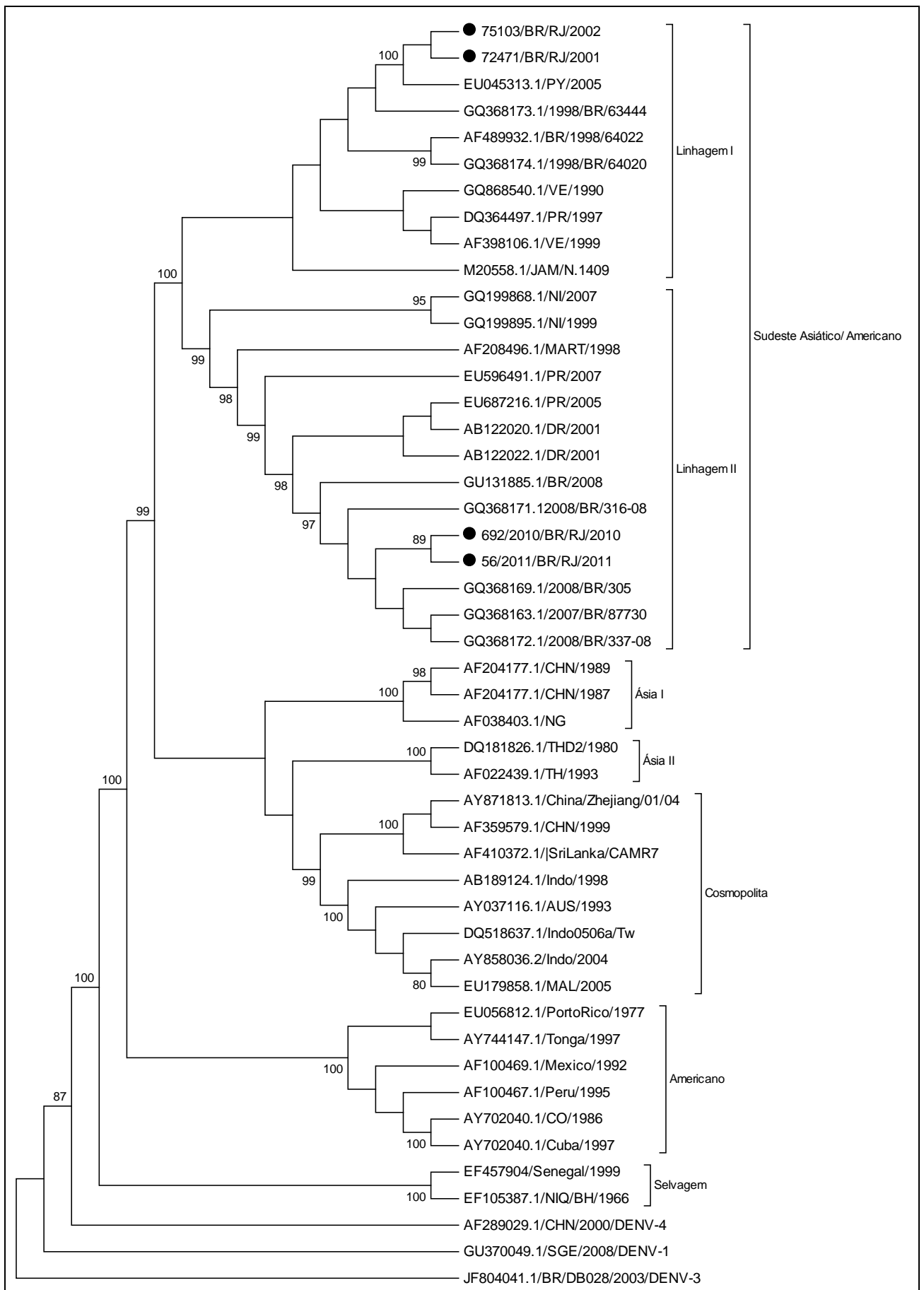
Com o intuito de confirmar que os casos estudados eram de períodos correspondentes a cada linhagem, foi realizado o sequenciamento da região do envelope de

duas amostras de cada grupo, ou seja, analisamos as sequências de casos de dengue e dengue grave de 2001-2002 e 2010- 2011 (tabela 5.13).

**Tabela 5.13 Casos utilizados para o sequenciamento na confirmação das linhagens**

<b>Registro</b>	<b>Ano</b>	<b>Classificação</b>	<b>GenBank (NCBI)</b>
72471	2001	Dengue Grave	JQ710659
75103	2002	Dengue	HQ012522-1
692/2010	2010	Dengue Grave	JQ710658
056/2011	2011	Dengue	JQ710657

Através da análise filogenética, foi confirmada a presença de duas linhagens distintas nos períodos de 1990-2002 e 2007- 2011, figura 5.9.



**Figura 5.9** Árvore Filogenética dos grupos estudados.

## 6. DISCUSSÃO

Desde a introdução do DENV no Brasil em 1982, mais de sete milhões de casos da doença já foram notificados e nas últimas duas décadas o Brasil tem sido responsável por mais de 60% do total dos casos de dengue notificados do continente Americano (PAHO 2008, San Martín *et al.*, 2010, SVS, 2011).

Particularizando o estado do Rio de Janeiro, nos últimos 20 anos, o estado foi marcado por extensas epidemias e as primeiras notificações de casos de dengue hemorrágico e de óbitos se deu em 1990, poucos meses depois do isolamento do primeiro caso de DENV-2 em abril daquele ano.

Após a introdução do DENV-2 seguiu-se uma epidemia no ano 1990-1991, e duas outras epidemias associadas a este mesmo sorotipo ocorreram em 1998 e 2008. Embora o DENV-2 tivesse um papel importante na epidemiologia de dengue para o país, acrescido ao fato de que ocorreu após a epidemia de DENV-3, a epidemia de 2008 foi considerada a mais grave do país, não apenas em número de casos notificados, como também em número de casos graves e fatais (Teixeira *et al.*, 2009; SVS, 2009).

