

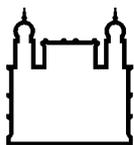
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS,
IMUNOLÓGICOS E VIROLÓGICOS DE CASOS DE DENGUE
OCORRIDOS EM PERNAMBUCO EM 2010-2011.**

PATRICK JESUS DE SOUZA

Rio de Janeiro, Janeiro de 2019.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E VIROLÓGICOS DE CASOS DE DENGUE OCORRIDOS EM PERNAMBUCO EM 2010-2011.

PATRICK JESUS DE SOUZA

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

Orientador (es): Prof. Dr. Flavia Barreto dos Santos.
Prof. Dr. Elzinandes Leal de Azeredo.

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2019.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT /
FIOCRUZ - RJ

Souza, Patrick Jesus de .

CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS,
IMUNOLÓGICOS E VIROLÓGICOS DE CASOS DE DENGUE OCORRIDOS EM
PERNAMBUCO EM 2010-2011. / Patrick Jesus de Souza. - Rio de Janeiro,
2019.

xvi, 101 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2019.

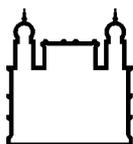
Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Co-orientadora: Flávia Barreto Dos Santos.

Bibliografia: f. 82-99

1. DENGUE. 2. EPIDEMIOLOGIA. 3. INFECÇÃO. 4. IMUNOLOGIA. 5.
PERNAMBUCO. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical

AUTOR: PATRICK JESUS DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS E VIROLÓGICOS DE CASOS DE DENGUE OCORRIDOS EM PERNAMBUCO EM 2010-2011.

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo

Prof. Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Aprovada em: 30/01/2019.

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Carvalho Siqueira - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

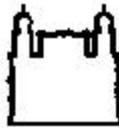
Prof^a. Dr^a. Patricia Muniz Mendes Freire de Moura (Universidade de Pernambuco)

Prof^a. Dr^a. Silvia Maria Baeta Cavalcanti (Universidade Federal Fluminense)

Prof^a. Dr^a. Nieli Rodrigues da Costa Faria (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Joanna Reis Santos de Oliveira (Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 30 de Janeiro de 2019.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos que a defesa pública da dissertação de mestrado em Medicina Tropical, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle de Patrick Jesus de Souza, realizou-se no trigésimo dia do mês de janeiro de dois mil e dezanove, às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ.

Título da dissertação de mestrado: **“Caracterização dos aspectos clínico-epidemiológicos, imunológicos e virológicos de casos de dengue ocorridos em Pernambuco em 2010-2011”**.

Orientação: Dr^o. Elzinandes Leal de Azeredo e Dr^o. Flávia Barreto dos Santos

Revisão: Dr^o. Patricia Carvalho de Sequeira

Banca Examinadora: Dr^o. Patricia Carvalho de Sequeira – IOC/FIOCRUZ (Presidente)

Dr^o. Patricia Muniz Mendes Freire de Moura – UPE/PE (Membro titular)

Dr^o. Sílvia Maria Baeta Cavalcanti – UFF/RJ (Membro titular)

Dr^o. Nieli Rodrigues da Costa Faria - IOC/FIOCRUZ (Suplente)

Dr^o. Joanna Reis Santos de Oliveira - IFRJ/RJ (Suplente)

Informamos ainda que o referido aluno deve cumprir exigências previstas em regimento da Pós-graduação em Medicina Tropical para a obtenção de seu título.

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2019.

Martha Cecilia Suárez Mytis
Matrícula-SIAPE 1556044

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-9724/18 no livro nº II, folha 54v em 30/01/2019.

Dedico este trabalho ao meu pai, Carlos Roberto de Souza. Além de ser meu super-herói, é um profissional que há mais de 20 anos contribui para o enfrentamento da dengue, através de técnicas de controle vetorial.

AGRADECIMENTOS

À minha família que é a base de todas as minhas conquistas. Tenho plena consciência que sem o suporte deles, eu não teria chegado onde estou hoje.

À minha linda esposa Marianne Souza, que é meu porto seguro e minha protetora. Que em todos os meus momentos de mestrando, esteve ao meu lado, me apoiando, me encorajando e me fazendo companhia em casa para eu poder escrever rs.

Aos meus amigos da Medicina Tropical, pela incrível parceria que fizemos. Em especial à Mariana Nabuco e Daniel Fuser, que se tornaram meus irmãos do coração.

À Dr^a. Luzia de Oliveira Pinto, pelo recebimento no laboratório, pelo apoio que sempre me deu e pelas palavras de otimismo que dispensava a mim.

À Dr^a. Flávia Barreto dos Santos, pelo aceite em me orientar e por todo o carinho e paciência que teve comigo. Mais que uma profissional de excelência, é e sempre será minha eterna mãe acadêmica.

À Dr^a. Elzinades de Azeredo que também aceitou me orientar, me levando para o intenso mundo da imunologia viral. Meu super obrigado pelo apoio, paciência e carinho que teve comigo durante todo esse período.

