



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ARYANE CRUZ OLIVEIRA PINHO**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DENGUE CIRCULANTE NA CIDADE DE SALVADOR,  
BAHIA, BRASIL**

Salvador

2013

**ARYANE CRUZ OLIVEIRA PINHO**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DENGUE CIRCULANTE NA CIDADE DE SALVADOR,  
BAHIA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sílvia Inês Sardi

Co-orientador: Dr. Gúbio Soares Campos

Salvador

2013

P654 Pinho, Aryane Cruz Oliveira

Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil./ Aryane Cruz Oliveira Pinho. – Salvador, 2013.

75 f.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvia Inês Sardi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Dengue. 2. Vírus. 3. Saúde. I. Sardi, Silvia Inês. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.99

**ARYANE CRUZ OLIVEIRA PINHO**

**DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DENGUE CIRCULANTE NA CIDADE DE SALVADOR,  
BAHIA, BRASIL**

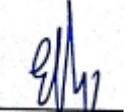
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

**Banca Examinadora**

Silvia Inês Sardi – Orientadora  \_\_\_\_\_  
Doutora em Virologia pela Universidad de Buenos Aires, Argentina  
UBA, Argentina  
Universidade Federal da Bahia

Luis Gustavo Carvalho Pacheco  \_\_\_\_\_  
Doutor em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais e  
University of Warwick  
UFMG, Brasil/ University of Warwick, Reino Unido  
Universidade Federal da Bahia

Eduardo Hage Carmo  \_\_\_\_\_  
Doutor em Saúde Coletiva pela Universidade Federal da Bahia, Brasil  
UFBA, Brasil  
Ministério da Saúde

À

Maria Vianey, minha amada mãe, por ter me ensinado a aprender.

Adriano e Adriane, meus queridos irmãos, pelo incentivo e paciência.

Todos os meus familiares, pelo apoio de sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos que recebo a cada momento. Sabes de cada dificuldade, e em Ti busco forças para superar cada obstáculo.

À minha mãe, Maria Vianey, um exemplo de coragem e superação, obrigada pelo apoio incondicional desde sempre. Estarei ao seu lado, buscando com carinho e entendimento o melhor a se viver neste caminhar. Ao meu pai (*in memoriam*), sei que mesmo fisicamente ausente, continua a olhar por mim.

Aos meus irmãos, Adriano e Adriane, obrigada pela paciência, amizade, incentivo e pelo amor que me deu coragem para enfrentar os desafios, força nos momentos difíceis e persistência para nunca desistir.

À minha madrinha e segunda mãe, Vânia, sempre presente e ajudando em qualquer situação. Aos meus tios e familiares, em especial à Maria José, Gorete e Rita, pelo apoio dado.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Sardi, pela paciência e confiança, por todos os ensinamentos, pela orientação, atenção, pelo apoio profissional.

Ao meu co-orientador Gúbio Campos pela amizade, orientação, apoio, por ter me estimulado a estudar e aprender cada vez mais. Agradeço a ele por ter me recebido de braços abertos há alguns anos atrás quando o procurei para ser estagiária, ainda na graduação. Desde o início ele me acolheu, acreditou e confiou em mim. Agradeço a ele pela paciência, compreensão e ajuda em todos os momentos. À você, meu querido orientador e amigo, muitíssimo obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, em especial às minhas queridas amigas Camila, Dellane, Isabela e Fabiana, pela amizade, apoio, compreensão, carinho, companheirismo, conversas e saídas para alívio das tensões (rsrrsr). Obrigada minhas amigas por fazerem parte da minha vida!

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão. Mesmo não podendo estar sempre juntos, sei que posso contar em qualquer circunstância.

Aos novos amigos conquistados no Mestrado, em especial a Fúlvia e a Priscila.

À Profª Flora Fernandez, pela colaboração essencial na análise filogenética do trabalho.

Às minhas amigas da época da faculdade de Ciências Biológicas, Juliana, Niara, Luíza, pelo apoio, companheirismo, diversão, sempre presentes na minha vida, e que acompanharam de perto todas as dificuldades, as conquistas, as tristezas e as alegrias. Obrigada pela presença de vocês na minha vida e por todo o carinho e atenção que tens comigo. Agradeço por todos os conselhos, pelo incentivo e pela força que sempre me deram.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

Ao Pronex-Dengue, CNPq, FAPESB pelo financiamento do projeto que permitiu a execução desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado.

À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meus agradecimentos.

“Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo. Quem acredita sempre alcança.”

(Mais Uma Vez)

Renato Russo

PINHO, Aryane Cruz Oliveira. Diagnóstico e caracterização molecular do vírus Dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. 75 f. 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## RESUMO

A Dengue é uma arbovirose que causa sérios problemas de saúde, em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Vírus Dengue (DENV), agente etiológico da doença, pertence ao gênero *Flavivirus*, cujas características antigênicas o classificam em quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Com o intuito de realizar a caracterização molecular do DENV circulante em Salvador-Bahia no período de maio/2011 à maio/2012, neste estudo foram analisadas 214 amostras de soros de pacientes com suspeita de infecção pelo DENV. O RNA viral foi extraído diretamente do soro dos pacientes para diagnóstico molecular através de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e posterior sorotipagem viral pela técnica de Nested-PCR. O DENV foi detectado em 93 amostras por RT-PCR e o Nested-PCR revelou a presença de três sorotipos circulantes em Salvador, sendo 13 amostras positivas para DENV 2, 3 amostras para DENV 3 e 77 para DENV 4, revelando assim a alta ocorrência de DENV4. Uma análise comparativa do teste imunocromatográfico rápido utilizado atualmente em centros de saúde para diagnóstico de infecções pelo DENV e o diagnóstico molecular do DENV revelou que o teste imunocromatográfico é mais eficaz na detecção em indivíduos infectados. Foi realizado isolamento do DENV4 a partir de soro, utilizando cultivo celular de *Aedes albopictus* clone C6/36 e a resposta imune contra proteínas E, prM, NS1 e NS3 do DENV4 foi demonstrada por Western Blot. O sequenciamento e análise filogenética do gene E das sequências virais mostraram que elas pertencem ao genótipo I (cepas Asiáticas) de forte homologia com cepas isoladas no VietNam. Concluindo, esses resultados indicam a co-circulação de vários sorotipos com uma maior incidência do DENV4 e confirma a detecção de DENV4 genótipo I no Brasil a partir do Sudeste Asiático. Um diagnóstico imediato da infecção aliado a um diagnóstico molecular dos sorotipos/genótipos circulantes na comunidade poderiam ser medidas de prevenção e controle para riscos potenciais de formas graves da doença numa população.

Palavras-chave: Vírus Dengue, diagnóstico, PCR, sequenciamento, genótipo I

PINHO, Aryane Cruz Oliveira. Diagnosis and molecular characterization of dengue vírus circulating in the city of Salvador, Bahia, Brazil. 75 pp. 2013 Master Dissertation. Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## ABSTRACT

Dengue is an arbovirus that causes serious health problems in tropical and subtropical regions of the world. Dengue virus (DENV), the etiologic agent, belongs to the genus *Flavivirus*, which is classified into four serotypes: DENV1, DENV2, and DENV3 DENV4. In order to perform the molecular characterization of DENV circulating in Salvador-Bahia between May/2011 to May/2012, this study analyzed 214 serum samples from patients with suspected DENV infection. The viral RNA was extracted directly from patient serum for molecular diagnosis by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) and subsequent viral serotyping by nested PCR technique. The DENV was detected in 93 samples by RT-PCR, and nested PCR revealed the circulation of three serotypes in Salvador, 13 positive samples to DENV 2, 3 samples to DENV 3 and 77 samples to DENV 4, revealing the high occurrence of DENV4. A comparative analysis of immunochromathography assay, currently used in public health centers for diagnosis of DENV infections, and molecular diagnosis of DENV revealed that the immunochromathography assay is most effective in the detection of infected individuals. DENV4 isolation was performed from serum using culture cell of *Aedes albopictus* clone C6/36 and the immune response against E, prM, NS1 and NS3 proteins of DENV4 was demonstrated by Western Blot. The sequencing and phylogenetic analysis of gene E from viral sequences showed that they belong to genotype I (Asian strains) with strong homology to viral strains isolated in Vietnam. In conclusion, these results indicated the co-circulation of multiple serotypes with a higher incidence of DENV4 and confirm of detection DENV4 genotype I in Brazil from Southeast Asia. Early diagnosis of infection associated to molecular diagnosis of serotypes / genotypes circulating in the community are control measures that predict potential risks of severe disease in the population.

Keywords: Dengue Virus, diagnosis, PCR, sequencing, genotype I

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da partícula viral nas formas intracelular e extracelular.....	20
Figura 2: Desenho esquemático do genoma do DENV.....	21
Figura 3: Proteínas responsáveis pela clivagem da poliproteína viral.....	22
Figura 4: Monômero da glicoproteína E e seus domínios.....	23
Figura 5: Ciclos de transmissão do DENV.....	26
Figura 6: Esquema do ciclo de replicação do vírus Dengue no interior da célula hospedeira humana.....	29
Figura 7: Fusão da membrana endossomal com a membrana viral.....	29
Figura 8: Mecanismo de ação do fenômeno conhecido como aumento da infecção dependente de opsonização por anticorpo (ADE).....	33
Figura 9: Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas durante os anos 1930, 1970 e 1998.....	35
Figura 10: Distribuição mundial do DENV.....	36
Gráfico 1: Distribuição mensal dos sorotipos do DENV identificados por isolamento viral, Bahia, 2011 e 2012.....	39
Figura 11: Árvore mostrando as relações filogenéticas dos genótipos de DENV4.....	42
Figura 12: Procedimento do Teste Imunocromatográfico.....	49
Figura 13. Esquema do genoma de DENV mostrando a posição do gene E.....	51
Quadro 1: Iniciadores utilizados neste estudo.....	52
Quadro 2: Cepas DENV-4 selecionadas no GenBank de acordo com número de acesso no GenBank, ano de isolamento e procedência.....	52
Gráfico 2: Sorotipagem do DENV.....	54

Figura 14: Identificação de sorotipos.....	54
Gráfico 3: Amostras positivas no Teste imunocromatográfico Dengue Duo Rapid Test.....	55
Gráfico 4. Virus Dengue, antígeno e resposta de anticorpos usados no diagnóstico.....	57
Figura 15: Isolamento viral em cultura de células de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36.....	58
Figura 16: DENV4: Isolamento viral em cultivo de células C6/36.....	58
Figura 17: Identificação de proteínas virais do DENV por Western Blot.....	59
Figura 18: RT-PCR de amostra DENV4.....	61
Figura 19: Filograma construído pelo método de Máxima Verossimilhança mostrando a identificação do genótipo das cepas de DENV4 isoladas de soros de pacientes em Salvador, Bahia .....	62
Figura 20. Árvore filogenética dos genótipos de DENV4 baseada em sequências do Gene E.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para NS1.....56

Tabela 2: Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para IgM.....56

Tabela 3: Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para IgG.....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
ADE	Antibody-dependent enhancement
ATP	Adenina Trifosfato
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
C	Proteína do Capsidio
DENV	Vírus dengue
dNTP	Desoxirribonucleotideo trifosfatado
DTT	Ditiotreitol
E	Proteína do Envelope
ECP	Efeito citopático
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Ou <i>Enzyme-Liked Imussorbent Assay</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Proteína da Membrana
M	Molar
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
NS	Proteína Viral Não-Estrutural

NTR	Região não traduzida
ORF	Regiões Aberta De Leitura
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida
PB	Pares de Bases
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBS-T	Tampão Salina Fosfato acrescido de Tween
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
prM	Pré-membrana
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Reação de Transcriptase Reversa
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS
TRIS	Hidroxi-Metil-Aminocetano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 CLASSIFICAÇÃO .....	19
2.2 ESTRUTURA VIRAL .....	19
2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA .....	20
2.4 PROTEÍNAS VIRAIS .....	22
<b>2.4.1 Proteínas Estruturais</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4.2 Proteínas Não-Estruturais</b> .....	<b>23</b>
2.5 CICLO VIRAL .....	25
<b>2.5.1 Ciclo de transmissão e Interação do vírus com o vetor</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5.2 Interação do vírus com o hospedeiro</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5.3. Ciclo de replicação</b> .....	<b>27</b>
2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA .....	30
2.7 PATOGENIA DA DENGUE .....	31
2.8 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA .....	33
<b>2.8.1. Epidemiologia no Brasil</b> .....	<b>36</b>
<b>2.8.2 Epidemiologia na Bahia</b> .....	<b>38</b>
<b>2.8.3 Epidemiologia Molecular</b> .....	<b>39</b>
2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	42
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 AMOSTRAS .....	46
4.2 DETECÇÃO DO DENV .....	46
<b>4.2.1 Detecção molecular</b> .....	<b>46</b>
4.2.1.1 <i>Extração do RNA viral</i> .....	46
4.2.1.2 <i>Detecção e Identificação do DENV</i> .....	46
4.2.1.2.1 Detecção do Flavivirus: Transcrição Reversa – seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, na sigla em inglês) .....	46

4.2.1.2.2 Detecção de sorotipos: Nested-PCR.....	47
<b>4.2.2 Isolamento viral em cultivo de células.....</b>	<b>48</b>
4.3 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À DENV .....	48
<b>4.3.1 Teste Imunocromatográfico rápido.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.2 Western Blot.....</b>	<b>49</b>
4.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO DENV4 .....	50
4.5 ANÁLISES DE DADOS.....	53
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DENV .....	54
5.2 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO: DETECÇÃO DE IGM, IGG E ANTÍGENO NS1 .....	55
5.3 COMPARAÇÃO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO <i>VERSUS</i> RT-PCR .....	55
5.4 ISOLAMENTO VIRAL .....	588
5.5 WESTERN BLOT .....	599
5.6 AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR DO GENE E, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE DENV4.....	60
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença viral transmitida aos humanos por mosquitos do gênero *Aedes sp.* Possui alto impacto na saúde pública do Brasil e de outros países tropicais e subtropicais em função de sua ampla distribuição e de sua capacidade em causar significativa morbidade e mortalidade em humanos. O vírus Dengue (DENV), agente etiológico dessa doença, pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, é um vírus envelopado cujo genoma é constituído por RNA de fita simples polaridade positiva. Apresenta características antigênicas distintas que o diferem em quatro sorotipos antigenicamente diferentes (DENV 1-4) (LINDENBACH *et al.*, 2007; VASILAKIS & WEAVER, 2008). As infecções pelo DENV podem se apresentar sob as formas assintomática e sintomática, e esta última pode se manifestar por meio de duas formas clínicas principais: a febre clássica da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD), com ou sem síndrome do choque da dengue (SCD), podendo levar o paciente a óbito. Não existe vacina disponível nem tratamentos específicos para a doença (HOLMES & TWIDDY, 2003; LINDENBACH *et al.*, 2007; WHITEHORN & SIMMONS, 2011). Em todo o mundo ocorrem entre 50 e 100 milhões de infecções a cada ano, com aproximadamente 500.000 casos grave (WHO, 2009).

Visto que os sintomas da Dengue são similares com outras doenças febris, a disponibilidade de testes diagnósticos específicos é extremamente importante para confirmação da doença em casos suspeitos e deveria ser uma das prioridades na saúde pública. Várias técnicas têm sido aplicadas para diagnóstico laboratorial da infecção viral em amostras de soro ou tecidos. Essas técnicas incluem: detecção do vírus (cultura de célula, imunofluorescência), detecção do antígeno viral (ELISA), detecção de anticorpos anti-vírus Dengue (inibição da hemaglutinação, teste de fixação do complemento, teste de neutralização e ELISA) e detecção do ácido nucléico viral (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase [RT-PCR]) (GUBLER *et al.*, 1998).

Como na maioria dos vírus de RNA, devido à ausência de atividade de *proofreading* (capacidade de correção do erro cometido) da RNA polimerase RNA dependente, DENV apresenta considerável diversidade genética. Segundo Holmes e Burch (2000) mutações, recombinações, susceptibilidade do hospedeiro e fluxo gênico dos sorotipos do DENV têm causado maior predisposição dos mesmos a essa diversidade. Diferenças no genoma viral observadas através de estudos de sequências parciais de genes do DENV possibilitou dividir um sorotipo em classes ou clados intrasorotípicas (FERNANDEZ *et al.*, 2011; LANCIOTTI *et al.*, 1994, 1997; RICO-HESSE, 1990; RICO-HESSE *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000). Dada a importância desta virose no país, neste trabalho foi detectado os sorotipos circulantes na população de Salvador-BA e analisado filogeneticamente o sorotipo DENV4, predominante nesta população.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CLASSIFICAÇÃO

O vírus Dengue (DENV) é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Este gênero compreende importantes patógenos humanos, dentre eles, podemos destacar o vírus da Encefalite Japonesa, o vírus da Encefalite de St. Louis, o vírus da Encefalite do Oeste do Nilo (*West nile virus ou WNV*) e o vírus da Febre Amarela (HOLMES & TWIDDY, 2003; KUNO *et al.*, 1998; LINDENBACH *et al.*, 2007; VASILAKIS & WEAVER, 2008). Vírus dentro deste gênero são classificados baseado-se em critérios sorológicos ou em clusters (grupos), clados, espécies, de acordo com a filogenia molecular (LINDENBACH *et al.*, 2007). DENV apresenta características antigênicas distintas que o diferem em quatro sorotipos antigenicamente diferentes (DENV 1-4) e três a cinco grupos genéticos (genótipos) dentro de cada sorotipo (LINDENBACH *et al.*, 2007; RICO-HESSE, 2010; VASILAKIS & WEAVER, 2008).