Naquele ano, somente o estado do Rio de Janeiro foi responsável pela notificação de 255.818 casos de dengue e taxa de letalidade duas vezes maior do que a registrada durante a epidemia de DENV-3 (SVS, 2009). Durante a epidemia de DENV-2 observou-se, também, a diminuição da faixa etária para menores de 15 anos.

A análise filogenética das cepas de DENV-2 isoladas durante as epidemias de 1990, 1998 e 2008 no estado do Rio de Janeiro, demonstrou que apesar de pertencerem ao mesmo genótipo (Americano/Asiático), os vírus isolados a partir de 2007 eram geneticamente distintos e, agrupados em uma nova linhagem diferente dos vírus isolados nos anos de 1990 e 1998. Esses achados indicaram a emergência de uma nova linhagem de DENV-2 no estado (Oliveira *et al.*, 2010). A extensão deste estudo com amostras de DENV-2 representativas do Brasil durante os últimos 20 anos foram corroborados por Faria (2011).

Neste novo cenário, alguns fatores foram determinantes para o desenvolvimento deste estudo: i) a gravidade da epidemia de DENV-2 em 2007-2008; ii) a identificação de uma nova linhagem de DENV-2 a partir de 2007 ; iii) a teoria descrita por Rosen (1997)

de que a evolução genética do vírus dentro de cada sorotipo pudesse dar origem a cepas epidêmicas ou mais virulentas sendo essas responsáveis pelo aparecimento de formas mais graves de dengue; iv) a teoria da infecção sequencias proposta por Halstead (1970) que postula que infecções sequenciais heterotípicas resultariam em quadros mais graves pelo aumento da infecção facilitada pelo anticorpo e patologia vascular; v) a inexistência até a presente data de estudos realizados comparando viremia produzida por linhagens distintas dentro de um mesmo genótipo e a sua associação com a gravidade da doença.

Varias teorias tentam explicar a ocorrência de casos graves de dengue e duas delas são mais amplamente discutidas: a teoria relacionada à virulência de amostras (Rosen, 1977) e a teoria das infecções sequenciais (Halstead, 1970). Rosen (1977 e 1986) postula que a virulência pode variar de uma cepa para outra, em cada um dos sorotipos, e que a gravidade era explicada pela virulência destas linhagens, mas não correlaciona este fator com aspectos imunológicos do hospedeiro. Ambas as teorias predizem o aumento da replicação viral em pacientes com a forma mais grave da doença e a ocorrência de elevados níveis de viremia, seja por características virais ou do hospedeiro.

Considerando a gravidade da epidemia de DENV-2 em 2008 e baseado nos pontos condutores previamente citados, o objetivo principal desse projeto foi investigar se a linhagem de DENV-2 introduzida no país a partir de 2007 pode ter contribuído para este perfil epidemiológico de maior gravidade. Neste contexto, o método de qRT-PCR em tempo real foi utilizado para determinar a carga viral produzida pelas duas cepas de DENV-2 (classificadas como linhagem I e II) circulantes em períodos distintos no estado do Rio de Janeiro e, correlacioná-las com a gravidade da doença. Também foram comparadas as variáveis: resposta imune, idade, sexo e dias de doença.

## **6.1. Gravidade x Viremia**

Diversos estudos têm buscado identificar padrões clínico-epidemiológicos e laboratoriais preditivos de gravidade da dengue, correlacionando-os com níveis de viremia (Vaughn *et al.*, 1999 e 2000; Sudiro *et al.*, 2001; Murgue *et al.*, 2000; Nisalak *et al.*, 2003; Endy *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2008; Araújo *et al.*, 2009c; Thai *et al.*, 2010; Fried *et al.*, 2010; Tricou *et al.*, 2011)

Na literatura os primeiros trabalhos onde se procurou estabelecer o papel da viremia durante as infecções causada pelos virus dengue foram realizados na década de 70 durante

epidemias ocorridas nos anos de 1975 e 1978 em Jakarta, na Indonésia por Gubler *et al.* (1981), analisando a viremia causada pelos sorotipos 1, 2 e 3 em 153 pacientes. Naquela época foram utilizados métodos clássicos de inoculação em mosquitos. Embora os autores tivessem observado que títulos variavam desde níveis não detectáveis à  $10^8$  MID<sub>50</sub>/ml não ficou estabelecida a relação entre viremia e gravidade da doença. (Gubler *et al.* 1981 apud Araújo, 2006).

Estudos de quantificação viral do dengue realizados por Vaughn *et al.* (1999, 2000), Wang *et al.* (2003), Araújo *et al.*, (2009c), entre outros, evidenciaram uma correlação entre quantidade de partículas virais e gravidade da doença.

No entanto, este é o primeiro trabalho onde se associa título de viremia produzido por linhagens distintas, dentro de um mesmo genótipo, com a gravidade da doença.

Quando quantificamos as amostras de soro provenientes de casos graves de DENV-2 do período de 2007 a 2011 (linhagem II) verificamos que estes apresentaram uma carga viral maior do que a dos casos graves do período anterior, 1990-2002 (linhagem I).

Nossos resultados estão de acordo com os descritos por OhAinle *et al.*, 2011, em um estudo conduzido na Nicarágua em que foi observado que o aumento na gravidade dos casos de dengue coincidia com a introdução da nova linhagem de DENV-2 no país.

## **6.2. Resposta imune x Viremia**

Halstead (1970) propõe que os casos de FHD/SCD ocorreriam em pacientes que têm anticorpos presentes de uma infecção por outro sorotipo, que formam imunocomplexos com o vírus infectante, facilitando a endocitose viral, seguido da replicação.

Neste contexto diversos estudos tem associado infecções secundárias com o aumento do risco de FHD/SCD (Sangkawibha *et al.*, 1984; Thein *et al.*, 1997) no entanto, na nossa casuística não foi possível identificar esta correlação.