À toda equipe do laboratório de Imunologia Viral IOC/FIOCRUZ, incluindo ex-integrantes como Luciana Gonçalves e Juan Camillo, pela parceria desenvolvida. Porém, de uma forma especial gostaria de agradecer a mestranda Caroline Fernandes e a Dr^a. Monique Lima pela ajuda nos elisas e nas análises estatísticas.

À doutoranda Thiara Manuele, por todo apoio durante a execução dos trabalhos. Bem como pelos risos e piadas que tornaram os trabalhos mais leve.

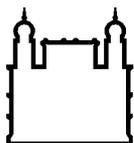
As Dr^{as}. Manoela Heringer e Fernanda de Bruycker por me apresentaram as técnicas de diagnóstico, em especial as de diagnóstico molecular. O conhecimento que obtive nesta parceria foi vital para a elaboração deste trabalho.

Ao Laboratório de Flavivirus IOC/FIOCRUZ pela parceria.

À toda equipe da pós-graduação em Medicina Tropical. Em especial à Dr^a. Martha Mutis e a secretária Lívia pelo imenso apoio que me deram durante o mestrado.

As Dr^{as}. Silvia Cavalcanti, Patrícia Moura, Nieli Faria e Joanna Oliveira pelo aceite em fazer parte da banca avaliadora. E de forma especial, meus agradecimentos à Dr^a. Patrícia Sequeira, que mesmo em período de final de ano e de férias, aceitou revisar meu trabalho e presidir a banca.

À Secretaria Municipal de Saúde de Pirai/RJ pelo suporte dispensado a mim. De forma especial, à sr^a. Secretária de Saúde Maria da Conceição pelas palavras de incentivo e apoio.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

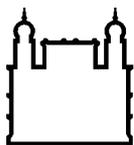
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação de
Medicina Tropical

RESUMO

A dengue é uma arbovirose caracterizada por febre alta, exantema e manifestações hemorrágicas causada pelo vírus dengue (DENV1-4). O DENV é um vírus RNA fita simples de polaridade positiva pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. No Brasil, a doença vem causando sucessivos surtos nos últimos 30 anos, sendo as regiões Sudeste e Nordeste as mais afetadas. No Nordeste, o estado de Pernambuco (PE) reportou em 2010 o maior número de casos de dengue grave na sua história, índice que se manteve elevado no ano seguinte, com a introdução do DENV-4. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo principal a caracterização de aspectos clínicos, epidemiológicos, virais e imunológicos de casos suspeitos de dengue provenientes de epidemias ocorridas em PE. Para isto, foram avaliados dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de 403 casos suspeitos atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz em Recife/PE. Além disso, 191 amostras séricas foram analisadas para os estudos imunológicos e virológicos. Os pacientes foram classificados de acordo com a nova classificação da OMS, 2009 nos seguintes grupos: DSSA (19%, 78/403), DCSA (80%, 321/403), e DG (1%; 4/403). A distribuição temporal e espacial, evidenciou que junho e julho foram os meses que mais reportaram casos nos anos de 2010 e 2011, e Recife foi a cidade que mais concentrou casos da doença. O sexo feminino foi o gênero mais acometido (216/403, 53,60%), enquanto que pacientes de 06-10 anos foram os mais afetados. A febre foi o sinal clínico mais reportado (99,26%; 400/403), seguido de dor abdominal (66%; 266/403). Além destes, sinais clássicos como exantema (38,71%, 156/403) e manifestações hemorrágicas (43,42%; 175/403) também foram frequentes nesta casuística. O diagnóstico laboratorial confirmou a infecção pelo DENV em 72,8% (139/191) dos casos, e o MAC ELISA foi teste mais sensível (94,31%; 116/123), seguido pelos testes de NS1 (16,20%; 23/142), RT-PCR (14,60%; 20/137) e isolamento viral (4,0%; 1/25). Noventa e quatro (94%) dos pacientes diagnosticados com dengue apresentaram trombocitopenia. O diagnóstico molecular evidenciou a prevalência de DENV-1 e a identificação dos demais sorotipos no ano de 2010, bem como a ocorrência coinfeção entre DENV-1/2 (n=2) e DENV-1/3 (n=1). A análise filogenética de DENV-1 constatou a presença do genótipo V e a linhagem 1b. A quantificação de quimiocinas e fatores de crescimento por ELISA indicou: i) níveis séricos aumentados de MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e HGF nos pacientes DSSA e DCSA/DG quando comparados com os grupos controle ii) baixos níveis séricos de RANTES/CCL5 e PDGF-BB nos pacientes DSSA e DCSA/DG comparados com controles e iii) baixos níveis séricos de EGF nos pacientes DCSA/DG. Esses resultados demonstram que além de mediadores solúveis clássicos como as quimiocinas, fatores de crescimento parecem exercer papel importante na patogênese da infecção pelo DENV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação de
Medicina Tropical