### 2.2 ESTRUTURA VIRAL

Assim como outros *Flavivirus*, DENV apresenta morfologia esférica, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. O genoma é constituído por um RNA de fita simples, polaridade positiva, protegido por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto por um capsídeo (C) de aproximadamente 30 nm. Este nucleocapsídeo é circundado por uma membrana lipoprotéica derivada da célula hospedeira, com proteínas do envelope (E) e proteínas da membrana (M) ou pré-membrana (prM) inseridas nela (STIASNY & HEINZ, 2006). Na figura 1 observa-se a organização da partícula viral, uma forma intracelular, caracterizada pela presença da proteína precursora prM que impede a exposição prematura da proteína E, e uma forma

extracelular, a qual é caracterizada pela presença da proteína M (STADLER *et al.*, 1997).

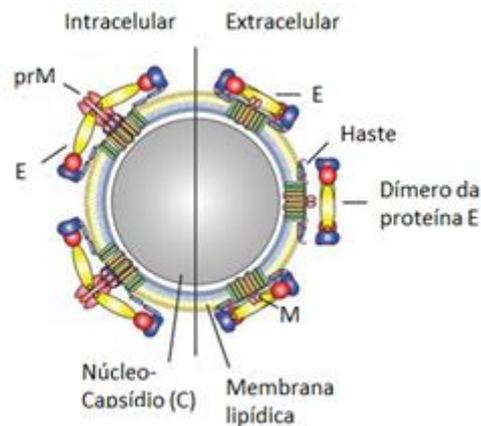


Figura 1. Estrutura da partícula viral nas formas intracelular e extracelular (Adaptado de STIASNY & HEINZ, 2006).

### 2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O genoma do DENV tem aproximadamente 11 Kilobases (kb) de comprimento e contém uma única região de leitura aberta (ORF), com aproximadamente 10.700 nucleotídeos variando a depender do sorotipo do DENV. Essa ORF codifica uma única poliproteína, que após clivagens gera três proteínas estruturais que constituem o vírus maduro: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5), importantes para a replicação viral e processamento do polipeptídeo (CHAMBERS *et al.*, 1990; HENCHAL & PUTNAK, 1990) (Figura 2).

Uma peptidase derivada do hospedeiro é responsável pelas clivagens ao nível das junções das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1, e próxima da região carboxi-terminal da NS4A (CHAMBERS *et al.*, 1990; STADLER *et al.*, 1997). Uma serina protease, codificada pelo vírus, é responsável pelas clivagens entre as junções das proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B E NS4B/NS; a enzima

responsável pela clivagem da NS1/NS2A até o momento é desconhecida (LINDENBACH & RICE, 2003) (Figura 3).

O genoma viral é flanqueado por duas regiões não traduzidas (NTRs), 5'NTR e 3' NTR. A região 5' NTR contém cerca de 100 pb de comprimento, sugere-se que está envolvida na tradução do genoma e juntamente com a ação do complexo NS3-NS5 e a atividade de metiltransferase da NS5, adiciona a estrutura do cap para o final da 5' NTR. Ao passo que a região 3' NTR, possui um comprimento de 450 pb com a ausência da cauda poli (A). Esta região possui um “loop” altamente conservado (3'SL) requerido durante a replicação viral. A ausência da cauda poli-A indica que o vírus não utiliza o mesmo mecanismo de tradução que os RNAs celulares (CLYDE, *et al.*, 2006).

O gene E é o mais utilizado em estudos de epidemiologia molecular do DENV, devido à importância da glicoproteína E na ligação e entrada dos vírus na célula e, principalmente, na resposta humoral do hospedeiro humano. Tem-se demonstrado também que mutações nesse gene podem resultar no aumento da virulência das cepas virais (LEITMEYER *et al.*, 1999).

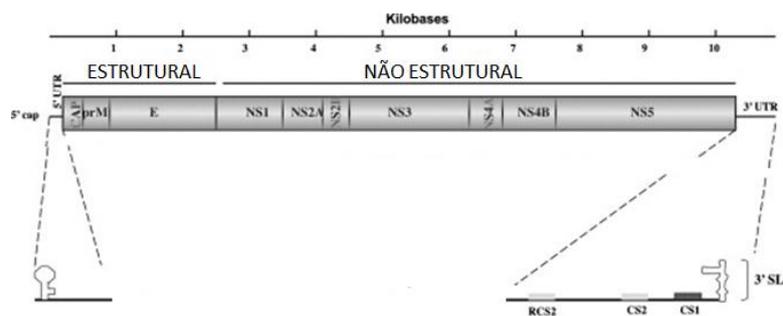


Figura 2: Desenho esquemático do genoma do DENV (Adaptado de WEAVER & VASILAKIS, 2009).

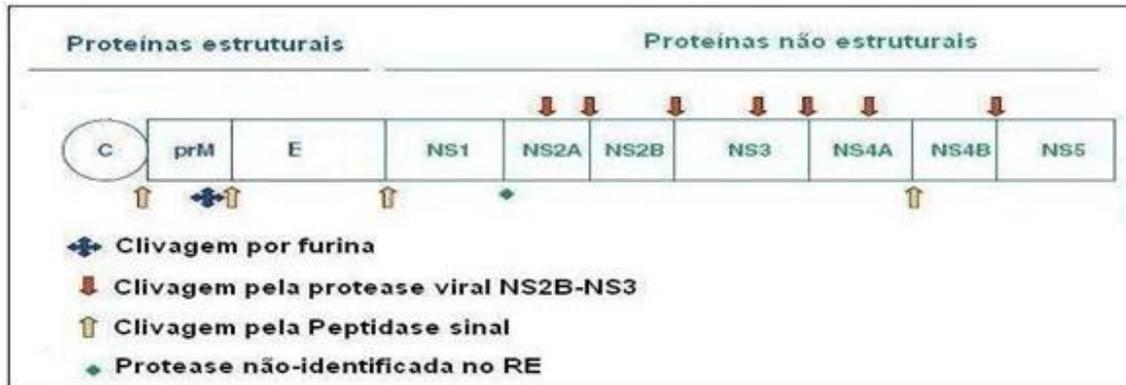


Figura 3. Proteínas responsáveis pela clivagem da poliproteína viral (Adaptado de MELINO & PACI, 2007).

## 2.4 PROTEÍNAS VIRAIS

### 2.4.1 Proteínas Estruturais

A proteína C, de aproximadamente 11 Kilodaltons (kDa), é uma pequena proteína altamente básica, em acordo com seu papel na formação do complexo ribonucleoproteico empacotando o RNA genômico (LINDENBACH & RICE, 2003). Resíduos carregados estão concentrados nas extremidades N e C-terminal da proteína C, separados por uma região interna hidrofóbica que medeia à associação com a membrana. A proteína C madura forma um dímero com cada monômero contendo quatro alfa-hélices. A ligação ao RNA e a interação com a superfície da membrana se baseia numa distribuição assimétrica de resíduos carregados positivamente e resíduos hidrofóbicos (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A prM é uma glicoproteína precursora da proteína M, e possui peso molecular de, aproximadamente, 26 kDa. A principal função da prM é impedir que a proteína E sofra um rearranjo catalizado por ácido para a forma fusogênica durante o trânsito através da via secretora. O segmento “pr” na posição N-terminal contém de um a três sítios de glicosilação e seis resíduos conservados de cisteínas, de modo que esta porção é clivada por uma protease celular furina, residente no compartimento de Golgi durante a exocitose do vírus, permitindo que a proteína M

forme um dímero e fique ancorada no envelope viral, e o segmento “pr” seja liberado no meio extracelular (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH & RICE, 2003; LINDENBACH *et al.*, 2007).

A proteína E possui peso molecular de aproximadamente 53 kDa e é a maior proteína na superfície da partícula viral. Essa proteína é sintetizada como uma proteína de membrana tipo I contendo 12 resíduos conservados de cisteínas. A dimerização adequada, a estabilidade em baixo pH e sua secreção dependem da sua co-expressão com a proteína prM (LINDENBACH *et al.*, 2007). Tem importantes atividades biológicas como montagem da partícula viral, ligação ao receptor celular, fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, e é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (CHAMBERS *et al.*, 1990). A proteína E é glicosilada e forma homodímeros, sendo que cada monômero é constituído de três domínios distintos, denominados: domínio I, que constitui a região central N terminal; domínio II, o qual compreende uma região de dimerização e contém o peptídeo de fusão; e o domínio III na porção C terminal, o qual está envolvido na ligação ao receptor e é o maior alvo de anticorpos neutralizantes, por isso sugere-se que este domínio contém resíduos responsáveis pelo tropismo e virulência nos flavivírus (WHITEHEAD *et al.*, 2007) (Figura 4).

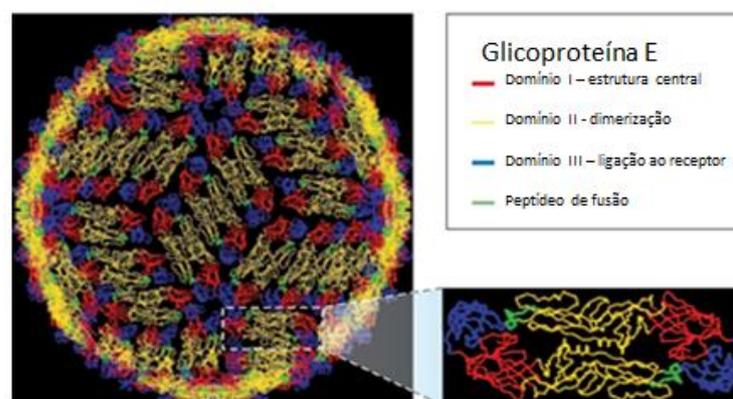


Figura 4. Monômero da glicoproteína E e seus domínios (Adaptado de WHITEHEAD, *et al.*, 2007).

#### 2.4.2 Proteínas Não-Estruturais

A proteína NS1 é uma glicoproteína de peso molecular em torno de 46 kDa, contém dois ou três sítios de glicosilação além de 12 resíduos de cisteína altamente conservados que formam pontes de dissulfeto. Essa glicoproteína está localizada no interior do retículo endoplasmático, mas também pode ser encontrada associada à membrana celular e livre no meio extracelular (forma solúvel), essa forma solúvel produzida em altas quantidades nas primeiras 48 horas pós-infecção, é alvo da resposta imune do hospedeiro (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH & RICE, 2003; LINDENBACH *et al.*, 2007).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas. A NS2A é uma pequena proteína, de peso molecular em torno de 22 kDa, com um importante papel no processamento da NS1. A NS2B é uma proteína de peso molecular de 14 kDa e está associada à membrana. Enquanto NS4A (16kDa) e NS4B (27kDa) apesar de suas funções serem desconhecidas, podem estar associadas aos complexos de replicação funcionando como co-fatores (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A proteína NS3, peso molecular em torno de 69 kDa, é altamente conservada entre os flavivírus sendo relacionada a funções enzimáticas na replicação e no processamento da poliproteína. A porção N-terminal da proteína NS3 possui atividade de serina protease na clivagem pós-traducional da poliproteína viral, enquanto a porção C-terminal possui atividade de nucleotídeo trifosfatase (NTPase), RNA trifosfatase (RTPase) e de helicase (CHAMBERS *et al.*, 1990). Estas funções da porção C-terminal ainda não estão completamente elucidadas. Sugere-se uma interação entre as proteínas NS2A e NS3, especificamente ao domínio de helicase da NS3, para a replicação do RNA viral, de modo que NS2A atua como co-fator (LINDENBACH & RICE, 2003). Há indícios de que a atividade proteolítica das proteínas não estruturais esteja relacionada com a formação do complexo NS2B-NS3. A NS2B possui relação com a ativação da função serina protease da NS3, portanto atuando como importante co-fator (LINDENBACH & RICE, 2003; LINDENBACH *et al.*, 2007).

A proteína NS5 possui peso molecular em torno de 103 kDa, é a maior proteína entre os flavivirus, altamente conservada, atua como RNA polimerase RNA

dependente e localiza-se no citoplasma. A NS5 também apresenta atividade de metiltransferase envolvida na formação do terminal cap 5' do RNA viral (CHAMBERS *et al.*, 1990).

## 2.5 CICLO VIRAL

### 2.5.1 Ciclo de transmissão e Interação do vírus com o vetor

Dois ciclos de transmissão são descritos para o DENV: um é denominado ciclo endêmico/epidêmico urbano, o qual envolve o hospedeiro humano e o vetor *Aedes aegypti*, e secundariamente o *Aedes albopictus* e outros mosquitos do gênero *Aedes*. O outro ciclo é o zoonótico/selvagem, o qual tem sido descrito nas florestas da África e Malásia envolvendo primatas não humanos como hospedeiros vertebrados e diferentes mosquitos do gênero *Aedes* e *Ochlerotatus* como vetores (GUBLER, 1998; WANG *et al.*, 2000) (Figura 5).

A principal espécie transmissora do DENV é o mosquito *Aedes aegypti*, apesar de que outras espécies, como o *A. albopictus*, o *A. scutellaris* e o *A. polyniensis*, transmitirem o vírus principalmente na Ásia e na Oceania. Nas Américas não se verificou, até o momento, a transmissão de DENV pelo *A. albopictus*. O *A. aegypti* apresenta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, essa intensa disseminação da doença está intimamente relacionada à degradação ambiental, a elevada umidade e a temperatura. Com o desenvolvimento da sociedade humana, modifica-se o hábitat ao seu redor, favorecendo as condições de proliferação do mosquito. O *Aedes aegypti* é uma espécie que se adaptou ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, e a sua convivência com o homem é favorecida pela utilização de recipientes artificiais para o desenvolvimento de suas formas imaturas, condição que torna esta espécie predominantemente urbana (CASEIRO *et al.*, 2012).

Os mosquitos adultos não apresentam grande dispersão. Os machos costumam permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento. As fêmeas apresentam hábitos diurnos e, quando “grávidas”, praticam hematofagia, visto que o sangue humano é essencial para o desenvolvimento dos ovos. O ciclo de transmissão do DENV tem início a partir da picada do mosquito em uma pessoa contaminada, onde o vírus presente na circulação é ingerido pelo artrópode. Uma vez presente no mosquito, o vírus se multiplica no intestino médio e, após algum tempo de incubação extrínseca que varia de 8 a 10 dias, são encontrados vírus também no ovário (onde pode ocorrer a transmissão transovariana ou vertical), sistema nervoso e nas glândulas salivares, local este por onde o vírus é passível de transmissão horizontal. Após a pessoa receber a picada infectante, o vírus passa por um período de incubação intrínseco que pode variar de 3 a 14 dias até que ocorra o aparecimento dos sintomas. Uma vez na circulação sanguínea de um novo hospedeiro, o vírus passa a se multiplicar em células permissivas de órgãos específicos, como baço, fígado e tecidos linfáticos (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

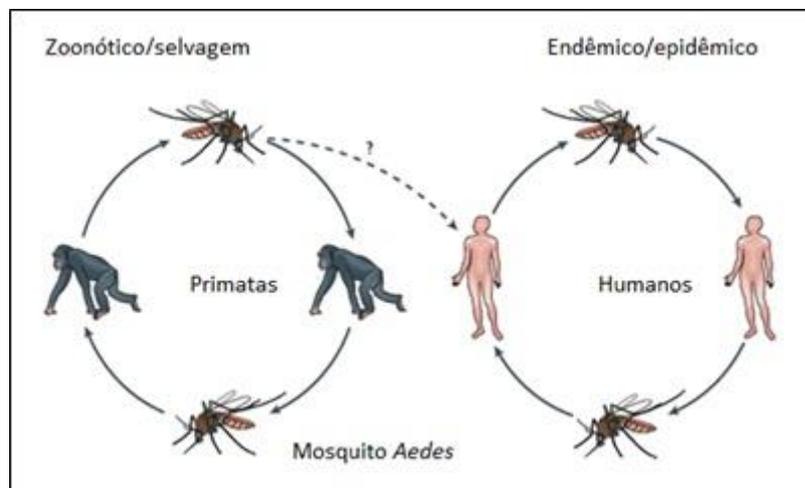


Figura 5. Ciclos de transmissão do DENV (Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007).