Zagne *et al.*, 1994 estudando 56 casos de FHD/SCD em Niterói demonstrou que 55/56 foram classificados como infecção do tipo secundária.

Em 2003, Nisalak *et al.* concluiu que infecções do tipo secundária apresenta um risco de cinco vezes maior para a ocorrência de FHD do que em infecção primária.

Embora Vaughn *et al.*, (1999, 2000), Thomas *et al.*, (2008), e Tricou *et al.*, (2011) tenham observado uma maior viremia nas amostras provenientes de casos de infecção sequencial, nesse estudo os níveis de viremia das infecções primárias e secundárias não tiveram diferenças significativas ( $p= 0,105$ ) quando comparamos os resultados das quantificações das duas linhagens (Fig 5.5)

Embora a literatura sugira a ocorrência de quadros graves de dengue com infecções sequenciais de DENV-2 nesta casuística isso não foi observado e a presença de anticorpos contra os sorotipos do vírus do tipo 1 ou 3 já circulantes amplamente no Rio de Janeiro não induziu um maior nível de viremia nos casos com imunidade prévia a um desses dois sorotipos.

Dessa forma nossos achados discordam do que foi observado pelo grupo de OhAinle, 2011 em que descrevem maior gravidade em crianças com imunidade prévia a DENV-3 quando estas foram infectadas pelo DENV-2. Além disso, eles também observaram a correlação de gravidade e virulência nos casos que eram imunes a DENV-1 quando estes foram infectados pelo DENV-2 que circulava anteriormente.

No entanto, Wang *et al.*, (2003) em Taiwan e Sudiro *et al.*, (2001) em crianças na Tailândia obtiveram resultados similares aos nossos, não evidenciando nenhuma relação entre a resposta imune com a gravidade da doença.

Murgue *et al.*, (2000) realizaram um estudo prospectivo com crianças infectadas com DENV-2, na Polinesia Francesa durante um surto de DENV-2 e não encontraram associação significativa entre carga viral e duração da viremia. Da mesma forma não observaram relação entre resposta imune do tipo primária e secundária com a gravidade.

Estudos posteriores realizados por Wang *et al.*, (2006) associaram a diminuição da carga viral com os casos de FHD, sugerindo que há um aumento na taxa de “clearance” viral, confirmado pelo aumento de anticorpos IgG e IgM nestes pacientes.

Vários estudos foram realizados associando sorotipo infectante com a gravidade da doença como, por exemplo, o realizado em 2010 na Tailândia por Fried *et al.* em crianças de 6 meses a 15 anos, durante um período de 12 anos de infecção por dengue, demonstraram uma associação do DENV-2 e DENV-3 com a FHD quando comparados com os sorotipo 4.

Araújo *et al.*, 2009c observaram que a carga viral encontrada em casos graves e óbitos ( $\log_{10}$  12,5 cópias de RNA/mL) por DENV-3 era maior que a encontrada nos casos não fatais ( $\log_{10}$  7,9 cópias de RNA/mL). A correlação entre o tipo de infecção (primária



ou secundária) e os níveis de RNA viral nos casos não fatais, a média dos níveis de RNA foi significativamente maior em casos classificados como infecção primária em comparação aos casos com infecção secundária. Os autores concluíram que uma rápida ativação da resposta imune nos casos classificados como infecção secundária e conseqüente diminuição da viremia.

Somente após a introdução do DENV-2 (genótipo Asiático) no Rio de Janeiro em 1990, é que casos graves e óbitos começaram a ser notificado, esse número aumentou com a introdução do DENV-3, no entanto após a introdução da nova linhagem de DENV-2 (linhagem II) é que se observou o aumento 2 vezes maior na taxa de letalidade por dengue no estado. A seqüência do sorotipo infectante DENV-3/DENV-2 pode ter contribuído para a seleção desta nova linhagem, como parte do processo evolutivo dos vírus dengue que pode resultar no estabelecimento das cepas mais virulentas.

Por outro lado, não podemos descartar que o aumento na taxa de letalidade tenha sido um reflexo em parte do colapso dos serviços de saúde pública pelo grande número de casos ocorridos durante aquela epidemia, entretanto a virulência da amostra deve ter contribuído.

### **6.3. Idade x Viremia**

De acordo com um estudo realizado em Cuba (Guzmán *et al.*, 2002), o risco de uma criança morrer durante uma infecção secundária pelo vírus dengue sorotipo 2 é aproximadamente 15 vezes maior que o risco em adultos. Esses resultados demonstram que a idade é uma importante variável nas infecções secundárias.

Por outro lado, o aumento da gravidade em maiores de 65 anos foi descrita por García-Rivera e Rigau-Pérez (2003) em Porto Rico, demonstrando que idosos possuem 6 vezes mais risco de óbito que adultos-jovens e quase 2 vezes mais que lactentes.

Devido a mudança no perfil epidemiológico da epidemia de 2008, com mudança da faixa etária de adultos jovens para menores de 15 anos (Teixeira *et al.*, 2009), investigamos se poderia haver alguma correlação entre idade e carga viral.

Embora não significativos foi possível identificar um aumento da carga viral em indivíduos na faixa etária acima de 11 anos observando-se uma média de  $5,88 \times 10^5$ .

Crianças até 10 anos de idade apresentaram uma média de  $4,84 \times 10^2$  cópias de RNA/mL. Por outro lado pacientes de 11 a 88 anos apresentaram carga viral mínima de  $2,03 \times 10^5$  e máxima  $2,48 \times 10^7$  cópias de RNA/mL.

Wang *et al.*, (2003) em estudos realizados com 20 pacientes, com idades compreendidas entre 23 a 70 anos, não observaram diferenças entre os níveis de RNA plasmático e a idade, no entanto os autores consideram que o *n* amostral fosse pequeno e pudesse ter influenciado nos resultados desse estudo.