ABSTRACT

Dengue is an arbovirose characterized by high fever, rash and hemorrhagic manifestations and is caused by the dengue virus (DENV1-4). DENV is a positive-polar single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family and to the genus *Flavivirus*. In Brazil, the disease has been causing successive outbreaks in the last 30 years, with the Southeast and Northeast being the most affected. In the Northeast, the state of Pernambuco (PE) reported the highest number of severe dengue cases in its history in 2010, an index that remained high in the following year with the introduction of DENV-4. In this sense, the main objective of this study was the characterization of clinical, epidemiological, viral and immunological aspects of suspected dengue cases from epidemics occurring in PE. For this, we evaluated the clinical, epidemiological and laboratory data of 403 suspected cases attended at the University Hospital Oswaldo Cruz in Recife / PE. In addition, 191 serum samples were analyzed for immunological and virological studies. Patients were classified according to the new WHO classification, 2009 in the following groups: DSSA (19%, 78/403), DCSA (80%, 321/403), and DG (1%, 4/403). The temporal and spatial distribution showed that June and July were the most reported cases in the years 2010 and 2011, and Recife was the city that most concentrated cases of the disease. The female gender was the most affected (216/403, 53.60%), while patients aged 6-10 years were the most affected. Fever was the most reported clinical sign (99.26%, 400/403), followed by abdominal pain (66%, 266/403). In addition, classic signs such as exanthema (38.71%, 156/403) and hemorrhagic manifestations (43.42%, 175/403) were also frequent in this series. The laboratory diagnosis confirmed DENV infection in 72.8% (139/191) of the cases, and the MAC ELISA was the most sensitive test (94.31%, 116/123), followed by the NS1 test (16.20%, 23/142), RT-PCR (14.60%, 20/137) and viral isolation (4.0%, 1/25). Ninety-four percent (94%) of patients diagnosed with dengue had thrombocytopenia. The molecular diagnosis revealed the prevalence of DENV-1 and the identification of the other serotypes in 2010, as well as the occurrence of co-infection between DENV-1/2 (n = 2) and DENV-1/3 (n = 1). DENV-1 phylogenetic analysis found the presence of genotype V and lineage 1b. Quantification of chemokines and growth factors by ELISA indicated: (i) increased serum levels of MCP-1 / CCL2, IP-10 / CXCL10 and HGF in DSSA and DCSA / DG patients compared to control groups (ii) low serum levels of RANTES / CCL5 and PDGF-BB in DSSA and DCSA / DG patients compared to controls and (iii) low serum levels of EGF in DCSA / DG patients. These results demonstrate that in addition to classical soluble mediators such as chemokines, growth factors appear to play an important role in the pathogenesis of DENV infection.

INDÍCE

1. Introdução	1
1.1. O agente etiológico	2
1.1.1. O vírus Dengue	2
1.1.2. Proteínas do DENV	3
1.1.3. Sítios de replicação	5
1.1.4. Replicação do DENV	6
1.1.5. Vetor e ciclo de transmissão	7
1.1.6. Evolução e diversidade genética do DENV	8
1.2. Manifestações clínicas das infecções pelos DENV	11
1.2.1. Classificação dos Casos de Dengue	11
1.3. Resposta imune ao DENV e imunopatogênese	13
1.3.1. Tempestade de citocinas	14
1.3.2. Facilitação Dependente de Anticorpo (ADE).	15
1.3.3. Pecado Antigênico Original	15
1.3.4. Virulência	16
1.4. Diagnóstico clínico-epidemiológico	17
1.5. Diagnóstico laboratorial	17
1.5.1. Isolamento Viral e imunofluorescência indireta	18
1.5.2. Ensaio imunoenzimático	17
1.5.3. RT-PCR e RT-PCR em tempo real	19
1.6. Epidemiologia da dengue	20
1.6.1. Dengue nas Américas	20
1.6.2. Dengue no Brasil	22
1.6.2.1. Dengue em Pernambuco	24
2. Justificativa	25
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	26
3.2.1. Aspectos clínico-epidemiológicos	26
3.2.2. Aspectos Laboratoriais e Virais	26
3.2.3. Aspectos Imunológicos	26
4. Material e Métodos	28
4.1. Considerações Éticas	28
4.2. Desenho do estudo e critérios de inclusão e exclusão para a investigação de casos suspeitos de dengue	28