### 2.5.2 Interação do vírus com o hospedeiro

Em geral, os sítios de penetração viral incluem as mucosas do trato respiratório, gastro-intestinal, urogenital, superfície dos olhos (membranas conjuntiva ou córnea)

e pele. A pele de muitos animais é uma barreira efetiva contra infecções virais porque a sua camada externa (epiderme) é composta de uma camada de células mortas, queratinizadas que não favorece a proliferação viral. Entretanto a epiderme é suportada por uma derme e tecidos subdermais altamente vascularizados, por onde os vírus que são introduzidos através de arranhões ou injúrias, picadas de vetores, mordida de animais ou punção com agulha podem alcançar os vasos sanguíneos, tecidos linfáticos e células do sistema nervoso e como consequência se espalharem para outros sítios no corpo (FLINT *et al.*, 2004).

O DENV tem tropismo por um amplo espectro de células humanas e o principal alvo da infecção pelo vírus ainda é controverso. Há um consenso geral de que células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans) são os alvos primários. No entanto, existem evidências de que o vírus é capaz de infectar também linfócitos B, linfócitos T, células natural killer, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (ANDERSON, 2003; CLYDE *et al.*, 2006).

### **2.5.3. Ciclo de replicação**

Após o DENV ser introduzido no hospedeiro, inicia-se o ciclo de replicação viral (Figura 6), e este consiste no desencadeamento de uma série de eventos ao nível da célula hospedeira permissiva, os quais são: adsorção, penetração, desnudamento, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais (ANDERSON, 2003; CLYDE *et al.*, 2006).

Acredita-se que o vírus interaja inicialmente com células dendríticas residentes na pele, conhecidas como células de Langerhans, as quais tem se mostrado mais permissivas a infecção. Estas células expressam o receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin (DC-SIGN, codificado pelo CD-209), ao qual se liga a proteína viral E, que contém sítios de ligação ao receptor (WU *et al.*, 2000). Embora outros receptores foram descritos, como Heparin Sulfato,

proteína de choque térmico 70 (Hsp70), Hsp90, GRP78/BiP e CD14, a interação mais bem caracterizada é entre o vírus e o receptor DC-SIGN. Estudos recentes sugerem que a entrada do vírus via endocitose envolva dois ou mais receptores: um receptor de baixa afinidade, como o DC-SIGN, que inicialmente capturaria o vírus na superfície celular aumentando a concentração local; e outro, menos comum, mas de alta afinidade, que possibilitaria a internalização da partícula viral (CLYDE *et al.*, 2006).

Após a ligação da glicoproteína E aos receptores de superfície celular, a partícula viral é internalizada em um compartimento endossomal. Na partícula viral madura, a glicoproteína E ocorre na forma de homodímeros, com o peptídeo de fusão inacessível. Sob as condições de pH baixo encontrada nos endossomos, os homodímeros da glicoproteína E se dissociam em monômeros e, em seguida, se re-associam formando trímeros irreversíveis, expondo assim o peptídeo de fusão presente no domínio II. No processo de fusão, o trímero da glicoproteína E estende-se em direção a membrana do endossomo, e o peptídeo de fusão se insere nesta. A fusão de membranas endossomal e viral possibilita a penetração do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira e o desnudamento do genoma viral (MUKHOPADHY *et al.*, 2005) (Figura 7).

Visto que a maquinaria de replicação viral não se encontra empacotada na partícula viral, o primeiro evento realizado pelo vírus no citoplasma das células é a tradução do seu genoma para gerar o complexo de RNA replicase viral, a fim de estabelecer uma infecção produtiva. Tradução e replicação de vírus fita positiva ocorre em associação com estruturas membranosas intracelulares. A tradução de DENV ocorre em associação com membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso (RER) e, como o genoma viral exerce o papel de RNA mensageiro, há a tradução das proteínas virais produzindo uma longa poliproteína, esta é clivada em três proteínas estruturais, atividade realizada por uma peptidase da célula hospedeira, e sete proteínas não estruturais, atividade da serina protease NS3 viral. O genoma viral atua também como fita molde para sua replicação, então após a sua tradução inicial, começa-se a produção de RNA viral, que envolve a síntese de fita de RNA negativa intermediária, a qual serve de molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico de polaridade positiva (CLYDE *et al.*, 2006).

O genoma viral além de servir como RNA mensageiro, direcionando a síntese de proteínas virais; atua como fita molde para a replicação do genoma, no final, é envolto por proteínas virais para compor a partícula viral. A montagem das partículas virais ocorre em associação com o RER da célula hospedeira. As partículas virais são liberadas para a superfície do RER, momento em que adquirem uma membrana lipídica, e assim a progênie viral é transportada para o sistema de Golgi, de onde é liberada em vesículas até a membrana plasmática, e por fim as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pelo mecanismo de exocitose. Antes da exocitose, ocorre a maturação para produzir uma partícula viral infecciosa com a clivagem proteolítica da proteína prM em M pela protease celular furina (CHAMBERS *et al.*, 1990; CLYDE *et al.*, 2006).

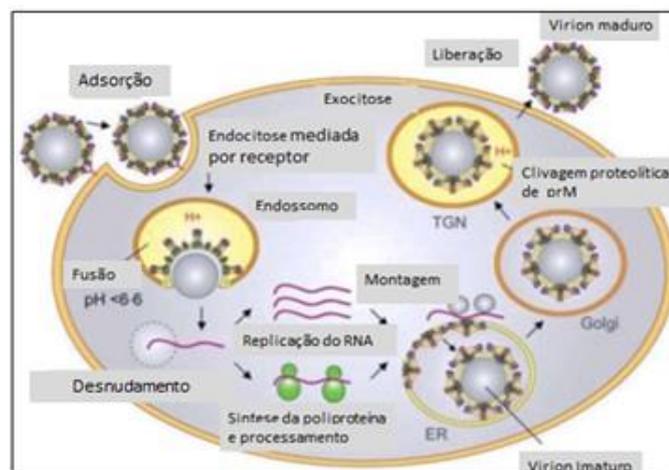


Figura 6. Esquema do ciclo de replicação do vírus Dengue no interior da célula hospedeira humana (Adaptado de STIASNY & HEINZ, 2006).

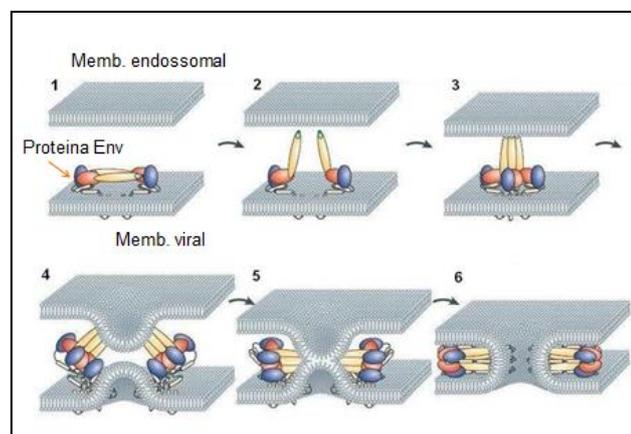


Figura 7. Fusão da membrana endossomal com a membrana viral (Adaptado de MUKHOPADHY *et al.*, 2005).

## 2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA

As infecções pelo DENV podem se apresentar sob as formas assintomática e sintomática, e esta última pode se manifestar por meio de duas formas clínicas principais: a febre clássica da dengue (FD) e a febre hemorrágica da dengue (FHD), com ou sem síndrome do choque da dengue (SCD), podendo levar o paciente a óbito (WHO, 2012).

Apesar de inúmeros estudos já realizados, não existem evidências conclusivas ligando causa e efeito que determinam porque certos indivíduos têm apenas FD geralmente branda e outros desenvolvem FHD com ou sem SCD. A FHD ocorre como consequência de um mecanismo muito complexo, onde o vírus e a resposta imune do hospedeiro interagem para determinar a severidade da doença (CLYDE *et al.*, 2006).

A FD é a manifestação sintomática menos grave da doença, começando com uma febre alta de início súbito, dores de cabeça, dor nos olhos, náuseas, vômitos, mialgia, artralgia, dor abdominal, calafrio e exantema. Após um período de cinco a sete dias, há o término do ciclo infeccioso. Ocorre, então, melhora no quadro da doença, sendo que o indivíduo ficará protegido para o sorotipo que o infectou. Os pacientes com FD geralmente se recuperam dos sintomas sem complicações nem sequelas dentro de dez dias após o início da doença (GUBLER, 1998).

Há um período considerado crítico na doença que, em geral, ocorre após o terceiro dia de infecção. O paciente deixa de ter febre, embora a sensação de cansaço, fraqueza e mal-estar continuem. Esta manifestação pode levar a uma falsa sensação de melhora, porém, em seguida, ocorre piora no quadro clínico do paciente. Podem surgir algumas manchas vermelhas e pruridos na pele, consequência do extravasamento do plasma. Em função da inflamação dos vasos ocasionada pela instalação dos vírus no tecido que os envolvem, há um grande consumo de plaquetas. A falta de plaquetas interfere na homeostase do organismo, que passa a apresentar forte tendência hemorrágica. Esta é a típica manifestação da FHD, a qual apresenta quadro clínico semelhante à FD, porém surgem hemorragias

gastrintestinais, cutâneas, gengivais e nasais leves e/ou severas, além de tontura e queda de pressão (KURANE & TAKASAKI, 2001).

Outras apresentações clínicas causadas pelo DENV é o envolvimento neurológico. A infecção viral no SNC inclui encefalopatia, encefalomielite aguda e mielite transversa. A encefalopatia consiste em uma das manifestações mais graves da infecção causada pelo DENV. Diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo disfunção hepática, edema cerebral (causado pelas alterações vasculares as quais levam ao extravasamento vascular cerebral), hipoperfusão (devido a distúrbios na circulação) e encefalite. Outras manifestações neurológicas, como consciência alterada, ataques de epilepsia, espasmos dos membros, hemiplegia (paralisia de um dos lados do corpo), também foram reportados em 5,4% dos pacientes com dengue (MALAVIGE *et al*, 2004).

Nos casos graves de FHD, a SCD pode ocorrer entre o 3º e o 7º dia de infecção. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular seguido de aumento na quantidade de glóbulos vermelhos no sangue e falência circulatória. É de curta duração e pode levar a óbito em 12 a 24 horas ou a recuperação rápida após terapia antichoque apropriada. FHD e SCD são doenças primariamente encontradas em crianças, em áreas hiperendêmicas, nas quais os quatro sorotipos circulam (KURANE & TAKASAKI, 2001).

## 2.7 PATOGENIA DA DENGUE

Enquanto que, em décadas passadas, ocorreram importantes avanços na biologia do DENV, incluindo descoberta de determinantes estruturais da partícula viral e principais proteínas virais, elucidação do processo de tradução e replicação e caracterização funcional das proteínas virais, a patogênese do DENV continua a ser um desafio. Uma complexa interação de fatores virais e do hospedeiro ainda não totalmente compreendida. Fatores de risco para a forma grave da doença incluem idade, sorotipo e genótipo viral e antecedentes genéticos do hospedeiro, entre

outros. Estudos prospectivos e retrospectivos em seres humanos têm demonstrado que a infecção secundária por um sorotipo heterólogo é o maior fator de risco para FHD/SCD, embora a capacidade de causar a doença grave em infecções primárias varia de acordo com o sorotipo do DENV (CLYDE *et al.*, 2006).

Destacam-se duas hipóteses que envolvem os mecanismos imunológicos do hospedeiro e aspectos virais. Um dos mecanismos postula que o risco em desenvolver FHD, em infecções secundárias envolvendo uma resposta imunológica do paciente, definida como Intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (Antibody-dependent Enhancement - ADE). A infecção com um sorotipo do DENV resulta em imunidade àquele sorotipo apenas, a resposta imunológica ao sorotipo primário causa reação cruzada contra outros sorotipos apenas durante os primeiros meses após a infecção. Acredita-se que a proteção sorotipo-específica é devido aos anticorpos neutralizantes, as células T de memória específica para DENV, ou a ambos. Ambos os anticorpos policlonais e monoclonais do soro contra as proteínas prM e E são capazes de neutralizar DENV *in vitro* e, em conjunto com anticorpos para NS1 fornecer proteção *in vivo*. Assim, uma vez a pessoa infectada por um sorotipo, ela terá anticorpos homotípicos e heterotípicos, que conferem imunidade em longo prazo para este sorotipo, porém quando infectada por um sorotipo diferente, há reação cruzada com anticorpos heterotípicos pré-existentes que reconhecem o vírus formando imunocomplexos. No entanto, estes anticorpos possuem baixa avidéz (incapaz de neutralizar o novo sorotipo), sendo internalizados por macrófagos através de receptores Fc, e assim, podem replicar no interior destas células (CLYDE *et al.*, 2006; GUBLER, 1998; KURANE, 2007) (Figura 8). A infecção celular permite a secreção de citocinas próinflamatórias e ativação do sistema complemento (C3a e C5a solúveis), que podem estar associados com a severidade do quadro clínico (KURANE, 2007).

Este processo permite que um amplo número de células sejam infectadas, podendo levar a uma grande carga viral, particularmente no início da infecção. Numerosos estudos na Ásia e nas Américas tem confirmado que a infecção secundária é um importante fator de risco para a doença severa, embora existem casos de FHD associados com infecção primária e certamente muitas infecções secundárias não causam doença severa (CLYDE *et al.*, 2006).

O mecanismo também modulador da patogenia é o grau de virulência. Cepas mais virulentas foram associadas a casos de FHD enquanto cepas menos virulentas, com quadros de FD. Esta relação foi feita a partir da introdução da cepa de DENV2 de origem do sudeste asiático, que entrou na região do Caribe coincidindo com o aumento de casos FHD nas Américas, ao passo que uma cepa denominada americana já circulante no continente foi atribuída aos casos FD (KURANE, 2007; RICO-HESSE *et al.*, 1997).

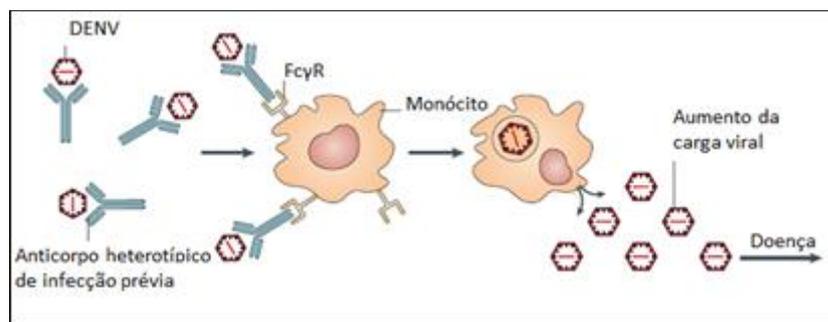


Figura 8. Mecanismo de ação do fenômeno conhecido como aumento da infecção dependente de opsonização por anticorpo (ADE) (Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007).

## 2.8 HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

O relato mais antigo de uma infecção com características clínicas compatíveis com a Dengue consta em uma enciclopédia de medicina chinesa, publicada durante a dinastia Chin, datada do ano 265 a 420 d.C. Entretanto, os primeiros registros de grandes epidemias possivelmente causadas pelo DENV foram descritos entre os anos de 1779 e 1780 atingindo os três continentes (Ásia, África e América) (GUBLER, 1998).

A perturbação ecológica no sudeste da Ásia durante e após a segunda Guerra Mundial criou condições ideais para o aumento de doenças transmitidas por mosquitos, e foi neste cenário que uma pandemia global de Dengue começou. Com o aumento de epidemias e a co-circulação de vários sorotipos do DENV (hiperendemicidade na região) em cidades do sudeste da Ásia uma doença severa recentemente descrita como FHD surgiu. O registro da primeira epidemia de FHD

ocorreu em Manila, Filipinas entre 1953 e 1954, mas dentro de 20 anos a ocorrência de casos severos se espalharam rapidamente por todo o sudeste asiático. Pelos meados dos anos 1970, a FHD se tornou a principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região asiática e foi nesta década de 70 que a Dengue foi reintroduzida nas Ilhas do Pacífico e a atividade epidêmica aumentou nesta região e nas Américas. Durante os anos 1980 e 1990, epidemias de Dengue se intensificaram e existiu uma ressurgência global de FD com expansão geográfica da distribuição de mosquitos vetores e vírus, aumentando a incidência da doença causada pelo aumento da frequência epidêmica e da emergência de FHD em muitos países. Na Ásia, nos anos 1980, epidemias de dengue se espalharam para países na região oeste como a Índia, Paquistão, Sri Lanka, Ilhas Maldivas e leste da China. Várias Ilhas da região do Pacífico Central e Sul sofreram maiores ou menores epidemias de dengue. As mudanças epidemiológicas nas Américas, entretanto, têm sido mais dramáticas. Em 1950, 1960, e parte dos anos 1970 eram raras epidemias de dengue na região americana porque o principal mosquito vetor, *Aedes aegypti*, havia sido erradicado da América Central e Sul para o controle da febre amarela urbana nas Américas (Figura 9). Com a interrupção do programa de erradicação no início dos anos 1970, esta espécie começou a reinvasar os países onde tinha sido erradicada e já na década de 1990 o *A. aegypti* tinha quase recuperado a distribuição geográfica que tinha antes da erradicação (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998).