Em 2008, Thomas *et al.* utilizou 175 pacientes acima de 15 anos, provenientes da Martinica, e da mesma forma não evidenciaram nenhuma relação entre a idade e a gravidade da doença. Estes achados estão de acordo com os nossos resultados e os descritos por Wang *et al.*, (2003).

Hammond *et al.*, (2005), estudando uma população de 3.173 casos suspeitos de dengue na Nicarágua, composta de crianças e adultos, identificaram infecções secundárias como fator de risco de FHD em crianças, mas não em adultos, sugerindo um padrão de doença com caráter diferente entre adultos e crianças.

Whitehorn e Simmons, 2011 relatam que a idade é um fator importante para dengue grave e óbito, e que crianças vietnamitas de 1-5 anos tinham quatro vezes mais chance do que no grupo de 11-15 anos das formas graves.

#### **6.4. Sexo x Viremia**

Fatores fisiológicos, imunológicos e comportamentais podem contribuir para uma taxa de mortalidade substancialmente maior em mulheres.

De acordo com estudo realizado por Anders *et al.*, (2011) no Vietnã, associou um maior risco de gravidade no sexo feminino, com uma prevalência de 1,19 maior quando associado a SCD do que o sexo masculino e de 1,57 maior de evoluir ao óbito.

No nosso estudo incluímos um grupo homogêneo quanto ao sexo, sendo 51% (52/102) de pacientes do gênero feminino, destes 15 foram classificadas como dengue grave e 37 como dengue e 49% (50/102) do gênero masculino, onde 24 eram casos graves e 26 dengue branda. Não observamos diferenças estatísticas. Desta forma neste estudo o sexo não foi um fator determinante para a gravidade corroborando com os achados de Wang *et al.*, (2003) e Thomas *et al.*, (2008).

#### **6.5. Dias de início de sintomas x Viremia**

Estudos anteriores observaram a correlação com a quantificação da carga viral com o dia de doença, como descritos por Vaughn *et al.*, (2000).

No presente estudo não foi possível obter uma relação direta entre o dia da obtenção do soro com a magnitude da carga viral, embora tenhamos encontrado os títulos mais elevados no 1º dia de doença ( $2,88 \times 10^{06}$  cópias de RNA/mL) e no 4º dia ( $1,59 \times 10^{07}$  cópias de RNA/mL) esta diferença não foi significativa quando correlacionamos com os outros dias de doença. Figura 5.3

Em outra análise, onde correlacionamos dias de início dos sintomas com a apresentação clínica da doença, se observamos que o 5º e 6º dias de doença estão associados à gravidade da doença, com valor significativo estatisticamente ( $p = 0,04$  para o 5º dia e  $p = 0,01$  para o 6º dia de doença), embora tenham apresentando uma carga viral (5º dia com carga viral igual à  $1,31 \times 10^{06}$  cópias de RNA/mL e 6º com  $1,42 \times 10^{03}$  cópias de RNA/mL) inferior daquelas encontradas no 1º e 4º dias de doença. Tabela 5.6 e Figura 5.3

No entanto, não podemos descartar que este achado resulte de um viés, pois no grupo amostral, os soros colhidos no 5º e 6º dias de pacientes com a forma grave de dengue foram maiores do que os pacientes que apresentaram sintomas clássicos da doença. Tabela 5.6 e Figura 5.3

## 6.6. NS1 x Apresentação clínica da dengue

Duong *et al.*, (2011) correlacionou a viremia com o nível de NS1 em crianças até 16 anos, e observou que os casos de FHD estavam correlacionados com uma baixa DO do antígeno NS1. Tendo em vista a disponibilidade dos resultados de NS1 na população estudada que é uma das ferramentas de confirmação da infecção por dengue, aproveitamos para analisar esta variável. Neste trabalho não encontramos nenhuma relação de gravidade da doença com baixa ou alta DO de detecção do antígeno NS1.

A possibilidade de se estudar dois momentos epidemiológicos distintos com a circulação de um mesmo sorotipo DENV-2 e mesmo genótipo (Americano de origem Asiática), porém, com duas linhagens diferentes, possibilitou concluirmos que o vírus é um fator importante na complexa dinâmica da gravidade da doença.

O fato de não encontramos associação entre tipo de infecção, a idade, o sexo e dias de doença com gravidade e carga viral durante o período em que circulou apenas a linhagem I, reforça a nossa tese de que a linhagem II é mais virulenta e foi um fator importante para a gravidade dos casos.

Certamente esta complexa interação entre a genética viral e determinante imunológicos ainda será objeto de muitos estudos.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A viremia induzida pelo DENV-2 linhagem II foi mais elevada do que a linhagem I quando se comparou os dois períodos 1990-2000 e 2007-2011
  
- ✓ A viremia dos casos de dengue grave causados pelo DENV-2 linhagem II foram significativamente mais elevada do que os casos graves de dengue causado pela linhagem I
  
- ✓ A viremia de ambas as linhagens I e II não demonstrou relação quanto as variáveis: sexo, idade, dias de doença e tipo de resposta imune (primária e secundária)
  
- ✓ A análise filogenética de 4 amostras de DENV-2 do período de 1990-2002 e 2007- 2011 confirmou uma relação temporal entre ambas não havendo co- circulação das linhagens na coorte estudada.
  
- ✓ O vírus DENV-2 linhagem II, foi um fator importante na patogênese dos casos de dengue grave que ocorreram após a re-emergência deste sorotipo no estado do Rio de Janeiro no ano de 2007.

## 8. PERSPECTIVAS

Com características de hiperendemicidade, o Brasil além dos 4 sorotipos de dengue, novas linhagens de vírus (DENV-2, DENV-1) foram identificadas e associadas de forma temporal ao aparecimento de formas mais graves da doença.