4.3 Coleta, armazenamento e classificação das amostras	30
4.4 Análise estatística	30
4.5. Diagnóstico Laboratorial	31
4.5.1. Teste de captura de antígeno NS1 e dissociação térmica e ácida	31
4.5.2. Determinação dos anticorpos anti-DENV classe IgM	31
4.5.3. Determinação dos anticorpos anti-DENV classe IgG	31
4.5.4. Caracterização da resposta imune humoral (Primária e secundária)	32
4.5.5. Extração de RNA viral	32
4.5.6. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).	32
4.5.7. Isolamento Viral	34
4.5.8. Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento dos DENV	35
4.5.9. Sequenciamento, genotipagem e análise filogenética dos DENV	36
4.5.10. Quantificação de quimiocinas por ELISA.	37
4.5.11. Quantificação dos fatores de crescimento por ELISA	38
5. Resultados	39
5.1. Caracterização dos aspectos clínicos-epidemiológicos de casos de dengue ocorridos nas epidemias de 2010 e 2011 no estado de Pernambuco:	39
5.2. Avaliação dos métodos sorológicos e moleculares para a confirmação dos casos confirmados por critérios clínico-epidemiológicos:	49
5.3. Identificação do genótipo de DENV circulante em Pernambuco, 2010-2011	54
5.4. Análise dos parâmetros hematológicos nos casos confirmados de infecção pelo DENV	56
5.5. Análise dos mediadores inflamatórios (quimiocinas) em casos confirmados de infecção pelo DENV	57
5.6. Análise de fatores de crescimento em casos confirmados de infecção pelo DENV	58
6. Discussão	61
7. Conclusão	80
8. Perspectivas	81
9. Referências	82
10. Anexos	100

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1.1: Genoma dos <i>Flavivirus</i> .	3
Figura 1.2: Células alvo nas infecções pelo DENV.	6
Figura 1.3: Classificação clínica proposto pela OMS em 2009.	13
Figura 1.4. Distribuição mundial da média do número de casos de Dengue suspeitos ou confirmados relatados à OMS.	20
Figura 1.5: Panorama da dengue no Brasil durante os anos de 2010-2016.	24
Figura 5.1: Distribuição temporal dos casos de dengue no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.	39
Figura 5.2: Número de casos de dengue por gênero, no período de 2010 a 2011, no estado de Pernambuco (n=403).	41
Figura 5.3: Distribuição de casos de dengue por faixa etária no período de 2010 a 2011, no estado de Pernambuco (n=403).	41
Figura 5.4: Frequência das manifestações clínicas dos casos de dengue (n=403) ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.	43
Figura 5.5: Frequência das manifestações hemorrágicas (n=175/403) dos casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.	44
Figura 5.6: Frequência de edemas (n=36/406) dos casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.	44
Figura 5.7: Comorbidades (42/403) descritas nos casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.	45
Figura 5.8: Parâmetros Hematológicos de casos suspeitos de infecção pelo DENV em Pernambuco, anos 2010/2011.	47
Figura 5.9: Frequência das classificações clínicas de casos suspeitos e confirmados de dengue.	48
Figura 5.10: Frequência de positividade de detecção de anticorpos IgG e IgM anti-DENV dos casos de dengue, por dia de doença, inicialmente confirmados por critérios clínico-epidemiológicos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.	50
Figura 5.11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) para identificação do sorotipo infectante em casos suspeitos de dengue ocorridos em Pernambuco, 2010-2011.	53
Figura 5.12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) para identificação do sorotipo infectante em amostras com isolamento viral negativo.	54
Figura 5.13: Árvore filogenética baseada no gene do envelope do DENV-1 proveniente de Pernambuco no ano de 2010.	55

- Figura 5.14: Parâmetros Hematológicos de casos confirmados de infecção pelo DENV em Pernambuco, anos 2010/2011. **56**
- Figura 5.15: Dosagem de quimiocinas circulantes em pacientes infectados pelo DENV. **58**
- Figura 5.16: Dosagem de Fatores de crescimento circulantes em pacientes infectados pelo DENV. **60**

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1.1: Genótipos de DENV baseados em análise filogenética do sequenciamento do gene E.	11
Tabela 4.1: Características geográficas e populacionais dos municípios selecionados para a investigação de casos suspeitos de dengue no estado de Pernambuco, PE, Brasil.	28
Tabela 4.2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a sorotipagem dos DENV, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e cols. (1992).	33
Tabela 4.3: Reagentes utilizados na RT-PCR para detecção e tipagem dos vírus dengue, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e cols. (1992).	34
Tabela 4.4: Reagentes utilizados na RT-PCR para sequenciamento de cepas representativas de DENV-1, de acordo com o protocolo modificado de Miagostovich e cols. (2006).	36
Tabela 5.1: Distribuição dos municípios com maior número de casos de dengue no ano de 2010 (n=309) e 2011 (n=94), no estado de Pernambuco.	40
Tabela 5.2: Características demográficas dos casos suspeitos de dengue (n=403) ocorridos em Pernambuco entre 2010 e 2011 e classificados de acordo com a OMS (2009).	46
Tabela 5.3: Dados demográficos dos casos confirmados de infecção pelo DENV segundo classificação clínica, PE, 2010-2011.	48
Tabela 5.4: Distribuição dos casos confirmados conforme metodologia utilizada na investigação laboratorial dos casos de dengue (n=191), inicialmente confirmados por critérios clínico-epidemiológicos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.	49
Tabela 5.5: Caracterização da resposta imune dos casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.	51
Tabela 5.6: Detecção de antígeno NS1 em casos negativos, após as dissociações térmica e ácida de imunocomplexos.	51
Tabela 5.7: Identificação do sorotipo infectante de DENV pelo método de RT-PCR (n=20/137) em casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.	52