A incidência da Dengue tem crescido dramaticamente ao redor do mundo nas últimas décadas (Figura 10). Estima-se hoje que cerca de 2,5 bilhões de pessoas, em torno de 40% da população mundial, estão sob o risco de infecção pelo DENV. Por volta de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas a cada ano e, dentre esses casos, 250 a 500 mil pessoas desenvolvem a forma mais grave da doença (WHO, 2012).

Diversos fatores contribuíram para a ressurgência de epidemias no final do século XX e, também, para o aparecimento da FHD, considerados atualmente um problema global de saúde pública. Entre esses fatores, pode-se citar o grande crescimento da população mundial associado à urbanização das cidades, realizada muitas vezes sem prévio planejamento e/ou controle. Este fato contribui para a decadência da

infraestrutura na saúde pública em diversas regiões, criando com isto condições ideais para o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos. Outro fator importante está relacionado à falta de controle efetivo do mosquito transmissor *A. aegypti* em áreas endêmicas. Ao contrario, tem ocorrido um aumento na distribuição geográfica e na densidade populacional do mosquito, especialmente em centros urbanos de regiões tropicais, devido ao aumento de hábitat propicio para o desenvolvimento de suas larvas em ambientes domésticos. Outro fator responsável é o aumento da mobilidade humana, principalmente em viagens aéreas, o que possibilitaria o mecanismo ideal para o transporte do transmissor da Dengue e de outros patógenos urbanos. Muitas pessoas que viajam para países tropicais onde a Dengue é endêmica podem ser infectadas e manifestar os sintomas apenas no retorno para casa, resultando em uma constante movimentação dos agentes infectantes, garantindo repetidas introduções de novas cepas virais e novos sorotipos em regiões onde o mosquito vetor ocorre (GUBLER, 1998; RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998).

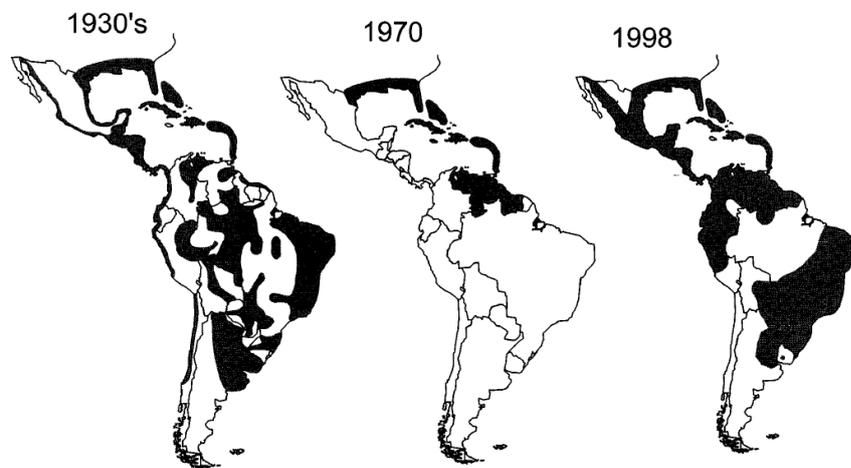


Figura 9. Distribuição do *Aedes aegypti* nas Américas durante os anos 1930, 1970 e 1998 (GUBLER, 1998).

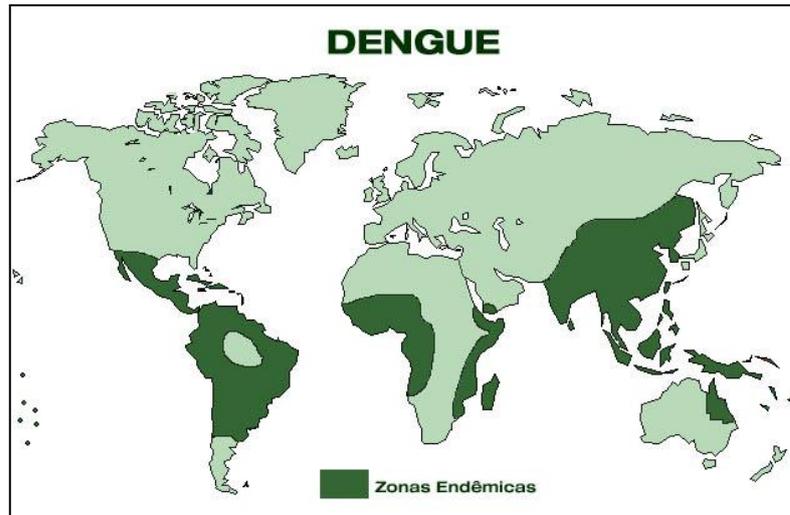


Figura 10. Distribuição mundial do DENV (WHO, 2012).

### 2.8.1. Epidemiologia no Brasil

Os primeiros casos da doença causada pelo DENV no Brasil datam do século XIX até o início do século XX. Durante a erradicação da febre amarela em 1903 no país, houve também erradicação do mosquito transmissor do DENV, fato demonstrado pela ausência de surtos de Dengue registrados entre 1923 e 1981. Com o ressurgimento da circulação do mosquito, em 1967, deu-se início a uma nova onda de epidemias. Os primeiros casos de dengue foram documentados clinicamente e laboratorialmente em Boa Vista, Roraima, em 1982, durante uma epidemia que identificou os sorotipos DENV1 e DENV4 como os responsáveis pela epidemia de FD. Posteriormente, no período de 1986 a 1989, surgiram outras epidemias de FD, as quais resultaram na disseminação do DENV1 pelo Brasil, atingindo inicialmente estados da região Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e posteriormente da região Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia) (OSANAI, 1983; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998). Desde então, o DENV dispersou-se pelo país, e em 1990, uma nova epidemia de dengue ocorreu no estado do Rio de Janeiro com a entrada de um novo sorotipo no país, o DENV2. O primeiro registro confirmado de DENV3 foi também no estado do Rio de Janeiro em 2001, contribuindo para a maior incidência da doença em todo o país (CÂMARA *et al.*, 2007). Em 2008, reaparecem casos de infecções causados por DENV4 em Manaus (AM) (FIGUEIREDO *et al.*

2008), entretanto, este achado não foi confirmado pelo Laboratório do Ministério da Saúde nem pela Fiocruz, de acordo com nota técnica publicada pelo Ministério da Saúde. Segundo Temporão e colaboradores (2011), DENV4 reemergiu em 2010, em Boa Vista (RO), mesmo estado em que tinha sido detectado há 28 anos (MS, 2010).

Atualmente, os sorotipos DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 circulam simultaneamente na maioria dos estados da Federação, contribuindo para a maior incidência das formas graves da doença. As atividades de vigilância epidemiológica em 2012 destacam o predomínio da circulação do sorotipo DENV4 no país, presente em 63% das amostras positivas para a doença. Esse cenário, associado às condições ambientais que permitem a manutenção do mosquito *Aedes aegypti* em nossas cidades serve de alerta para a possibilidade de persistência da transmissão durante 2013 (MS, 2012).

Durante janeiro ao início de novembro de 2012 no país, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, foram notificados 565.510 casos de dengue, contra 727.803 em 2011 – diminuição de 22%. A queda foi observada em 16 estados e no Distrito Federal, com exceção dos estados de Roraima, Tocantins, Piauí, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Rio de Janeiro, Sergipe, Bahia e Mato Grosso. Dos casos notificados, 76% estão concentrados em oito estados: Rio de Janeiro (179.518); Ceará (54.591); Bahia (48.653); Pernambuco (33.487); Mato Grosso (29.910); São Paulo (28.767); Rio Grande do Norte (27.230) e Alagoas (27.743). O número de casos graves de Dengue caiu 64% em comparação a 2011. A queda foi muito maior se forem considerados os números de 2010 – percentual de redução de 78%. Enquanto de janeiro ao início de novembro em 2010, os casos graves da doença chegaram a 17.027, no mesmo período de 2012, o número caiu para 3.774. A tendência de queda já havia sido percebida em 2011 quando foram registrados 10.507 casos graves (MS, 2012).

Dos 26 estados, 23 mais o Distrito Federal apresentaram reduções importantes de casos graves em 2012, com exceção de Alagoas, Mato Grosso e Goiás, onde houve aumento. O estado que apresenta maior redução é o Amazonas com queda de 96% em relação ao mesmo período do ano passado, seguido pelo Acre (94%), Roraima (94%) Paraná, (93%), São Paulo (83%), Espírito Santo (78%) e Rio de Janeiro

(76%). A quantidade de óbitos por Dengue, no Brasil, também apresentou queda de 62% em comparação com 2010. De janeiro até a primeira semana de novembro, foram confirmados 247 óbitos, sendo que no mesmo período de 2010 foram 650 óbitos. Se a comparação for feita com o ano passado, quando ocorreram 481 mortes, o percentual de queda é de 49%. Seguindo a mesma tendência de redução de casos, 15 estados e o Distrito Federal apresentaram redução no número de óbitos. Destaque também para os estados do Amapá, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e o Distrito Federal que não apresentaram nenhuma morte (MS, 2012).

### **2.8.2 Epidemiologia na Bahia**

A introdução do DENV na Bahia em 1987 ocorreu pelo município de Ipupiara (Oeste do Estado). O sorotipo identificado foi o DENV1 e cerca de 623 casos foram notificados como suspeitos. Ao ser eliminado o mosquito vetor, o vírus deixou de circular, entretanto o DENV voltou a ser detectado na Bahia em 1994, quando o DENV2 foi introduzido em uma cidade do extremo Sul do Estado, disseminando-se em seguida. O vírus circulou em todas as zonas climáticas do estado o que revela o seu elevado poder de transmissão. A maior intensidade de detecção de casos e expansão territorial foi nas regiões úmidas e semi-úmidas do litoral, ideais para a sobrevivência e proliferação do vetor, e também, por serem mais densamente povoadas (MELO *et al*, 2010).

Em 2002, com a introdução do DENV3 no Estado, ocorreu a mais severa epidemia já relatada. E em março de 2011, no município de Salvador foram identificados os primeiros casos de DENV4 no Estado, e desde então foi isolado em mais de sete municípios, sendo que a partir do mês de agosto/2011 tornou-se o sorotipo predominante na capital. Em 2012, o DENV4 foi isolado em 33 municípios e representa o principal sorotipo circulante no Estado da Bahia até o momento (82,2% do total de vírus identificados pelo exame de isolamento viral) (MS, SESAB, 2012) (Gráfico 1).

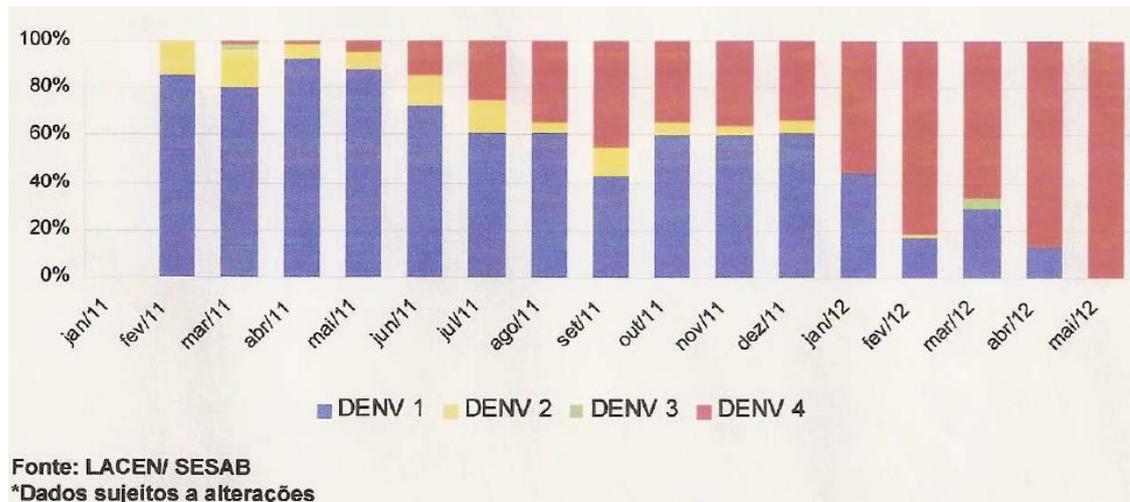


Gráfico 1. Distribuição mensal dos sorotipos do DENV identificados por isolamento viral, Bahia, 2011 e 2012\* (LACEN/SESAB, 2012).

### 2.8.3 Epidemiologia Molecular

O DENV, como outros vírus de RNA, apresentam uma alta taxa de mutação devido à ausência de atividade de *proofreading* (capacidade de correção do erro cometido) da RNA polimerase viral (CLYDE *et al.*, 2006). Esta alta taxa de mutação do DENV seria o fator determinante da alta variabilidade genética observada neste vírus, porém, outros estudos mostraram que a alta taxa de replicação viral, recombinações gênicas, susceptibilidade do hospedeiro e fluxo gênico dos sorotipos do DENV têm causado também predisposição dos mesmos a diversidade genética (HOLMES & BURCH, 2000).

A evolução do DENV tem sido importante para a virulência do mesmo em humanos e para a epidemiologia da Dengue. As maiorias das filogenias mostram que o DENV4 divergiu primeiro, seguido do DENV2, e por fim o DENV1 e o DENV3 (WEAVER & VASILAKIS, 2009).

As pequenas diferenças no genoma viral entre isolados de DENV de diferentes regiões geográficas em várias áreas endêmicas do mundo possibilitou, então, dividir um sorotipo em classes ou clados intrasorotípicos (chamados genótipos) utilizando o

sequenciamento parcial de regiões do genoma viral (FERNANDEZ *et al.*, 2011; KLUNGTHONG *et al.*, 2004; LANCIOTTI *et al.*, 1994, 1997; RICO-HESSE, 1990; RICO-HESSE *et al.*, 1997).

O marco inicial na análise da variação intra-sorotípica no DENV foi conduzido por Rico-Hesse (1990) que usou um fragmento de 240 pb a partir da região do gene E/NS1 para mensurar a diversidade genética em DENV1 e DENV2. Com isso, ela reconheceu um número de distintos “genótipos”, arbitrariamente definido como “um grupo de DENV que não tem mais do que 6% de divergência na sequência”. A primeira forte evidência de determinantes genéticos para severidade de DENV surgiu também através de estudos por Rico-Hesse e colaboradores (1997) a partir de DENV2, que indicou que genótipos asiáticos estão associados com doença severa enquanto que o genótipo americano a forma mais tolerante. Desde então, o número de estudos de genotipagem aumentou significativamente (HOLMES & TWIDDY, 2003; LANCIOTTI *et al.*, 1994, 1997; LEWIS *et al.*, 1993; RICO-HESSE *et al.*, 1997).

Estudos de epidemiologia molecular têm sugerido a importância de fatores virais para o desenvolvimento de FHD/SCD. Embora não tenha sido possível estabelecer uma correlação clara entre um sorotipo particular do DENV ou genótipo(s) e a gravidade do estado da doença, tem havido indicações que certos genótipos de DENV2 e DENV3 estão associados com FHD (CLYDE *et al.*, 2006). Leitmeyer *et al.* (1999) analisando o genoma viral completo de DENV2 dos genótipos asiático e americano mostrou seis substituições nos genes prM, E, NS4B e NS5, que podem alterar a replicação viral e aumentar a interação do vírus com células-alvo do hospedeiro, destacando o papel do aminoácido 390 na proteína do envelope (mutação neste aminoácido altera a força de ligação do vírus às células hospedeiras). Também havia diferenças quanto à estrutura secundária do RNA, nas regiões 3’NTR e 5’NTR envolvidos na replicação e regulação viral. Entretanto mais estudos moleculares de DENV se fazem necessário para identificar importantes marcadores de virulência na região estrutural do genoma viral, assim como determinar se substituições de aminoácidos têm associação com severidade da infecção (CLYDE *et al.*, 2006).