Após sucessivas epidemias de dengue no estado do Rio de Janeiro que iniciaram em abril de 1986 mais de 1.000.000 casos já foram notificados. No momento todos os quatro sorotipos de dengue já foram isolados sendo o último deles o sorotipo 4 (DENV-4) isolado em março de 2011 no município de Niterói.

A atual situação do DENV-4 que representa um percentual significativo (60%) dos vírus identificados no estado do Rio de Janeiro justifica o estudo do impacto deste novo sorotipo na população em especial em relação às formas não usuais da doença.

Da mesma forma considerando que o DENV-1 re-emergiu no país e que ano de 2010 este sorotipo foi responsável pela maior epidemia de dengue na região das Américas a patogenia deste sorotipo merece igualmente ser melhor compreendida.

Neste contexto a análise de fatores determinantes na dispersão destes sorotipos, re-emergências/ alternância e sua conseqüência do ponto de vista da patogenia para uma região densamente povoada como o Rio de Janeiro e fundamental.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR S, WONG PF, CHAN YF. EMERGENCE of dengue virus type 4 genotype II in Malaysia. *J Gen Virol.* 2002; 83: 2437-42.

ANDERS *et al.* Epidemiological Factors Associated with Dengue Shock Syndrome and Mortality in Hospitalized Dengue Patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. 2011. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84(1), 2011, pp. 127–134

ANDERSON, C. R. ;DOWNS, W. G. ;HILL, A. E. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. 1956. *Science.* Vol: 124 (3214) 224-5.

ANONYMUS. Dengue 3 in Central America. *Dengue Surveillance. Summary.* San Juan, Puerto Rico. 1995. Division of Vector-Borne Infectious Diseases (CDC) [S.I.], v. 70.

ARAÚJO, JM *et al.* Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. 2009a. *Infect Genet Evol.* 2009a; 9(4):716-25.

ARAÚJO, JM *et al.* A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. 2009b. *J Virol Methods.* 155(1):34-8.

ARAÚJO JM *et al.* Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. 2009c. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene:* 103, 952—954

ARAÚJO, JM. Vírus sorotipo tipo 3 (DENV-3) no Brasil: Estudos sobre patogenia, sítios de replicação, filogenia e evolução molecular. 2009d. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ASHBURN E CRAID APUD GUBLER Commentary: Ashburn PM, Craig CF. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. *J Infect Dis* 1907; 4:440–75. *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189:1744–83

BEATY ME, *et. al.* Mosquitoborne infections after Hurricane Jeanne, Haiti, 2004. 2007. *Emerg Infect Dis.* 13(2):308-10.

BECKETT CG *et al.* Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. 2011. *Vaccine.* 29:960-968.

BLANEY JE *et al.* DEVELOPMENT of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. 2006. *Viral Immunol.* 19:10-32.

BOLLATI, MICHELA *et al.* Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. 2010. Antiviral Research. Vol: 87 (2) 125–148.

BRINTON, M. Replication of flavivirus. In: The Togaviridae and Flaviviridae (S. Schlesinger & M. Schlesinger, eds.). 1986. New York: Plenum Press [S.I.], 327-365.

CALISHER. Printed in Great Britain Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. 1989. J. gen. Virol. Vol: 70, 37-43.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2002. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/set1/i/slide04.htm>. Acesso em 25/02/2012

CHAO DY *et al.* Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. Virol J. 2005; 2: 72

CHEN, R. F. *et al.* Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. 2005.FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44:43–50.

CHEN, Y. C., S. Y. WANG, e C. C. KING. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. 1999.J. Virol. 73:2650–2657.

CHIEWSILP,P ; SCOTT, RM; BHAMARAPRAVATI,N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever.1981. Am J Trop Med Hyg 30 (5): 1100-5

CLARKE DH e CASALS J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. 1958. Am J Trop Med Hyg. Sep;7(5):561-73.

CLEMENTS, D *et al.* Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. 2010. Vaccine. Vol: 28 2705-2715.

CLYDE, K. *et al.* Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. 2006. J Virol. Vol: 80, n. 23, p. 11418-31.

COLLER, B.A.G e CLEMENTS, D. Dengue vaccines: progress and challenges. 2011. Current Opinion in Immunology. Vol:23 391–398

CUNHA RV e NOGUEIRA RMR. Dengue e Dengue Hemorrágico. Cap. 151, p. 1767-1781. In: Coura JR (ed). 2005.Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara.

CUZZUBBO, AJ *et al.* Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of Dengue virus infection in an immunochromatographic assay. 2001. Clin Diagn Lab Immunol. Vol: 8(6):1150-5.



- DE PAULA, S.O. e FONSECA, B.A.L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. 2004. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. Vol: 8(6):390-398
- DEUBEL, V. Recent advances and prospective researches on molecular epidemiology of dengue viruses. 1992. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol: 87 (5) 133-6.
- DOS SANTOS, F. *et al.* Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. 2002. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 97, n. 7, p. 991-5
- DOS SANTOS *et al.* First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. 2011. *Virology Journal*. Vol: 8 387
- DORAK, M. T. Real-time PCR. 2006. *Advanced Method Series*, London, p. 1-11. Disponível em: <http://www.dorak.info/genetics/realtime.html>. Acesso em: 05/03/2012
- DUONG, V. *et al.* Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. 2011. *PLoS Negl Trop Dis* 5 (7):1244
- ENDY, T. P. *et al.* Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. 2004. *The Journal Infectious Diseases*, Chicago, v. 189, p. 990-1000
- ERBEL *et al.* Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. 2006. *Nat. Struct. Mol. Biol.* Vol: 13(4) 372–373.
- FARIA, NRC. Vinte anos de atividade dos vírus dengue tipo 2 no Brasil: caracterização molecular e filogenia de cepas isoladas de 1990-2010. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- FIGUEIREDO LT. The Brazilian flaviviruses. 2000. *Microbes Infect.* 2:1643-9.
- FOSTER, JE *et al.* Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology*. 2003; 306:126-134.
- FRIED, J *et al.* Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 4 (3): 617
- FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). 2002. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5 ed. Brasília

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. BRASIL. 2001. Dengue: Manual de Normas Técnicas, Instrução para pessoal de combate ao vetor. Brasília 83p.