Lista de abreviaturas

ADE – Facilitação dependente de anticorpos (do inglês: Antibody-dependent enhancement)

AL – Alagoas

AP61 – Célula de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*

BHK21 – Rim de hamster recém-nascido (do Inglês: Baby hamster kidney)

C – Proteína do capsídeo

C6/36 – Célula de mosquito *Ae. Albopictus* clone 6 passagem 36

CE – Ceará

CHIKV – Vírus da Chikungunya (do inglês: Chikungunya virus)

DC – Células dendríticas (do inglês: Dendritic cells)

DC – Dengue clássico

DCSA – Dengue com sinais de alarme

DG – Dengue grave

DSSA – Dengue sem sinais de alarme

DSSA – Dengue sem sinais de alarme

E – Proteína do envelope

ECP – Efeito citopático

FHD – Febre hemorrágica do Dengue

HI – Inibição da hemaglutinação (do Inglês: *Hemagglutination inhibition*)

IFN – Interferon

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

JEV – Vírus da encefalite japonesa (do inglês: *Japanese encephalitis virus*)

LLC-MK2 – Células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*

M – Proteína de membrana

NK – Célula assassina natural (do inglês: Natural Killer)

NSP – Proteína não estrutural (do inglês: non-structural proteins)

ORF – do inglês “Open reading frame”

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

pDC – Células dendríticas plasmocitóides

PE – Pernambuco

PRR – Receptores

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

Rp – RNA polimerase

Rd – RNA dependente

RR – Roraima

RT-PCR – Transcriptase reversa seguida da reação pela cadeia da polimerase (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

SCD – Síndrome do choque por dengue

SFB – Soro fetal bovino

TBEV – Vírus da encefalite do carrapato (do inglês: *Tick-borne encephalitis virus*)

TNF – Fator de necrose tumoral (do inglês: Tumor necrosis fator)

UTR – Região não traduzida (do Inglês: Untranslated regions)

UV – Luz ultravioleta

WNV – Vírus do Oeste do Nilo (do inglês: West Nile virus)

YFV – Vírus da Febre Amarela (do inglês: *Yellow fever virus*)

ZIKV – Vírus da Zika (do inglês: *Zika virus*)

1. INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença sistêmica causada por um arbovírus, comum em muitas regiões tropicais e subtropicais, mantidos na natureza através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados, como primatas não humanos e humanos, e mosquitos hematófagos (Gubler, 2002; Roundy et al., 2017).

O agente etiológico é um vírus com transmissão aos seres humanos principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*) (San Martín et al., 2010).

De origem asiática, acredita-se que a existência de uma cepa ancestral selvagem tenha dado origem aos quatro sorotipos de dengue. Historicamente, registra-se os primeiros surtos de dengue durante a Dinastia Chin (265-420 d.C.), Dinastia Tang (610 d.C.) e Dinastia Northern Sung (992 d.C.) onde haviam relatos de uma infecção com aspectos semelhantes aos da infecção causada pelo dengue. A doença era chamada de “veneno da água”, devido a sua associação com a presença de água e insetos voadores (Revisado por Gubler, 1998; Gubler, 2006).

Após sete séculos, foram relatados casos apresentando doença muito similar à dengue durante os surtos de 1635 e 1639 nas Antilhas Francesas e Panamá, respectivamente; A primeira pandemia de dengue foi relatada na Ásia e em regiões do pacífico durante o período de 1779 a 1788 (Weaver & Vasilakis, 2009).

O termo “dengue” derivou da expressão “Ka-Dinga pepo” (origem espanhola), que significava uma cãibra súbita provocada por um espírito mau. No ano de 1869 a *London Royal College of Physicians* passou denominar a enfermidade, que até então era conhecida como “polka”, “febre articular”, “dinga”, “febre quebra ossos”, como dengue (Siler et al., 1926; Halstead, 1980).

No começo do século XX, a transmissão da febre amarela através de mosquitos já era fato científico. Com base nisso, suspeitava-se que a transmissão da dengue também ocorria por mosquitos, teoria que foi comprovada através dos estudos de Graham (1903), Bancroft (1906) e Cleland et al. (1918), (Siler et al. 1926). Em 1907, Ashburn e Craig afirmaram que o agente causador da dengue era um organismo microscópico e filtrável, e desta forma descartou-se o papel das bactérias e protozoários como agentes causadores da doença (Ashburn & Craig,

1907). Além disso, em 1931 houve também a implicação do *Aedes albopictus* como um vetor da dengue (Simmons., *et al.* 1931).