Uma vez que vários genes podem ser usados para genotipagem do DENV por análise filogenética, a(s) sequência(s) alvo(s) pode ser selecionada(s) com base no objetivo do estudo. Por exemplo, se o objetivo do estudo é apenas a classificação do vírus, então a seleção de uma sequência de gene curto com elevados valores de bootstrap que suportam os nós principais é provavelmente a escolha mais eficiente. No entanto, se para além da identificação do genótipo, o gene alvo também for utilizado para estudos de evolução viral e análise de pressão seletiva, os genes nos quais as mutações têm efeito direto sobre as funções biológicas como ligação ao receptor, fusão de membranas, replicação, tradução podem ser alvos mais apropriados (KLUNGTHONG *et al.*, 2008). A maioria dos estudos realizados usando sequências de nucleotídeos, principalmente do gene E, identificaram 3 genótipos para DENV1, 5 para DENV2, e 4 para DENV3 e DENV4 (LEWIS *et al.*, 1993; LANCIOTTI *et al.*, 1994, 1997; RICO-HESSE, 1990, 2003; KLUNGTHONG *et al.*, 2004, 2008).

Relativamente poucos estudos abrangendo a diversidade genética do DENV4 foram realizados, particularmente no sudeste da Ásia. DENV4 é particularmente interessante em que foi o primeiro sorotipo a divergir em análises filogenéticas do gênero *Flavivirus* (KUNO *et al.*, 1998; WEAVER & VASILAKIS, 2009), de modo que esse sorotipo pode ter desenvolvido características fenotípicas únicas (KLUNGTHONG *et al.*, 2004). Análises iniciais revelaram que cepas de DENV4 exibiram maior conservação de sequências do que outros sorotipos do DENV (92%) e 96-100% de conservação de aminoácidos na proteína E. DENV4 foi separado inicialmente em dois subtipos: (1) cepas das Filipinas, Tailândia e Sri Lanka, (2) cepas da Indonésia, Ilhas do Caribe, América Central e Sul (LANCIOTTI *et al.*, 1997). Filogenias atuais de sequências do gene E completo delinearam quatro genótipos: (1) genótipo I, cepas representadas a partir da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão; (2) genótipo II, cepas a partir da Indonésia, Ilhas Caribenhas e Américas; (3) genótipo III, representado por linhagens tailandesas que são distintas de outros isolados tailandeses e (4) genótipo IV, cepas silvestres da Malásia (KLUNGTHONG *et al.*, 2004; WEAVER & VASILAKIS, 2009). Essa classificação foi corroborada por Villabona-Arenas e Zanotto (2011) baseando-se também na sequência completa do gene E. Nessa análise filogenética os três genótipos

humanos de DENV4 parecem ter divergido de cepas silvestres há 157 anos (Figura 11).

Dessa forma, pode-se perceber o quanto é importante distinguir genótipos de um mesmo sorotipo, uma vez que o mapeamento da incidência de cada genótipo dentro dos sorotipos permite rastrear a origem do vírus e suas principais rotas de transmissão, além de fornecer dados essenciais para o relacionamento entre genótipos e patogenicidade.

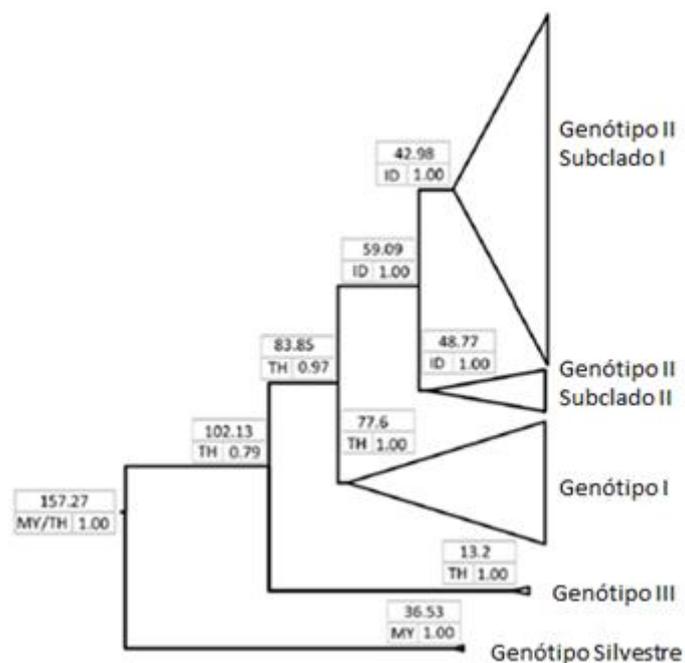


Figura 11. Árvore mostrando as relações filogenéticas dos genótipos de DENV4: genótipo I – Filipinas, Tailândia, Sri Lanka e Japão; genótipo II – Indonésia, Sul do Pacífico e América Latina; genótipo III – linhagens tailandesas distintas de outros isolados encontrados na Tailândia; genótipo IV – isolados silvestres encontrados na Malásia. ID: Indonésia; TH: Tailândia; MY: Malásia. (Adaptado de VILLABONA-ARENAS & ZANOTTO, 2011).

## 2.9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico específico de infecções por DENV pode ser feito por técnicas de isolamento viral, métodos sorológicos, e/ou métodos moleculares (GUBLER, 1998).

A técnica de isolamento viral é realizada através da inoculação de soro de pacientes, até 5 dias após o início da febre (período da viremia), em linhagens celulares de camundongos recém nascidos ou de mosquitos, sendo a mais utilizada células clone C6/36 de *Aedes albopictus* por ser mais econômica e também por possuir uma boa sensibilidade. Após o isolamento, o DENV pode ser identificado e sorotipado, comumente por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos. A confirmação diagnóstica por isolamento viral pode demorar aproximadamente de sete a doze dias (GUBLER, 1998; LANCIOTTI *et al.*, 1992).

Dentre as várias técnicas sorológicas, os métodos de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), e ensaio imunoenzimático para captura de IgM (MAC ELISA) são os mais utilizados. Contudo, as três primeiras técnicas exigem coleta de amostras pareadas e, além disso, exibem alta reatividade cruzada, o que dificulta a especificidade do diagnóstico. Sendo assim, os testes mais utilizados são os imunoenzimáticos de captura que detecta IgM, IgG ou de captura do antígeno viral NS1. Para os pacientes atendidos em emergências de centros de saúde tem-se utilizado o teste rápido para detecção simultânea de anticorpos IgM, IgG e antígeno NS1 (Dengue Duo Dengue Ag NS1 +Dengue IgG/IgM). A IgM começa a ser detectável no soro após quatro dias do início dos sintomas, atingindo níveis máximos em sete a oito dias e começa a diminuir depois de 1 a 2 meses. Já os anticorpos do tipo IgG começam a serem detectados em títulos muito baixos a partir do quarto dia, atingindo títulos máximos em duas semanas e persistem por dois a três anos após a infecção. A IgG possui níveis mais elevados durante as reinfecções e é detectada já nos primeiros dias da doença. Por outra parte, o antígeno NS1 está presente na circulação sanguínea desde o primeiro dia de infecção até aproximadamente o nono dia, inclusive durante as reinfecções (GUBLER, 1998).

Os métodos moleculares baseiam-se na detecção do RNA viral a partir do soro do paciente suspeito durante o período virêmico. O diagnóstico molecular de infecções por DENV utiliza a Transcrição Reversa – seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), e permite classificar os sorotipos de DENV ao utilizar os iniciadores específicos das sequências genômicas de cada sorotipo viral. Real-time

PCR e nested ou hemi-nested PCR são variações dessa técnica também utilizadas (LANCIOTTI *et al.*, 1992).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características moleculares e o diagnóstico da infecção pelo vírus Dengue.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Detectar e identificar os sorotipos do DENV no soro de pacientes por técnicas de biologia molecular (RT-PCR e Nested-PCR).

2 Analisar comparativamente o teste imunocromatográfico rápido e o teste molecular para o diagnóstico do DENV.

3 Sequenciar o Gene E do DENV4 obtido do soro de pacientes.

4 Analisar filogeneticamente o DENV4 detectado na cidade de Salvador.

5 Isolar o DENV4 em cultivo de células de *Aedes albopictus* Clone C6/36 e detectar a resposta imune por Western Blot.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

O presente estudo foi conduzido com amostras (n=214) de soro de pacientes com suspeita de infecção pelo DENV atendidos por uma unidade hospitalar privada (Hospital Aliança) da cidade de Salvador, Estado da Bahia. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Salvador sob protocolo nº 04.10.49 FR: 270807 (Anexo). As amostras utilizadas foram coletadas no período de maio/2011 a maio/2012 e armazenadas a -70°C durante o seu processamento.

### 4.2 DETECÇÃO DO DENV

#### 4.2.1 Detecção molecular

##### 4.2.1.1 *Extração do RNA viral*

A extração do RNA viral (RNA<sub>v</sub>) a partir do soro de pacientes foi realizada utilizando o kit de extração QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Alemanha) seguindo-se as instruções do fabricante. O RNA<sub>v</sub> extraído foi utilizado para identificação dos sorotipos e sequenciamento do gene *E*.

##### 4.2.1.2 *Detecção e Identificação do DENV*

4.2.1.2.1 Detecção do *Flavivirus*: Transcrição Reversa – seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, na sigla em inglês)

Na reação de transcriptase reversa (RT) na presença do iniciador D2 (Quadro 1), foi utilizado o RNAv extraído (Materiais e Métodos 4.2.1.1) (8µl) e uma reação contendo: 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ditioneitol; 10mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) e 2.5 U da enzima Super Script II para um volume final da reação de 20 µl (Super Script II Transcriptase Reversa – Invitrogen, EUA), seguindo protocolo do fabricante. Em seguida o DNA complementar (cDNA) (10µl) obtido na RT foi adicionado à reação contendo: 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 50pmol de cada iniciador (D1 e D2); 2.5U Taq DNA polimerase recombinante e H<sub>2</sub>O Mili-Q para um volume final da reação de 50µl (PCR Super Mix –Invitrogen, EUA), seguindo protocolo do fabricante. As condições do ciclo usadas foram 95°C por 2 min seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s; 55°C por 1 min e 72°C por 2 min. Esses iniciadores amplificam uma região do genoma viral correspondente a junção dos genes da proteína do capsídeo (C) e do precursor da proteína da membrana (*prM*) que possui 511nt de comprimento.

#### 4.2.1.2.2 Detecção de sorotipos: Nested-PCR

O produto de DNA amplificado no RT-PCR foi submetido à Nested-PCR, utilizando o iniciador D1 (Forward) e quatro iniciadores internos tipo-específicos (TS- Reverse) (50pmol de cada iniciador) numa mesma reação contendo: 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 2.5U Taq DNA polimerase recombinante e H<sub>2</sub>O Mili-Q para um volume final da reação de 50µl (PCR Super Mix –Invitrogen, EUA). Esses iniciadores amplificam regiões dentro da junção C/prM com tamanhos diferentes segundo o sorotipo: 482 nt (DENV 1), 119 nt (DENV 2), 290 nt (DENV 3) e 392 nt (DENV4). Essa amplificação ocorreu a 95°C por 2 min seguida de 20 ciclos de 94°C por 30s; 55°C por 1 min e 72°C por 2 min. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 2% submetido em brometo de etídio (10 µg/ml) por 20 minutos, e a visualização dos fragmentos amplificados ocorreu sob luz ultravioleta.

#### 4.2.2 Isolamento viral em cultivo de células

O isolamento viral do DENV no Laboratório de Virologia foi realizado em cultivo de células de *Aedes albopictus* Clone C6/36. Na propagação de células C6/36, utilizou-se o meio Leibowitz (L-15) modificado com glutamina (GIBCO), acrescido de triptose, aminoácidos não-essenciais, penicilina (10.000 U/L), estreptomicina (10.000 µg/L) e soro fetal bovino (SBF) (GIBCO) a 10% para o meio de crescimento celular e 2,5% para o de manutenção. A inoculação viral foi realizada em uma monocamada de células mantidas em tubos de tamanho 16 x 125mm. No momento da inoculação o meio L-15 de crescimento foi substituído pelo meio L-15 de manutenção, e adicionado 25 µL de inóculo viral (soro contendo vírus). A cultura de células infectadas foi incubada em uma estufa à temperatura de 28° C e observada diariamente em microscópio óptico invertido por um período de 10 dias até o aparecimento de efeito citopático (ECP). Após esse período, o cultivo celular foi submetido ao método de congelamento (-20°C) e descongelamento e depois centrifugado a 10.000 RPM por 10 minutos. Do sobrenadante celular foi retirada uma alíquota de 150 µL que foi utilizada para uma segunda inoculação viral em uma monocamada celular mantida em tubos. Foram realizadas três passagens cegas de sobrenadante com os mesmos procedimentos anteriores e após observação do efeito citopático, o isolamento viral foi confirmado a partir de RT-PCR utilizando o material genético viral extraído do sobrenadante celular.

#### 4.3 DETECÇÃO DA RESPOSTA IMUNE À DENV

##### 4.3.1 Teste Imunocromatográfico rápido

O total de amostras (n=214) foi analisado pelo Dengue Duo Rapid Test. O kit Dengue Duo Rapid Test (Bioeasy, Mg) é um teste imunocromatográfico realizado no Hospital Aliança para detecção tanto de antígeno NS1 do DENV quanto anticorpos IgM/IgG para DENV. O teste, contém dois dispositivos de teste, um para detectar o

antígeno NS1 e outro para detectar anticorpos IgM e/ou IgG. Os resultados são interpretados em 15-20 minutos de acordo com as instruções do fabricante (Figura 12).

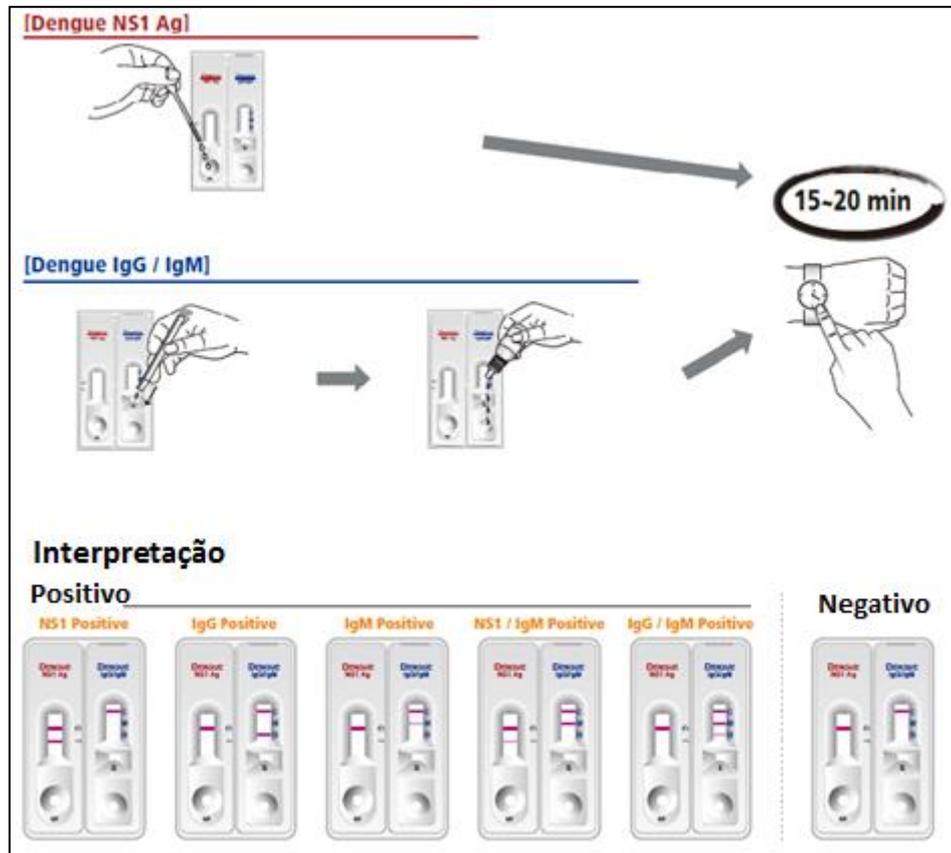


Figura 12. Procedimento do Teste Imunocromatográfico.

#### 4.3.2 Western Blot

A detecção de proteínas virais foi realizada por Western Blot. Primeiramente, a amostra viral foi submetida à eletroforese pela técnica de Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Inicialmente, a amostra foi diluída em tampão desnaturante de Laemmli e levada a 100°C durante 3 minutos em banho-maria. A corrida eletroforética das proteínas virais se realizou durante 2,5 horas à 100 volts em gel de poliacrilamida (concentração de acrilamida à 12,5%). Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTHEC 0,45µm) segundo o método de Burnett (1981), a 100 volts durante 1 hora.