GARCÍA-RIVERA, EJ e RIGAU-PÉREZ, JG. Dengue severity in the elderly in Puerto Rico. 2003. *Rev Panam Salud Publica* 13 (6) 362-8

GERMI, R. *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. 2002. *Virology* 292:162–168.

GOMES, ALV. Identificação de focos de transmissão de esquistossomose através da detecção molecular de moluscos vetores infectados com *Schistosoma mansoni*. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

GORBALENYA *et al.* N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. 1989. *Nucleic Acids Res.*, Vol: 17 (10), pp. 3889–3897.

GUBLER (1981) APUD ARAUJO, JMG. Implantação da Técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan) para Dengue tipo 3 (DENV-3) e vigilância virológica no estado do Rio de Janeiro nos anos 2004-2005. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

GUBLER DJ, *et al.* Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. 1984. *Am J Trop Med Hyg* Vol: 33 158-165.

GUBLER DJ e SATHER G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. 1988. *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. Rio de Janeiro, Brasil.

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

GUBLER, DJ e CLARK, GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. 1995. *Emerg Infect Dis*. Vol: 1 (2) 55-7.

GUBLER DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. 1 - 22. In: Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 1997*. CAB International, New York, New York, USA

GUBLER. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. 2002. *Trends Microbiol*. Vol:10(2) 100-3.

GUBLER, D. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. 2006. *Novartis Found Symp* Vol: 277, p. 3-16.

GUY B *et al.* Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. 2010. *Vaccine* Vol: 28 632-649.

GUY B, SAVILLE M e LANG J: Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. 2010a. *Hum Vaccines*. Vol 6 696-705.

GUZMÁN, M *et al.* A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981.1984. *Bull Pan Am Health Organ*. 18 (3): 213-20

GUZMÁN, M. G. *et al.* Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. 2002. *International Journal of Infectious Diseases*, Hamilton, v. 6, p. 118-124

GUZMAN MG e KOURI G. Dengue: an update. 2002. *Lancet Infect Dis*. 2:33-42.

GUZMAN, M *et al.* Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. 2004. *Expert Rev Vaccines*.Vol: 3(5) 511-20.

GUZMAN, M *et al.* Dengue: a continuing global threat. 2010. *Nat Rev Microbiol*. Vol: 8 (12) 7-16.

HALSTEAD, SB *et al.* Hemorrhagic fever in Thailand; recent knowledge regarding etiology. 1967. *Jpn J Med Sci Biol* 20: 96-1033

HALSTEAD, SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. 1970. *Yale Journal of Biology and Medicine*, New Haven, v. 42, p.350

HALSTEAD, SB. Dengue haemorrhagic fever- a public health problem and a field for research. 1980. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol: 58 (1) 1-21

HALSTEAD SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. 1988. *Science*. 239(4839): 476-481.

HALSTEAD SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? 2007. *Rev Panam Salud Publica*. 20:407-415.

HAMMOND, S. N. *et al.* Differences in Dengue Severity in Infants, Children, and Adults in a 3-year Hospital-Based Study in Nicaragua. 2005. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 73, n. 6, p. 1063-1070

HENCHAL. EA *et al.* Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. 1982. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v.31, p. 830-836

HILGARD, P. e STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. 2000. *Hepatology* 32 (5): 1069-77

HOLLAND, PM *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. 1991. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol: 88(16):7276-80.

HUANG, CY-H *et al.* Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. 2003. J Virol. Vol: 77 11436-11447.

IGARASHI A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. 1978. J Gen Virol. Vol: 40 531-544.

immune (Halstead, 1988 e 2007);

INNIS, BL *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis cocirculate. 1989. Am J Trop Med Hyg. Vol :40 418-427.

JESSIE, K. *et al.* Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. 2004. J Infect Dis. Vol: 189 (8) 1411-8.

JINDADAMRONGWECH, SC. THEPPARIT, ED. e R. SMITH. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. 2004. Arch. Virol. 149 915–927.

JOHNSON, BW *et al.* Analysis of the replication kinetics of the ChimeriVax-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 2004. Am J Trop Med Hyg. Vol: 70 (1) 89-97.

JOHNSON BW, RUSSELL BJ e LANCIOTTI RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. 2005. J Clin Microbiol. 43: 4977-4983.

KAO, CL. *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. 2005. J Microbiol Immunol Infect 38 (1): 5-16

KLUNGTHONY, C. *et al.* The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. Virol 2004; 329: 168-179.

KOURI, G. *et al.* Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. 1986. Bull Pan Am Health Organ. v. 20 (1) 24-30.

KUNO, G *et al.* Evaluation of an IgM immunoblot kit for dengue diagnosis. 1998. Am J Trop Med Hyg. Vol: 59(5) 757-62.

KUNO G, GOMEZ I e GUBLER DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. 1987. *Am J Trop Med Hyg.* 36:153-159.

LAM SK e DEVINE PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. 1998. *Clin Diagn Virol.* 10(1):75-81.

LANCIOTTI, RS *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 1992. *J Clin Microbiol.* 30:545-551.

LANCIOTTI, R. *et al.* Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. 1994. *J Gen Virol.* v. 75 ( Pt 1), p. 65-75

LANCIOTTI RS, GUBLER DJ, TRENT DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. 1997. *J Gen Virol.* Sep 78 ( Pt 9):2279-84.

LANG J. Recent progress on Sanofi Pasteur's dengue vaccine candidate. 2009. *J Clin Virol,* 46:20-24

LEITMEYER, K. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. 1999. *J Virol.* v. 73, n. 6, p. 4738-47

LEUNG *et al.*, Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. 2001. *J. Biol. Chem.*, 276 49 pp. 45762–45771.