O primeiro isolamento viral foi realizado em 1944 no Japão, através da utilização de soro de pacientes na fase aguda da doença (Kimura & Hotta, 1944). Entre os anos de 1944 e 1945, o DENV foi isolado em amostras séricas de soldados infectados no Havaí, Índia e Nova Guiné (Sabin, 1952). Através de ensaios de inibição de hemaglutinação (HI), foi possível a distinção antigênica dos sorotipos DENV-1 e DENV-2, tendo como protótipos as cepas Havaí e Nova Guiné, respectivamente. Em 1956, durante epidemia ocorrida em Manilla foram isolados os sorotipos 3 e 4 (Hammon *et al.*, 1960). A partir desse período, epidemias de dengue começaram a ser registradas em outros países asiáticos, tais como Tailândia, Cingapura, Malásia, Vietnã, Indonésia e Myanmar (Gubler, 2011).

Após o fim da segunda guerra mundial, alguns determinantes sócio-ambientais, como urbanização, aumento da densidade vetorial e aumento e rapidez no transporte de pessoas, influenciaram na dispersão dos sorotipos e o aumento do número de casos de dengue ao redor do mundo. Sendo assim, por volta dos anos 90, a globalização da dengue já era uma realidade e um grande problema de saúde pública, em especial para países dos trópicos (Weaver & Vasilakis, 2009).

1.1. Agente etiológico

1.1.1. O Vírus Dengue

Os vírus dengue (DENV) pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (Calisher *et al.*, 1989). O *Flavivirus* é o maior gênero e contém 53 espécies de vírus (ICTV, 2017), que incluem 34 vírus transmitidos por mosquitos e cerca de 17 vírus transmitidos por carrapatos (Diamond, 2003). Além dos DENV, o gênero inclui cerca de 40 outros agentes que causam desde quadros febris semelhantes à gripe, encefalites e doenças hemorrágicas (Bollati *et al.*, 2010). Dentre estes vírus, estão o vírus da febre amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da encefalite do carrapato (TBEV) e o vírus Zika (ZIKV) (revisado por Gebhard *et al.*, 2011).

Os DENV são vírus pequenos com aproximadamente 50nm, e possuem um envelope protéico associado a uma bicamada lipídica (Rodenhuis-Zybert *et al.*,

2010). O genoma viral consiste em RNA de fita simples e polaridade positiva com cerca de 11 kb, que é traduzido através de uma única fase aberta de leitura (ORF) em uma poliproteína que codifica para três proteínas estruturais - capsídeo (C), pré-membrana (prM), envelope (E) e 7 proteínas não estruturais (NSPs) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) (revisado por Khetarpal & Khanna, 2016). Figura 1.1

As proteínas estruturais formam a partícula viral, enquanto as NSPs possuem um importante papel na replicação viral, montagem e modulação da resposta imune inata (Zeidler et al., 2017).

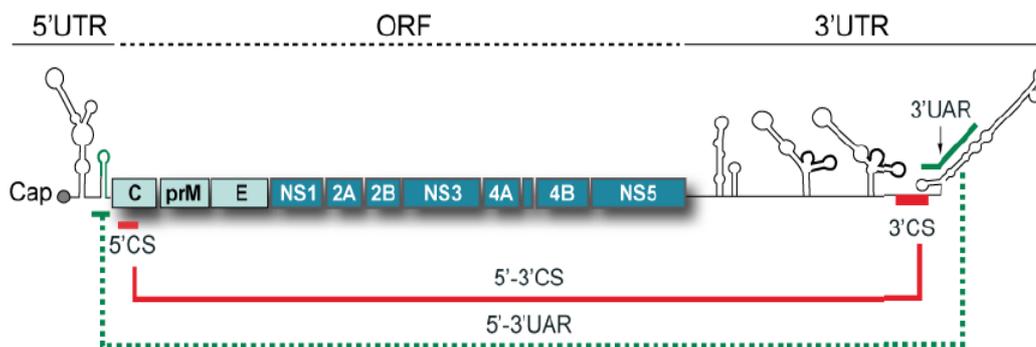


Figura 1.1: Genoma dos *Flavivirus* (adaptado de Gebhard *et al.*, 2011). (UTR: do inglês “untranslated region”; ORF: do inglês “open reading frame”)

1.1.2. Proteínas do DENV

A proteína do capsídeo é a primeira a ser sintetizada e possui cerca de 11kDa (Weaver & Vasilakis, 2009). Esta proteína compõe a partícula viral e possui caráter básico (Chambers *et al.*, 1990). A glicoproteína de membrana prM (cerca de 27-31 kDa), faz parte da estrutura de virions imaturos. Esta proteína é clivada ainda na via trans-Golgi, originando a proteína M que constitui a estrutura de virions maduros (Weaver & Vasilakis, 2009).

A proteína do envelope viral, a proteína E, é o antígeno mais exposto dos DENV. Esta proteína possui cerca de 60-70% de similaridade em suas sequências de aminoácidos dentre os quatro sorotipos de DENV (revisado por Khetarpal &

Kanna, 2016) e possui importante papel na indução de anticorpos neutralizantes durante a resposta imune humoral (Chen *et al.*, 1996). A proteína E possui três importantes domínios: domínio I, uma estrutura tipo barril orientada paralelamente a membrana viral; domínio II, uma região altamente conservada entre os flavivírus; domínio III, região de interação entre receptores celulares e epítomos, assim como anticorpos IgM que se ligam a epítomos localizados nesta área (Crill & Chang, 2004; Diamond, 2003). O domínio III, tem sido implicado como determinante de virulência entre os genótipos de dengue americanos (Leitmeyer *et al.*, 1999).