A verificação da eletrotransferência das proteínas se realizou com a técnica de coloração de vermelho de Ponceau 10%. Uma vez constatada a transferência, as tiras de membrana de nitrocelulose foram bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado 5% em Salina Tamponada com Fosfato (PBS) (PBS-leite a 5%) durante 1 hora para evitar sítios livres de reação. Posteriormente as fitas foram incubadas, individualmente, com três soros contendo IgG anti-dengue (1:10 em PBS-Leite 0,5%), e um soro controle negativo no teste rápido e RT-PCR (1:10 em PBS-Leite 0,5%), durante toda a noite à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% (10 minutos cada lavado) e incubadas durante 1 hora a 37°C, com um anticorpo anti-IgG humano conjugado à peroxidase (diluído 1:2.000 em PBS leite 0,5%). Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS-Tween 0,05% e lavagem final com PBS. A revelação foi feita com uma solução com 3'3' Diaminobenzidine (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio (0,001%). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas e fotografadas. Os pesos moleculares das proteínas foram calculados usando-se a Distância em centímetros de migração da proteína após a eletrotransferência / comprimento em centímetros da corrida na membrana adotando como padrão o peso molecular do marcador Precise Protein Molecular Weight (AMRESCO®).

#### 4.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO DENV4

Para a etapa de sequenciamento foi escolhido amplificar a região do gene do envelope viral (E), posição 939nt à 2425nt no genoma (Figura 13). Dois pares de iniciadores foram necessários para amplificação do gene E sorotipo DENV4 (Quadro 1). Os iniciadores D4742 e D4CP1838; D41236 e D4CP2536 foram utilizados em reações separadas de RT-PCR junto com 2.5U da enzima Transcriptase Reversa (Promega,USA); 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 2.5U Taq DNA polimerase recombinante e H<sub>2</sub>O Mili-Q para um volume final da reação de 50µl (PCR Super Mix –Invitrogen, EUA), para amplificar dois fragmentos sobrepostos, de 1096 pb e 1300pb. A purificação

dos fragmentos de DNA a partir do gel de agarose foi realizada utilizando o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado na ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) e o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems, EUA). A metodologia usada corresponde ao método de interrupção da cadeia automatizado (SANGER *et al.*, 1977).

Após o sequenciamento dos fragmentos de DNA, as seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas com cepas de DENV4 selecionadas do Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para construção filogenética utilizou-se o método de Máxima Verossimilhança que seleciona o filograma que possui a maior probabilidade segundo um modelo de evolução molecular. Para identificação dos genótipos das seqüências geradas a partir das amostras coletadas, seqüências nucleotídicas com genótipo previamente determinado e descritos na literatura foram obtidos do GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) (Quadro 2). O alinhamento múltiplo para analisar a homologia entre as seqüências foi realizado aplicando-se o programa computacional, CLUSTAL W, disponível juntamente com o programa de edição de seqüências, BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Este alinhamento foi usado para inferência filogenética usando o método Neighbor-joining incluído no software Mega 5.0 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>).

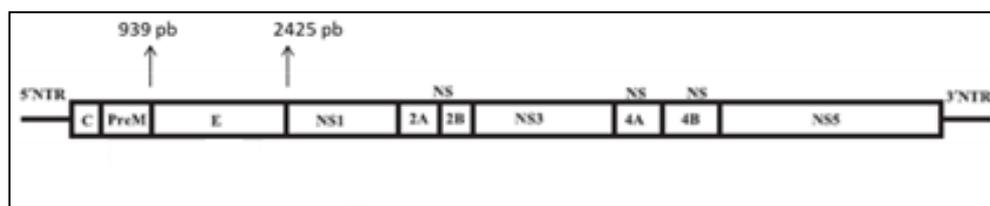


Figura 13. Esquema do genoma de DENV mostrando a posição do gene E.

Primer	Sequência	Sentido	Região genômica	Sorotipo	Referência
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	Forward	C/prM	Todos	Lanciotti et al.,1992
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	Reverse	C/prM	Todos	
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	Reverse	C/prM	DENV1	
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	Reverse	C/prM	DENV2	
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	Reverse	C/prM	DENV3	
TS4	5'-CTCTGTTCTCTTAAACAAGAGA-3'	Reverse	C/prM	DENV4	
D4742	5-'TGGGATTGGAACAAGAGCTGAGACATGGATGTC-3'	Forward	Gene E	DENV4	Lanciotti et al.,1997
D4CP1838	5'-CGTGATGACATTCCCTTGATTCTCAATTTCTCCA-3'	Reverse	Gene E	DENV4	
D41236	5'-GGGTGGGGCAATGGCTGTGGCTTGTGG-3'	Forward	Gene E	DENV4	
D4CP2536	5'-GGGGACTCTGGTTGAAATTTGTACTGTTCTGTCC-3'	Reverse	Gene E	DENV4	

Quadro 1. Iniciadores utilizados neste estudo

Cepas	Nº de acesso no GenBank	Ano de isolamento	Procedência (país)	Sorotipo
DVU18435	U18435	1984	Filipinas	DENV4
AF289029	AF289029	2000	China	DENV4
DVU18441	U18441	1978	Tailândia	DENV4
AY618990	AY618990.1	1991	Tailândia	DENV4
AY618992	AY618992.1	2001	Tailândia	DENV4
JN376802	JN376802.1	2008	Viet Nam	DENV4
AY786197	AY786197.1	2004	Viet Nam	DENV4
EU448450	EU448450.1	2007	Viet Nam	DENV4
JN376799	JN376799.1	2005	Viet Nam	DENV4
DVU18437	U18437	1978	Sri Lanka	DENV4
GQ139572	GQ139572	2008	Equador	DENV4
GQ139547	GQ139547.1	2008	Peru	DENV4
AY152088S1	AY152088	1998	Porto Rico	DENV4
DVU18425	U18425.1	1982	Brasil	DENV4
AF326573	AF326573.1	2001	Dominica	DENV4
EU448463	EU448463	2007	Indonésia	DENV4
EU448464	EU448464	2007	Singapura	DENV4
EU448462	EU448462	2007	Ilhas Salomão	DENV4
AY618979	AY618979.1	1997	Tailândia	DENV4
AY618989	AY618989.1	1997	Tailândia	DENV4
AY618986	AY618986.1	1999	Tailândia	DENV4
AF231723	AF231723.1	1975	Malásia	DENV4
AF231724	AF231724.1	1973	Malásia	DENV4
H781363	JQ513345.1	2011	Brasil	DENV4
H772852	JQ513331.1	2010	Brasil	DENV4
FJ196845	FJ196845.1	2011	China	DENV1
JN796245	JN796245.1	2011	USA	DENV2
JN697379	JN697379.1	2011	Brasil	DENV3

Quadro 2. Cepas DENV-4 selecionadas no GenBank de acordo com número de acesso no GenBank, ano de isolamento e procedência.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise comparativa entre o método molecular e o teste imunocromatográfico foi realizada utilizando o índice estatístico *Kappa*, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (THRUSFIELD, 1995).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DENV

Das 214 amostras analisadas, 93 (43,4%) foram positivas e 121 (56,6%) negativas para DENV no RT-PCR. A sorotipagem dessas amostras positivas por Nested-PCR revelou que 13 amostras foram positivas para DENV 2, 3 amostras para DENV 3 e 77 para DENV 4 (Gráfico 2). Os fragmentos no gel de agarose a 2% (figura 14) indicam os sorotipos virais: 119 pb (DENV 2), 290 pb (DENV 3) e 392 pb (DENV4). O fragmento de 511 pb é específico para o gênero *Flavivirus*.

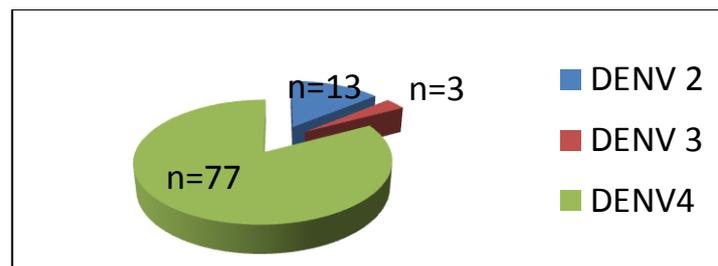


Gráfico 2. Sorotipagem do DENV.

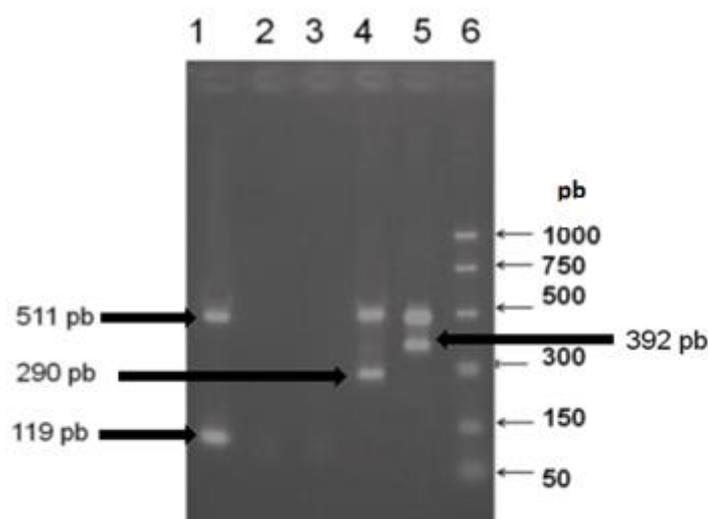


Figura 14. Identificação de sorotipos. Linha 1: DENV 2 (119 pb); Linhas 2,3: amostras negativas; Linha 4: DENV 3 (290 pb); Linha 5: DENV4 (392 pb). Linha 6: Marcador de peso molecular (PCR Markers).

## 5.2 TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO: DETECÇÃO DE IgM, IgG E ANTÍGENO NS1

Todas as 214 amostras coletadas no período de maio/2011 a maio/2012 foram utilizadas no teste imunocromatográfico Dengue Duo Rapid Test. Utilizando esse teste foi possível obter um total de 183 amostras positivas e 31 negativas, distribuídas da seguinte forma: 147 amostras positivas para o antígeno viral NS1, 54 para IgM , 32 para IgG. (Gráfico 3). Em 11 (5,1%) amostras foi possível detectar tanto o antígeno NS1 quanto os anticorpos IgM e IgG.

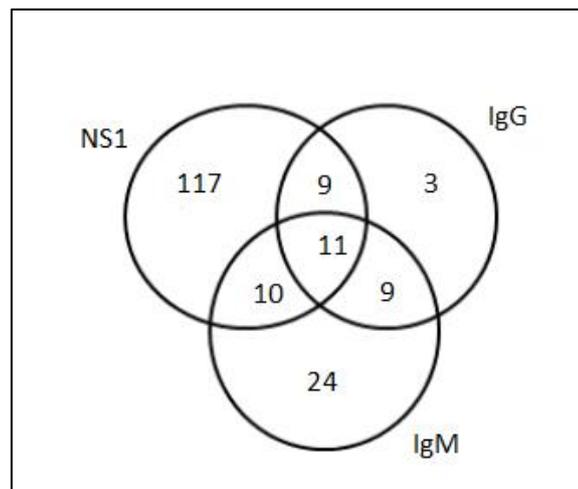


Gráfico 3. Gráfico comparativo dos resultados positivos obtidos no Teste imunocromatográfico Dengue Duo Rapid Test.

## 5.3 COMPARAÇÃO DO TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO *VERSUS* RT-PCR

Nas tabelas 1, 2 e 3 se observam os resultados comparativos entre o método molecular (RT-PCR) e o teste imunocromatográfico (Dengue Duo Rapid Test). A tabela 1 mostra que comparando o método molecular e o teste imunocromatográfico para presença do antígeno NS1, um total de 78 amostras foram positivas e 52 negativas por ambos os métodos. Porém, 69 amostras foram positivas unicamente para a presença do antígeno NS1, mostrando uma sensibilidade maior para o teste imunocromatográfico provavelmente devido ao período em que é possível detectar

antígeno e RNA viral na corrente sanguínea (Gráfico 4). O índice *kappa* ( $\kappa$ ) que avalia a concordância dos métodos demonstra uma razoável concordância entre os dois métodos (0.254), ou seja, os níveis de antígeno NS1 no soro se correlacionam com os níveis de viremia. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), adotando o teste imunocromatográfico como padrão utilizado em centros de saúde, obteve melhores resultados na tabela 1, mostrando que quanto maior a especificidade maior o VPP, ou seja, maior a segurança de um resultado positivo pelo método teste seja de fato positivo.

Tabela 1. Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para NS1

	NS1 +	NS1 –	TOTAL
RT-PCR+	78	15	93
RT-PCR -	69	52	121
TOTAL	147	67	214

Sensibilidade= 53% Especificidade= 77,6% VPP= 83,8% VPN= 42,9%
---

Na comparação do método molecular com o teste imunocromatográfico para a presença de anticorpos IgM, como mostra a tabela 2, um total de 9 amostras foram positivas e 76 negativas por ambos os métodos. Porém 84 amostras foram positivas unicamente para a presença do RNA viral, e 45 amostras positivas unicamente para IgM. O índice  $\kappa$  nessa comparação foi -0,285. Valores negativos do índice  $\kappa$  significam que a concordância entre os métodos é inferior ao esperado por acaso, indicando que os níveis de anticorpos no soro não se correlacionam com os níveis de viremia (Gráfico 4).

Tabela 2. Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para IgM

	IgM+	IgM –	TOTAL
RT-PCR+	9	84	93
RT-PCR -	45	76	121
TOTAL	54	160	214

Sensibilidade= 16,6%  
 Especificidade= 47,5%  
 VPP= 9,6%  
 VPN= 62,8%

Na tabela 3, a comparação do método molecular com o teste imunocromatográfico para a presença de anticorpos IgG, mostra que 7 amostras foram positivas e 96 negativas por ambos os métodos. Porém, 86 amostras foram positivas unicamente para presença do RNA viral, e 25 amostras positivas unicamente para IgG. Ao se calcular o índice  $\kappa$  o valor foi igual a -0,138, indicando que a concordância entre os métodos é inferior ao esperado por acaso e os níveis de anticorpos e RNA viral não se correlacionam.

Tabela 3. Comparação RT-PCR *versus* Teste Imunocromatográfico para IgG

	IgG+	IgG-	TOTAL
RT-PCR+	7	86	93
RT-PCR -	25	96	121
TOTAL	32	182	214

Sensibilidade= 21,8%  
 Especificidade= 52,7%  
 VPP= 7,5%  
 VPN= 79,3%

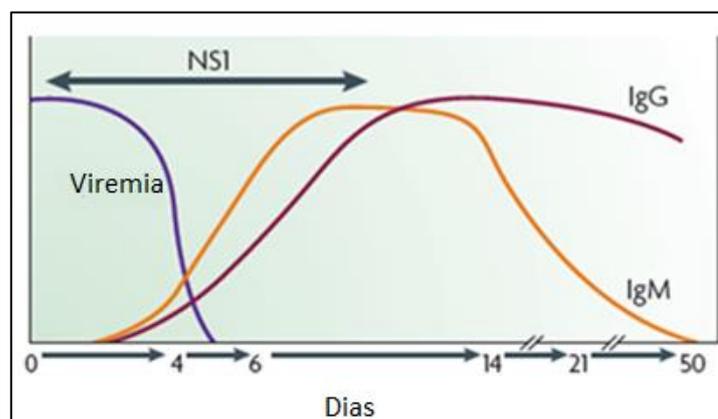


Gráfico 4. Detecção de vírus Dengue, antígeno e resposta de anticorpos em função do tempo de infecção usados no diagnóstico. Ig, imunoglobulina; NS, proteína não-estrutural (Adaptado de GUZMAN *et al.*, 2010).

#### 5.4 ISOLAMENTO VIRAL

Dos quatro soros escolhidos para infectar as células C6/36, em apenas um soro positivo para DENV4 no Nested-PCR e negativo para IgM, IgG e NS1 no teste Imunocromatográfico foi possível isolar o vírus em cultura de células C6/36, isso pode ter sido devido a elevada toxicidade dos outros soros. O vírus isolado apresentou efeito citopático (formação de sincícios) na 3ª passagem cega após 10 dias da inoculação em células C6/36 (Figura 15). O isolamento viral foi confirmado através da técnica de RT-PCR, utilizando o RNA viral extraído do sobrenadante da cultura de células e os iniciadores D41236 e D4CP2536 específicos para DENV4, que amplificam um fragmento de 1300 pb. (Figura 16).