LI *et al.*, The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. 1999. *J. Virol.*, 73 4 pp. 3108–3116

LIGON, BL. Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever: A Review of the History, Transmission, Treatment, and Prevention. 2005. *Semin Pediatr Infect Dis.* Jan;16(1):60-5.

LIMA, MDA R *et al.* Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* Jul 6;4(7):e738.

LINDENBACH, B. e RICE, C. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. 1999. *J Virol.* v. 73, n. 6, p. 4611-21.

LOZACH, PY *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is

- independent of DC-SIGN internalization signals. 2005. *J. Biol. Chem.* 280:23698–23708.
- MACHADO *et al.*, Epidemiology Of Neglected Tropical Diseases In Transplant Recipients. Review Of The Literature And Experience Of A Brazilian Hsct Center. 2009. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*51(6):309-324, November-December.
- MALAVIGE, GN e FERNANDO, D.J., Seneviratne, S.L., Dengue viral infections. 2004. *Postgrad Med J* 80:588–601
- MARIANO, F. A dengue. Considerações a respeito de sua incursão no Rio Grande do Sul em 1916. 1917. *Arch. bras. Med.*, 7: 272-277.
- MENTOR NA, KURANE, I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. *Acta Virol.* 1997 Jun;41(3):175-6.
- MIAGOSTOVICH, MP *et al.* Dengue epidemic in the State of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. 1993. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 35 (2): 149-54.
- MIAGOSTOVICH, MP *et al.* Retrospective study on dengue fatal cases. 1997. *Clin Neuropathol.* 16: 204-208.
- MIAGOSTOVICH, MP *et al.* Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. 1999. *J Clin Virol.* 14:183-189.
- MONGKOLSAPAYA, J. *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med [S.I.]*, v. 9, n. 7, p. 921-7, Jul 2003.
- MUKHOPADHYAY, S. *et al.* A structural perspective of the flavivirus life cycle. 2005. *Nat Rev Microbiol* v. 3, n. 1, p. 13-22
- MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003 J.L. Munoz-Jordan, G.G. Sanchez-Burgos, M. Laurent-Rolle and A. Garcia-Sastre, Inhibition of interferon signaling by denguevirus. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (24), pp. 14333–14338
- MURGUE, B. *et al.* Prospective Study of the Duration and Magnitude of Viraemia in Children Hospitalised During the 1996-1997 Dengue-2 Outbreak in French Polynesia. 2000. *Journal of Medical Virology*, New York, v.60, p. 432-438
- Nisalak *et al.*, 2003
- NISHIURA, H. e HALSTEAD, S. Natural history of dengue virus (DENV)-1 and DENV-4 infections: reanalysis of classic studies. 2007. *J Infect Dis [S.I.]*, v. 195, n. 7, p. 1007-13

- NOGUEIRA, RM *et al.* Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro.1990. Mem Inst Oswaldo Cruz. Apr-Jun;85(2):253
- NOGUEIRA, RMR *et al.* Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. 1992. Res. Virol. Vol: 143,423-427
- NOGUEIRA, RMR *et al.* Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. 1999.Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94(3): 297-304.
- NOVAIS, C. M. e PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. 2004.Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, DF, v. 33, p. 10-13
- OhAINLE, M *et al.* Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. 2011. Sci Transl Med. Dec 1;3(114):114-128.
- OLIVEIRA, MF *et al.* Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. 2010. Emerg Infect Dis. Mar;16(3):576-8.
- OMS (World Health Organization) 2012. Impact of Dengue. Global Alert and Response (GAR). <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>. Acesso em 20/01/2012
- OMS (World Health Organization). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em 17/10/2011.
- OMS (World Health Organization). Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2002. Fact Sheet N° 117, revised April 2002. [www.who.int/csr/disease/en/who](http://www.who.int/csr/disease/en/who).
- OMS (World Health Organization). 2009.Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva. Pg 3 -17.
- PAHO (Pan American Health Organization). Re-emergence of dengue in the Americas. Epidemiol. Bull.; 1997; 18 (2): 1-7
- PAHO (Pan American Health Organization). 2004. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)\* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2004. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2004.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2004.htm) Acesso em: 10/10/2011.
- PAHO (Pan American Health Organization). 2008. Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)\* in the Americas, by Country: Number of Reported Cases of Dengue and

Figures for 2008. [www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2008.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2008.htm)  
 Acesso em: 03/06/2011.

PAHO (Pan American Health Organization). Números de casos reportados de dengue até a 38ª Semana Epidemiológica de 2011.

PANG T, CARDOSA MJ e GUZMAN MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). 2007. *Immunol Cell Biol.*85(1):43-5. Epub 2006 Nov 28

PERERA, R e KUHN, RJ. Structural proteomics of dengue virus. 2008. *Curr Opin Microbiol.* Aug;11(4):369-77

PINHEIRO, F. e CORBER, S. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. 1997. *World Health Stat Q [S.I.]*, v. 50, n. 3-4, p. 161-9.

POERSCH, CO *et al.* Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J Clin Virol.* 2005 Apr;32(4):272-7.

REBÊLO, JMM. *et al.* Distribuição de aedes aegypti e do Dengue no Estado do Maranhão, Brasil. 1999. *Caderno de Saúde Pública*, 15(3): 477-486

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. 1990. *Virology* Feb;174(2):479-93.

RICO-HESSE, R. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. 1997. *Virology* v. 230, n. 2, p. 244-51

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

RIGAU-PÉREZ, J. *et al.* The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. 2002. *Am J Trop Med Hyg [S.I.]*, v. 67, n. 4, p. 355-62

ROCHA, LA e TAUIL, PL. Dengue em criança: aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007. 2009. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(1):18-22.

RODENHUIS-ZYBERT, IA; WILSCHUT, J e SMIT, JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2773–2786.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. 1977. *Am J Trop Med Hyg* v. 26, n. 3, p. 337-43

ROSEN, L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. 1986. *S Afr Med J* 40-2



ROSEN L *et al.* The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. 1997. *Am J Trop Med Hyg.* 3:878-882.