As proteínas NSPs são expressas em células hospedeiras infectadas, porém não detectadas nos virions. Acredita-se que estas proteínas estejam associadas com a replicação do genoma viral, que ocorre em associação a membrana da célula (Welsch *et al.*, 2009). Além disso, as proteínas NS podem desempenhar diferentes funções tais como montagem, organização e liberação de virion (Lindebach *et al.*, 2007).

A proteína NS1, de peso molecular entre 46 e 55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação, está relacionada à replicação viral (revisado por Khertarpal & Khanna, 2016). A NS1 pode estar associada membrana (mNS1) ou secretada (NS1 solúvel-sNS1) para o meio extracelular, na forma hexamérica (Mason, 1990; Flamand *et al.*, 1999). Anticorpos anti-NS1 podem ser produzidos, uma vez que a proteína pode estar ancorada em células infectadas (Miller, 2010). As funções da forma secretada (sNS1) não são claras, embora o envolvimento na patogênese e em mecanismos de evasão do sistema imune tenham sido propostos (Muller e Young, 2017).

A sNS1 pode ser encontrada circulando no soro de pacientes do primeiro ao nono dia após o início da febre (Young *et al.*, 2000, Alcon *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2006) e, baseando-se nestas características, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica desta proteína, foram desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial (Dussart *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2016).

Além disso, a NS1 tem sido associada como um marcador de gravidade da doença (Avirutnan *et al.*, 2006; De La Cruz Hernández *et al.*, 2012; Allonso *et al.*, 2014; Paravitane *et al.*, 2014; Watterson *et al.*, 2016), visto que ativa o sistema complemento (Avirutnan *et al.*, 2006), e foi recentemente associada com a produção de mediadores inflamatórios e ativação de células efetoras do sistema imunológico (Modhiran *et al.*, 2015; Adikari *et al.* 2016). Estudos recentes indicam que a NS1

pode induzir aumento na permeabilidade endotelial *in vitro* (Beatty et al., 2015) e extravasamento vascular *in vivo* (Puerta-Guardo et al., 2016; Malavige & Ogg., 2017).

A proteína NS2A possui cerca de 22 kDa e é considerada uma proteína de transmembrana (Khromykh *et al.*, 1999), relacionada com o transporte do RNA para o local de replicação e montagem do vírus (Mackenzie *et al.*, 1998; Jones et al., 2005).

A proteína NS2B possui cerca de 14 kDa e se associa com a NS3 para formar o complexo de protease viral (Erbel *et al.*, 2006; Leung *et al.*, 2001). Sendo assim, quando associada a NS3, possui uma função proteolítica na biossíntese viral (Rice, 1996).

A proteína NS3 é uma proteína multifuncional com 70 kDa, está envolvida no processamento da poliproteína viral e da replicação do RNA (Jones *et al.*, 2005; Munoz-Jordan *et al.*, 2003).

As proteínas NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas de 16 e 27 kDa, respectivamente, e são consideradas como inibidoras da síntese de interferon (Jones *et al.*, 2005; Munoz-Jordan *et al.*, 2003). A NS5 é a maior (103 kDa) e mais bem conservada proteína entre todos os *flavivirus*. Possui ação RNA polimerase dependente de RNA e atividade metil transferase. (revisito por Weaver & Vasilakis, 2009).

1.1.3. Sítios de replicação

A transmissão dos DENV ocorre durante o repasto sanguíneo do mosquito vetor, com a inoculação do vírus juntamente com a saliva. O vírus inoculado interage com os receptores na membrana plasmática das células-alvo da infecção (Lindenbach & Rice, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

Com base na literatura, verifica-se a infecção dos DENV em variadas células, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células de langerhans, hepatócitos, linfócitos, células endoteliais e células neuronais (Rosen *et al.*, 1999; King *et al.*, 1999; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006; Cabrera-Hernandez *et al.*, 2007; Paes *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2000; Lozach *et al.*, 2005; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Contudo, existe o consenso que as principais

células alvo de infecção pelos DENV sejam as de linhagem fagocítica, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (Jessie, 2004), Figura 1.2