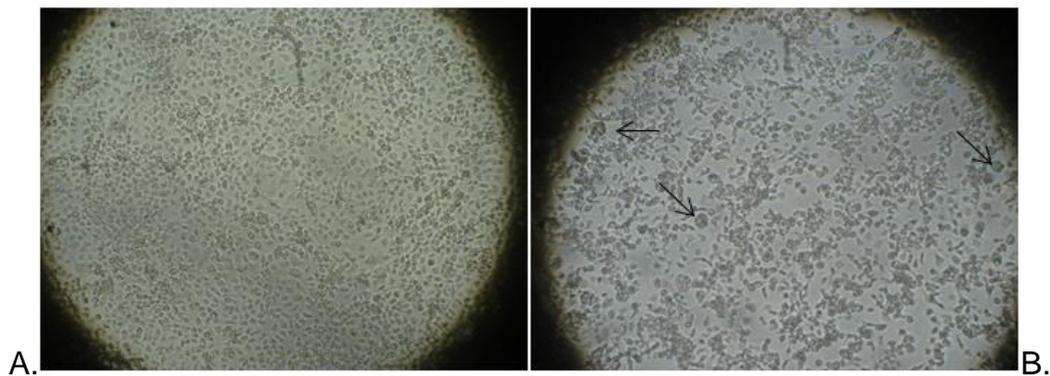


Figura 15. Isolamento viral em cultura de células de *Aedes albopictus* clone C6/36. A) Células C6/36 não infectadas. B) Células C6/36 infectadas. As setas mostram o efeito citopático do vírus (formação de sincícios).

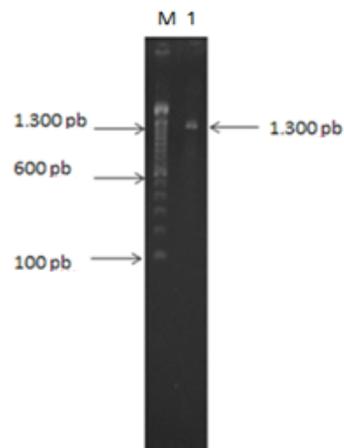


Figura 16. DENV4: Isolamento viral em cultivo de células C6/36. M: Marcador de peso molecular (100 pb); Linha 1: amostra positiva, observa-se um fragmento de 1300 pb.

## 5.5 WESTERN BLOT

A reatividade de anticorpos anti-dengue em soros de pacientes sorologicamente positivos com as proteínas virais do DENV4 foi determinada pela técnica de Western Blot. O padrão de reatividade encontrado nos 3 soros utilizados pode ser visto na figura 17, a qual mostra as proteínas detectadas: proteínas estruturais E e prM/M e proteínas não-estruturais NS1 e NS3. A especificidade da reação foi confirmada quando uma amostra de soro de indivíduo negativo no teste imunocromatográfico rápido e no RT-PCR foi incluída na análise de Western Blot e nenhum fragmento específico para as proteínas do DENV4 foi detectado (Figura 17). Algumas bandas inespecíficas podem ser observadas tanto nas células infectadas quanto nas não infectadas.

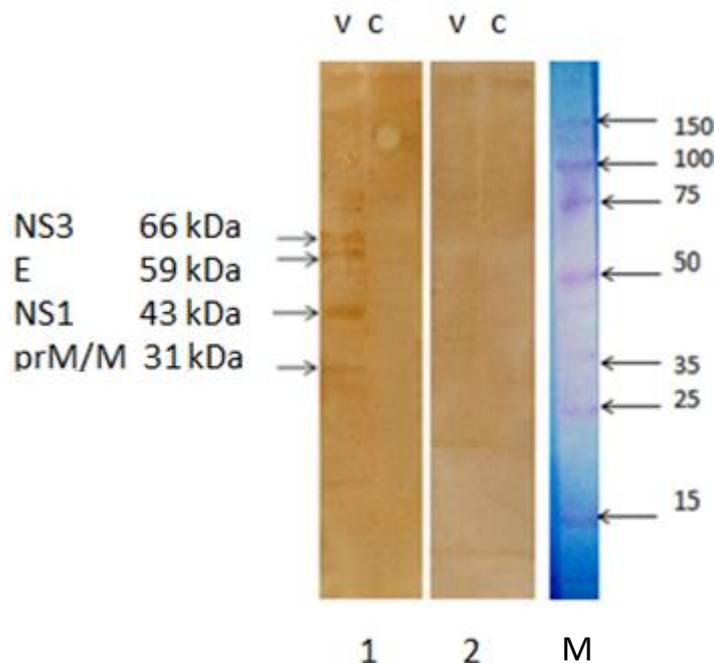


Figura 17. Identificação de proteínas virais do DENV por Western Blot. V: Células C6/36 infectadas com DENV4. C: Células C6/36 não infectadas. Western blot utilizando: (1) soro de paciente positivo no teste rápido para IgM/IgG, (2) soro de paciente negativo no teste rápido para IgM/IgG. M: Marcador de peso molecular (AMRESCO®). As setas à esquerda indicam o peso molecular das proteínas virais de DENV4 identificadas pelo soro.

## 5.6 AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR DO GENE E, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE DENV4

Após a amplificação do gene *E*, os fragmentos sobrepostos apresentavam 1096nt e 1300nt (Figura 18B), abrangendo os nucleotídeos 742 a 2536 dos genes prM, *E* e NS1 do genoma de DENV4 no NCBI (Figura 18A). Após o alinhamento e edição das sequências, o fragmento correspondente ao gene *E* de DENV4 obteve 472nt de comprimento (posição 1953-2425 no genoma viral). Esse fragmento corresponde ao final da glicoproteína E, e nele encontram-se 59 dos 98 aa do domínio III da glicoproteína E (338 ao 397 aa).

Quatro sequências de DENV4 (Brasil/2011/D4\_11; Brasil/2011/D4\_30; Brasil/2011/D4\_23; Brasil/2011/D4\_16) foram comparativamente analisadas com cepas de referências do GenBank (Quadro 2). As seqüências nucleotídicas foram submetidas ao programa Blast e apresentaram entre 91-99% de similaridade com cepas da Tailândia e VietNam. Uma árvore filogenética (figura19) de máxima verossimilhança (-lnL= -1780.609) foi construída usando o modelo de substituição K2+G (Kimura-2 parâmetro + distribuição gamma parâmetro alfa = 0.41), e a confiabilidade da árvore inferida foi estimada pelo método de bootstrap com 1.000 pseudo-replicas. As sequências de DENV4 deste trabalho formaram um clado distinto (bootstrap 96) derivando de cepas genótipo I (cepas Asiáticas), e apresentaram forte homologia com as cepas isoladas no VietNam. Outra árvore filogenética (figura 20) de máxima verossimilhança (-lnL=-3282.120) foi construída usando o modelo de substituição T92+G (Tamura-3-parâmetro + distribuição gamma alfa=0.54) e a confiabilidade da árvore inferida foi estimada também pelo método de bootstrap com 1.000 pseudo-replicas. Nesta análise filogenética foi observado que a cepa Brasil/2011/JQ513345, isolada de um paciente em 2011 na cidade de Salvador é filogeneticamente relacionada com as sequências de DENV4 do presente estudo.

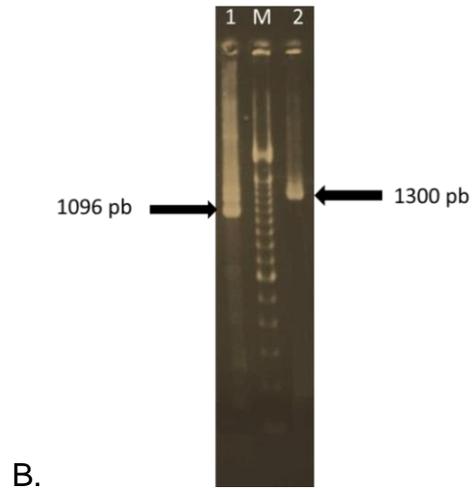
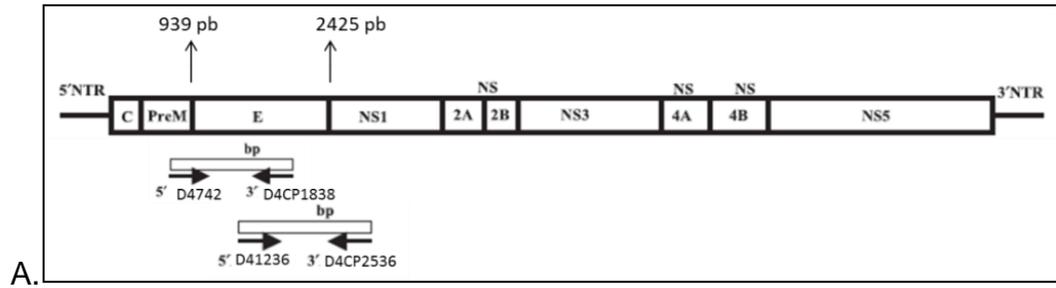


Figura 18. RT-PCR de amostra DENV4. A) Esquema demonstrando a região genômica amplificada por RT-PCR. B) Análise em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação utilizando os iniciadores D4742 e D4CP1838 (Linha 1), D41236 e D4CP2536 (Linha2). M=Marcador de peso Molecular (100pb).

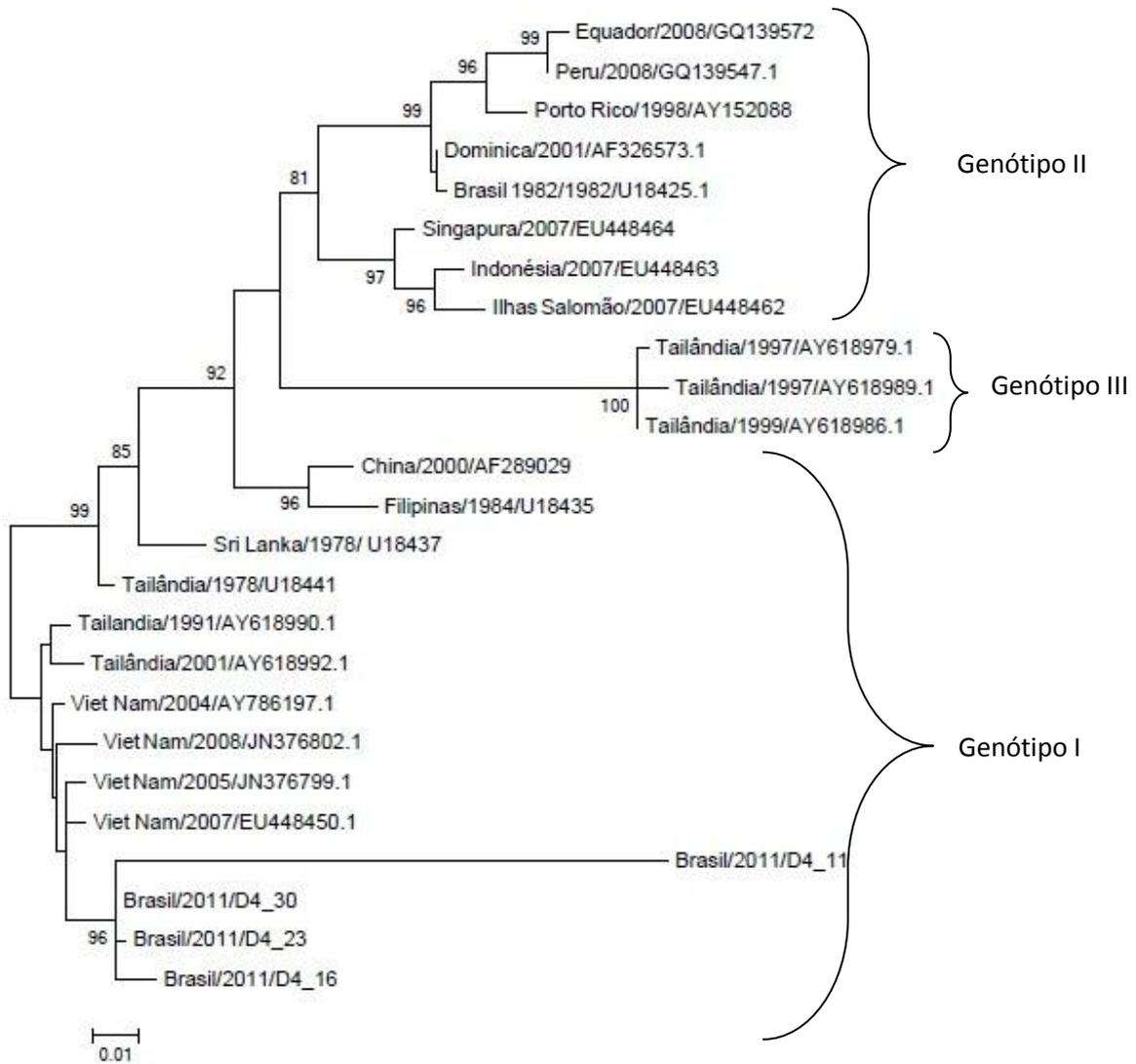


Figura 19. Árvore filogenética construída pelo método de Máxima Verossimilhança mostrando a identificação do genótipo das cepas de DENV4 isoladas de soros de pacientes em Salvador, Bahia. A codificação das cepas virais corresponde a país de origem/ ano de coleta/ número de acesso no GenBank. As cepas deste estudo são denominadas Brasil/2011/D4\_11; Brasil/2011/D4\_30; Brasil/2011/D4\_23; Brasil/2011/D4\_16. A escala mostra a distância genética de 0,01 ou 1% de divergência na sequência nucleotídica.

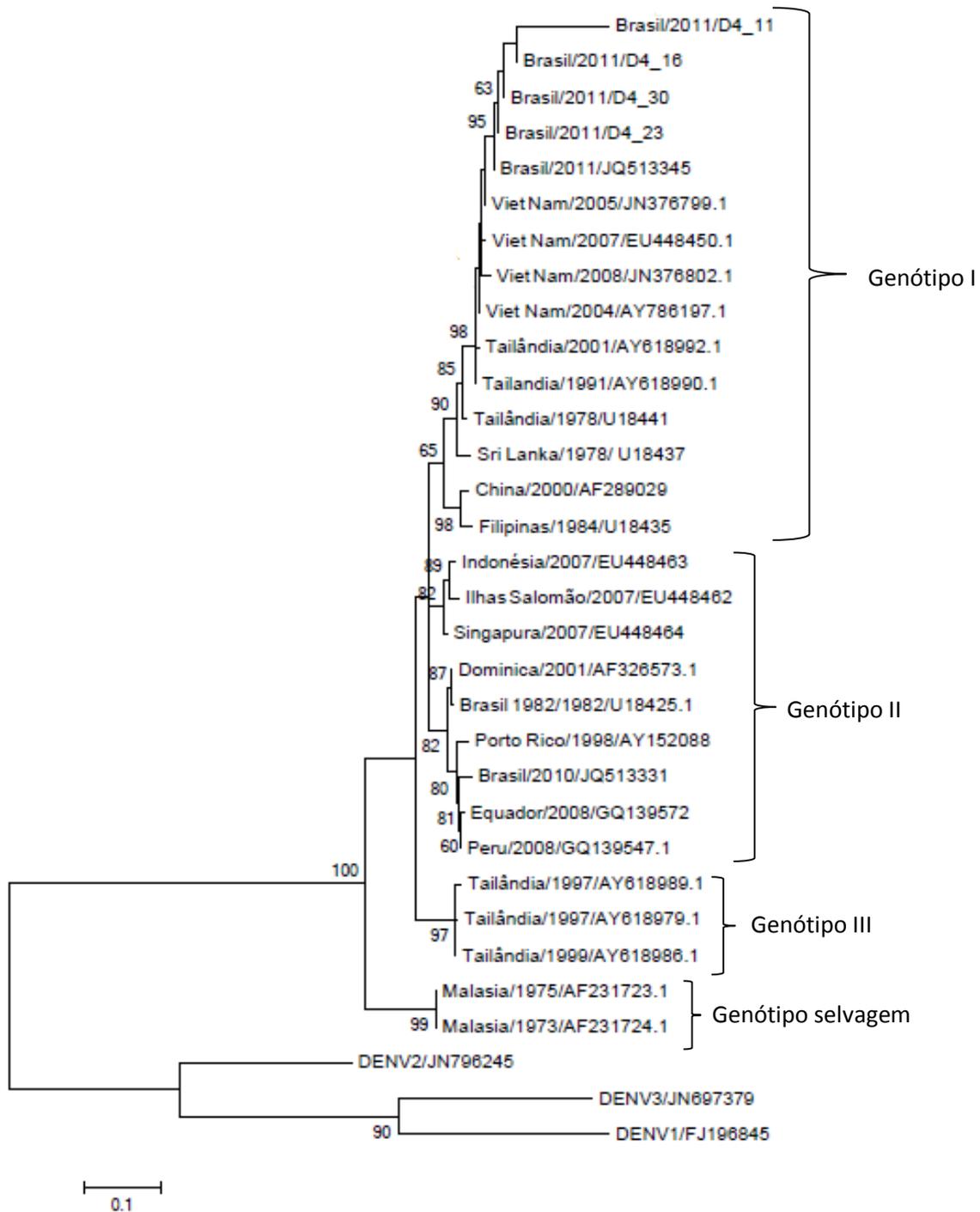


Figura 20. Árvore filogenética dos genótipos de DENV4 baseada em sequências do Gene E. DENV1, 2 e 3 foram usados como grupo externo. Comprimentos dos ramos são proporcionais à porcentagem de divergência. A codificação das cepas virais corresponde a país de origem/ ano de coleta/ número de acesso no GenBank.