ROTHMAN, A. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. 2004. *J Clin Invest* [S.I.], v. 113, n. 7, p. 946-51

SÁ, RT e ZAGNE, SMO. Classificação da Dengue. In: Souza LJ. 2008. *Dengue – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção*. 2ed. Rio de Janeiro.

SABIN, A. Research on dengue during World War II. 1952. *Am J Trop Med Hyg*, v. 1, n. 1, p. 30-50

SAN MARTIN, JL *et al.* The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. 2010. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82 (1): 128–135

SANG, CT, CUZZUBBO, AJ e DEVINE, PL. Evaluation of a commercial capture enzymelinked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. 1998. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5(1):7-10.

SANGKAWIBHA, N *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. 1984. **Am J Epidemiol.** Nov;120(5):653-69.

SCHATZMAYR HG *et al.* An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. 1986. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* Abr/Jun; 81 (2): 245-6.

SENIOR K. Dengue vaccine efficacy trials in progress. 2009. *Lancet Infect* 9:662-663.

SES (Secretaria de Estado de Saúde). Relatório de casos de dengue – 2008. disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br>

SUDIRO, T. M., *et al.* Analysis of Plasma Viral RNA Levels During Acute Dengue Virus Infection Using Quantitative Competitor Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. 2001. *Journal of Medical Virology*, New York, v. 63, p. 29-34

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2007. Balanço Dengue Janeiro a Julho de 2007. Disponível em:

[http://www.infectologia.org.br/anexos/MSSVS\\_balan%C3%A7o%20dengue%20jan-jul%202007.pdf](http://www.infectologia.org.br/anexos/MSSVS_balan%C3%A7o%20dengue%20jan-jul%202007.pdf) Acessado em: 27/08/2011

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2009. Nota Técnica: Situação Epidemiológica. Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_janeiro\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf)

Acessado em 07/09/2011

- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, p 231-253, 2010.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2011. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 26<sup>1</sup> de 2011. disponível em: <http://portal.saude.gov.br>.
- TAMURA, K *et al.* "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0". 2007. Mol. Biol. Evol. 24 (8) pp. 1596–9.
- TEIXEIRA, MG *et al.* Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. 2009. Cad Saude Publica. 25 Suppl 1: S7-18.
- TELES, F. R. ; PRAZERES, D. M. e LIMA-FILHO, J. L. Trends in dengue diagnosis. 2005. Rev Med Virol 15 (5): 287-302
- THAI, K *et al.* J. Clinical, epidemiological and virological features of Dengue virus infections in Vietnamese patients presenting to primary care facilities with acute undifferentiated fever. 2010. J Infect 60 (3): 229-37
- THEIN, S. *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome. 1997. Am J Trop Med Hyg [S.I.], v. 56, n. 5, p. 566-72
- THOMAS, L *et al.* Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. 2008. Am J Trop Med Hyg 78 (6): 990-8
- TOMLINSON, S.M., MALMSTROM, R. D., WATOWICH, S. J. New Approaches to Structure Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors. 2009. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 9, 327-343
- TRENT, DW *et al.* Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. 1983. Virology 30; 128(2):271-84.
- TRENT, DW *et al.* The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. 1990. Appl Virol Res. 2: 293-315.
- TRICOU, V *et al.* Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. 2011. PLoS Negl Trop Dis. 5 (9): 1309
- VALDES, K *et al.* Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. 2000. Clin Diagn Lab Immunol. 7:856-857.
- VALLE, JRD *et al.* Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. 2005. J. Virol. 79:4557–4567.
- VASCONCELOS, P. *et al.* A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic

- cases in Ceará State, Brazil, 1994. 1995. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* v. 37, n. 3, p. 253-5
- VASILAKIS *et al.*, Evolutionary processes among sylvatic Dengue-2 viruses. 2007. *J. Virol.*, 81, pp. 9591–9595
- VASELASKI, N *et al.* Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. 2011. *Nat Rev Microbiol.* Jun 13;9(7):532-41
- VAUGHN, DW *et al.* Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. 1999. *Am J Trop Med Hyg.* 60:693-698.
- VAUGHN DW, *et al.* Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. 2000. *Journal of Infectious Diseases* 181:2-9.
- VORNDAM V e KUNO G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler,DJ, Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* 1997. New York: CAB International.
- WANG, WK *et al.* High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. 2003. *Virology* 305 (2): 330-8
- WANG, WK. *et al.* Slower Rates of Clearance of Viral Load and Virus-Containing Immune Complexes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. 2006. *Clinical Infectious Diseases*, Boston, v. 43, p. 1023-1030
- WEAVER, SC e VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. 2009. *Infection, Genetics and Evolution* volume 9, Issue 4, Pages 523-540.
- WENGLER, G, NOWAK, T e WAHN, K. Analysis of the influence of proteolytic cleavage on the structural organization of the surface of the West Nile flavivirus leads to the isolation of a protease-resistant E protein oligomer from the viral surface. 1987. *Virology.* 160:210-219.
- WHITEHEAD, SS *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. 2007. *Nat Rev Microbiol.* 5: 518-528.
- WHITEHORN, J. e SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. 2011. *Vaccine* 29 (42): 7221-8

XU, H *et al.* Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. 2006. *J Clin Microbiol.* 44:2872-2878.

ZAGNE, S. *et al.* Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. 1994. *Trans R Soc Trop Med Hyg* v. 88, n. 6, p. 677-9

ZHANG *et al.*, C. Zhang, M.P. Mammen, P. Chinnawirotpisan, C. Klungthong, P. Rodpradit, P. Monkongdee, S. Nimmannitya, S. Kalayanaroj and E.C. Holmes, Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. 2005. *J. Virol.* 79 (24) pp. 15123–15130.