## 6 DISCUSSÃO

Os vírus de RNA mostram uma alta variabilidade genética, devido à alta taxa de mutação intrínseca associada com a enzima RNA polimerase RNA dependente, rápidas taxas de replicação, e os seus grandes tamanhos populacionais. No DENV, essa variabilidade genética é comprovada pela existência de quatro sorotipos antigenicamente distintos (CLYDE *et al.*, 2006).

A co-circulação dos quatro sorotipos do DENV numa mesma cidade ou país (hiperendemicidade), comum no Sudeste Asiático, é frequente também em muitas Ilhas Caribenhas, México, América Central e Sul durante os últimos 20 anos. (KUNGTHONG *et al.*, 2004; LORONO-PINO *et al.*, 1999; RICO-HESSE, 2003). A co-circulação de três dos quatro sorotipos de DENV identificados em Salvador, no período de maio/2011 à maio/2012, serve de alerta às autoridades de saúde pelo risco de manifestações severas da doença. O Laboratório de Virologia do ICS-UFBA desde 2008-2009 vem monitorando a infecção de DENV na cidade observando a predominância em 2008 de DENV3, em 2009 o DENV2, e já em 2011-2012 este estudo mostra que o DENV4 é o sorotipo mais predominantemente encontrado. Este sorotipo foi introduzido na Bahia em março de 2011, e no Brasil não circulava há mais de 30 anos. A introdução do DENV-4 em Salvador é motivo de preocupação, pois epidemias com os sorotipos 1, 2 e 3 já ocorreram na Bahia no passado (MELO *et al.*, 2010). A introdução de um novo sorotipo numa população que já convive com a circulação dos outros sorotipos pode aumentar a incidência da forma clinicamente grave: a dengue hemorrágica.

A análise filogenética com base no gene E, para classificação em genótipos (LANCIOTTI *et al.*, 1994, 1997; LEWIS *et al.*, 1993; RICO-HESSE, 1990, 2003; KLUNGTHONG *et al.*, 2004, 2008) mostrou que o DENV4 identificado em Salvador é classificado como DENV4 genótipo I descendente de cepas asiáticas. Este achado é corroborado com estudos de Nunes e colaboradores (2012) que também detectaram o DENV4 genótipo I em uma amostra proveniente de Salvador em 2011 (Brasil/2011/JQ513345). Outros estudos apenas identificaram DENV4 genótipo II (Brasil/2010/JQ513331) no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2011; NAVECA *et al.*, 2012). A

topologia das árvores obtidas sugere que existem dois cladogramas dentro do genótipo I de DENV4, um representado por cepas da China e Filipinas e o outro por cepas da Tailândia, Sri Lanka e VietNam. A partir dessa análise observa-se que os isolados (Brazil/2011/D4\_11; Brazil/2011/D4\_30; Brazil/2011/D4\_23; Brazil/2011/D4\_16) de Salvador formam um clado distinto bem suportado (bootstrap 96) em comparação com as outras cepas do GenBank. Curiosamente, estas sequências aparentemente derivam de um clado contendo vírus que circulam no VietNam (representado por Vietnam/2007/EU448450.1, Vietnam/2005/JN376799.1, Vietnam/2008/JN376802.1 e Vietnam/2004/AY786197.1) sugerindo que novos sítios segregantes foram evolutivamente adquiridos pelo DENV4 brasileiro. Mais estudos são necessários para investigar a seleção direcional e a possível relação entre genótipo de DENV4 e patogenicidade como relatado para DENV2 e 3 (CLYDE *et al.*, 2006; RICO-HESSE *et al.*, 1997), mas os dados corroborados pelo comprimento do ramo terminal na amostra Brazil/2011/D4\_11, revelam uma acumulação de mutações significativas em relação às outras amostras genótipo I incluídas na análise. A introdução de DENV 4 genótipo I no Brasil, detectado em Salvador, pode ser consequência de ser esta uma cidade que recebe anualmente um grande número de visitantes estrangeiros ou inclusive ter sido introduzido pelas interações comerciais com países asiáticos dado o intenso tráfego marítimo no porto da cidade.

A co-circulação de três sorotipos do DENV, com ênfase no DENV4, foi claramente demonstrada nos ensaios de diagnóstico molecular. No entanto o uso de testes rápidos, sensíveis e de fácil implementação contribuem ao diagnóstico preciso da infecção para o atendimento imediato de indivíduos suspeitos. O teste Imunocromatográfico demonstrou eficácia na detecção da infecção durante todos os estágios clínicos. Este teste detectou o antígeno viral (NS1) de DENV na corrente sanguínea e a presença de IgM anti-DENV na maioria de pacientes, no entanto a IgG foi uma imunoglobulina pouco relevante para estes pacientes. Este perfil de diagnóstico sugeriria que os pacientes amostrados possivelmente eram decorrentes de uma primeira infecção por DENV em estado inicial da doença. Esta hipótese se confirmaria se observamos a alta prevalência do DENV4 nesta amostragem. Pacientes que tiveram contato com um sorotipo viral até agora nunca identificado na população e uma presença de IgG (infecção reincidente) pouco relevante.

Alguns indivíduos infectados com DENV tiveram um perfil de resposta imune com detecção das proteínas estruturais E e prM/M e as proteínas não-estruturais NS1 e NS3. Estudos indicam que anticorpos anti-NS1 são detectados principalmente em re-infecções, enquanto que anticorpos anti-E e anti-NS3 são detectados em ambas infecções primárias e secundárias (VALDES *et al.* 2000). Anticorpos anti-E são os mais frequentemente detectados, provavelmente, devido ao papel da proteína E, que é a maior proteína de superfície do vírus e o mais importante antígeno viral em termos de biologia viral e imunidade humoral.

Diante de tudo o exposto, neste estudo foi abordado alguns dos métodos usuais de diagnóstico de DENV. Dentre eles, o isolamento viral, considerado padrão-ouro, entretanto é um procedimento que exige o uso de cultivos celulares, bastante dispendioso e que consome tempo. Uma alternativa ao isolamento viral é o diagnóstico molecular através do RT-PCR, que neste estudo permitiu a identificação de um sorotipo reemergente após 30 anos no Brasil. Outro método de diagnóstico abordado foi o diagnóstico sorológico através do teste imunocromatográfico utilizado em pacientes atendidos nas emergências e centros de saúde para a detecção imediata da infecção (WANG & SEKARAN, 2010). Sendo assim, sugere-se que testes que abordam a detecção de antígeno viral (como NS1), e detecção de anticorpos anti-DENV seriam os de eleição para um diagnóstico com resultados instantâneos. Porém o diagnóstico molecular também se torna necessário para identificar o sorotipo/genótipo do vírus circulante na população como foi demonstrado neste estudo, a co-circulação de três sorotipos do DENV em Salvador e a identificação de DENV 4 genótipo I. Diante disto, um diagnóstico imediato da infecção aliado a um diagnóstico molecular dos sorotipos/genótipos circulantes na comunidade poderiam ser medidas de prevenção e controle para riscos potenciais de formas graves da doença numa população.

## 7 CONCLUSÃO

- O DENV4 foi o sorotipo predominante detectado pela metodologia molecular durante maio/2011 à maio/2012 em Salvador.
- Detecção de DENV4 genótipo I descendente de cepas asiáticas.
- O teste Imunocromatográfico demonstrou ser rápido e efetivo na detecção imediata da infecção.
- Os métodos molecular e Imunocromatográfico apresentaram em geral baixa concordância, mas são consideradas ferramentas necessárias, porém, com objetivos diferentes no diagnóstico da infecção viral.
- A maioria dos indivíduos infectados pelo DENV nesta amostragem provavelmente eram decorrentes de uma *primo* infecção.
- A resposta imune contra as proteínas do DENV4 foram principalmente para as proteínas estruturais E e prM e não-estruturais NS1 e NS3.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. 2003. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: Chambers, T. J; Monath, T. P. **The Flavivirus: structure, replication and evolution**, p. 229-274, 2003.

BURNETT, W.N. Eletrophoretic transfer of proteins from dodecyl sulfate polyacrilamide gels to ummidified nitrocellulose and radiography detection with antibody and radioiodinated protein A. **Annals of Biochemistry**. n. 12, p. 195-203, 1981

CÂMARA, F. P. *et al.* Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40(2), p. 192-196, 2007.

CASEIRO, M. M.*et al.* Dengue. Disponível em <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=2399](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2399)> Acesso em 15 de dezembro de 2012.

CHAMBERS, T.J. *et al.* Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 40, p. 649- 688, 1990.

CHURDBOOCHART, V. *et al.* Antibodies against viral proteins in primary and secondary dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 481–493, 1991.

CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80 (23), p: 11418-11431, 2006.

DE SOUZA, R.P. *et al.* Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5(12), p. 1439, 2011.

FERNANDEZ, J. *et al.* Detection of dengue virus type 4 in Easter Island, Chile. **Archives of Virology**, 2011.

FIGUEIREDO, R. M. *et al.* Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14(4), p. 667-9, 2008.

FLINT, S. J. *et al.* Dissemination, Virulence, and Epidemiology. **Principles of Virology Molecular Biology, Pathogenesis and control of Animal Viruses**, 2 ed, p. 495-527, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11(3), p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. Novartis **Foundation Symposium**, v. 277, p. 3-15, 2006.

GUZMAN, M.G. *et al.* Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, p. 793—9, 2000.

GUZMAM, M.G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, p. 7-16, 2010.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 376-396, 1990.

HOLMES, E.C.; BURCH, S.S. The Causes and Consequences of Genetic Variation in Dengue Virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74-77, 2000.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3(1), p. 19–28, 2003.

KLUNGTHONG *et al.* The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. **Virology**, v. 329, p. 168–179, 2004.

KLUNGTHONG *et al.* Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 175–181, 2008.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72(1), p. 73-83, 1998.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and Dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v.11, p. 301-11, 2001.

KURANE, I. Dengue Hemorrhagic fever with Special Emphasis on Immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30(3), p. 545-551, 1992.

LANCIOTTI, R.S; GUBLER, D.J; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2279–2286, 1997.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITMEYER, K. C.*et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73(6), p. 4738-47, 1999.

LEWIS, J.A. *et al.* Phylogenetic Relationships of Dengue-2 Viruses. **Virology**, v. 197, p. 216-224, 1993.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In KNIFE, D. M.*et al.* **Fields Virology**, 4 ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 991– 1060, 2001.

LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. Molecular Biology of Flavivirus. In: Chambers T.J. & Monath T.P. **Advances in Virus Research: The Flavivirus:structure, replication and evolution**. California, Academic Press. v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In KNIPE, D. M.*et al.* **Fields Virology**, p. 1101– 1152, 2007.

LORONO-PINO *et al.* Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **American. Journal. Tropical. Medicine and. Hygiene.**,v. 61(5), p. 725–730, 1999.

MALAVIGE, G. N. *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, p.588-601, 2004.

MELO, M. S.S. *et al.* Progressão da circulação do vírus do dengue no Estado da Bahia, 1994-2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43(2), p. 139-144, 2010.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, Análise de situação e tendências 2010. Disponível em [http://www.dengue.org.br/informe\\_da\\_dengue\\_2010.pdf](http://www.dengue.org.br/informe_da_dengue_2010.pdf). Acesso em 11 março 2011.

MS.Ministério da Saúde 2012. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8309/785/melhoria-na-assistencia-reduz-casos-graves-e-mortes-por-dengue.html>> Acesso em 16 de dezembro de 2012.

MS. Ministério da Saúde. SESAB. Secretária de Saúde do Estado da Bahia. Nota Técnica Dengue - Alerta para epidemia e aumento da letalidade. Disponível em <[http://www1.saude.ba.gov.br/entomologiabahia/dengue/NOTA\\_TECNICA\\_ALERTA\\_2012\\_assinado.pdf](http://www1.saude.ba.gov.br/entomologiabahia/dengue/NOTA_TECNICA_ALERTA_2012_assinado.pdf)> Acesso em 16 de dezembro de 2012.

- MELINO, S.; PACI, M. Progress for Dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3 pro inhibition for a therapeutic-based approach. **The FEBS Journal**, v. 274 (12), p.2986- 3002, 2007.
- MUKHOPADHY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.13-22, 2005.
- NAVECA, F.G. *et al.* Complete genome sequence of a Dengue virus serotype 4 strain isolated in Roraima, Brazil. **Journal of Virology**, v. 86(3), p. 1897-8, 2012.
- NUNES, M.R. *et al.* Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerging Infectious Diseases**. v.18, p. 1858-1864, 2012.
- OSANAI, C.H. *et al.* Dengue Outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.
- PEREIRA, M; SANTUCCI, S. G. Doenças: Dengue. Sao Paulo, 2000. Disponível em <[http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/Dengue\\_f\\_amarela/texto\\_Dengue\\_pro.htm](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/Dengue_f_amarela/texto_Dengue_pro.htm)> Acesso em 29 de agosto de 2012.
- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, p. 479–493, 1990.
- RICO-HESSE, R. *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244–251, 1997.
- RICO-HESSE, R. Microevolution and Virulence of dengue viruses. In: Chambers T.J. & Monath T.P. **Advances in Virus Research: The Flavivirus:structure, replication and evolution**. v. 59, p. 315-341, 2003.
- RICO-HESSE, R. Dengue Virus Virulence and Transmission Determinants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, P. 45–55, 2010.

RIGAU-PEREZ, J. G. *et al.* Dengue and Dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v.352, p.971-7, 1998.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74(12), p. 5463-5467.

STADLER, K. *et al.* Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8475-8481, 1997.

STIASNY, K; HEINZ, F.X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2755-2766, 2006.

THRUSFIELD, M. Diagnostic testing. **Veterinary Epidemiology**. 2 ed. 1995.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. *et al.*. Introduction. In: An Overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. (A. P. A. Travassos da Rosa, P. F. C. Vasconcelos & J. F. S. Travassos da Rosa, org.), p.85, Bélem: Instituto Evandro Chagas, 1998.

VALDEZ, K. *et al.* Human Dengue Antibodies against Structural and Nonstructural Proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 856–857, 2000.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S.C. The History and Evolution of Human Dengue Emergence. **Advances in Virus Research**, v. 72. p. 1-76, 2008.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P.M.A. Evolutionary history of Dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 878–885, 2011.

WANG, E. *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**, v. 74, p. 3227–3234, 2000.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Early Diagnosis of Dengue Infection Using a Commercial Dengue Duo Rapid Test Kit for the Detection of NS1, IGM, and IGG. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83(3), p. 690–695, 2010.

WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understand the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 523-540, 2009.

WHITEHEAD, S. S., *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews**, v. 5, 2007.

WHITEHORN J; SIMMONS C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 42, p. 7221-8, 2011.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition Geneva: **World Health Organization**; 2009.

WHO 2012. Dengue and severe dengue.

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso 15 de dezembro de 2012

Wu S.J. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, p. 816-820, 2000.

**ANEXO - Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa****UNIVERSIDADE SALVADOR  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Salvador, 05 de agosto de 2009

Silvia Inês Sardi  
Gubio Campos Soares  
Aryane Cruz Oliveira Pinho

Universidade Federal da Bahia - UFBA

REF: Submissão de Projeto

Projeto: "Identificação e Genotipificação do Vírus da Dengue na cidade de Salvador - Bahia"

FR: 270807

Protocolo nº: 04.10.49

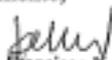
Prezados Pesquisadores,

Apraz-nos comunicar que o seu projeto intitulado "Identificação e Genotipificação do Vírus da Dengue na cidade de Salvador - Bahia", foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Salvador em Reunião Ordinária realizada em 03 de agosto de 2009.

Lembramos a V.Sª, da necessidade de enviar relatórios periódicos trimestrais acerca do progresso do referido projeto para este CEP, bem como o envio do relatório final consubstanciado e documentado conforme apresentado no cronograma de seu projeto. Informamos ainda, que em se tratando de projetos de conclusão de curso, monografias, dissertações ou teses, uma cópia do manuscrito final deverá ser encaminhada para nossos registros, bem como cópias dos artigos publicados decorrentes da pesquisa realizada sob nossa aprovação.

Na certeza do cumprimento ético de suas atividades de pesquisa, desejamos a realização de um ótimo trabalho e colocamo-nos à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas ou questionamentos que se façam pertinentes durante a duração do estudo aprovado.

Cordialmente,

  
Prof. Dr. Francisco Kelmo, PhD  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade Salvador