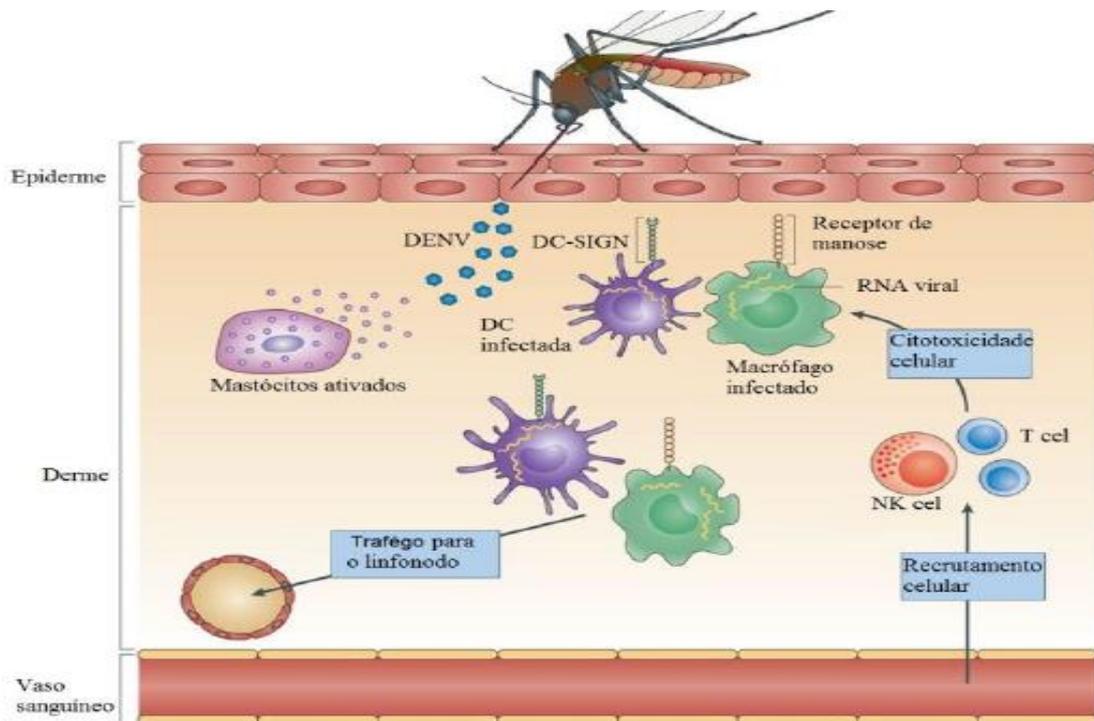


Figura 1.2: Células alvo nas infecções pelo DENV (Adaptado de St John *et al.*, 2013).

1.1.4. **Replicação do DENV**

Os DENV infectam as células hospedeiras através de receptores que medeiam endocitose. Em consequência da internalização e acidificação do endossomo, ocorre a fusão da membrana vesicular e viral, o que por sua vez permite a liberação do RNA genômico no citoplasma, que serve como mRNA.

A tradução da ORF no retículo endoplasmático rugoso (RER) produz uma grande poliproteína que é clivada em proteínas maduras. A região N-terminal da poliproteína codifica as proteínas estruturais (C-prM-E) e NSPs (Rice *et al.*, 1985).

Posteriormente a tradução do RNA, ocorre hipertrofia de membranas intracelulares induzidas pelo vírus, que origina estruturas conhecidas como membranas convolutas e pacotes vesiculares (Gillespie *et al.*, 2010). A partir daí, ocorre a síntese de RNA em estreita associação com membranas celulares dentro de pacotes vesiculares (complexo de replicação viral). O processo começa com a

síntese da fita negativa de RNA, que é utilizada como um molde para a amplificação de fita positiva de RNA genômico. A reação enzimática é catalisada pela atividade de RNA polimerase RNA dependente (RpRd) da proteína viral NS5 em associação com a protease/helicase NS3, outras proteínas NS, e possivelmente fatores do próprio hospedeiro. O RNA recém-sintetizado associa-se à proteína do capsídeo por um mecanismo ainda não conhecido. O complexo RNA-capsídeo (RNA-C) é organizado dentro do lúmen do retículo endoplasmático adquirindo a bicamada lipídica, e as proteínas E e prM. A proteólise mediada por furina da prM na via trans-Golgi aciona o arranjo, homodimerização da proteína E, e assim a formação de novas partículas virais (Heinz & Allison *et al.*, 2003; Gebhard *et al.*, 2011).

Após um processo de exocitose, as partículas virais maduras ganham a corrente sanguínea, que em alta quantidade configura a viremia, e neste período podem infectar o mosquito vetor (Chambers, 1990; Tomlinson *et al.*, 2009).

1.1.5. Vetor e ciclo de transmissão

Os DENV são transmitidos principalmente por forma vetorial pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (WHO 2009). No entanto, em determinadas regiões do globo, o protagonismo das transmissões vetoriais também pode ser das espécies *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis* (Malavige *et al.* 2004). Além disso, *Ae. niveus* também é apontado como um vetor de importância silvestre (Khetarpal & Khanna, 2016).

A transmissão vetorial envolvendo o *Ae. aegypti*, envolve o ciclo Homem – Mosquito – Homem, ou seja, a fêmea do *Aedes* se infecta durante o repasto sanguíneo de um indivíduo infectado, e após o período de incubação de 8 a 12 dias, a mesma encontra-se apta a infectar novos indivíduos (SVS/MS, 2010). No entanto, ten Bosch e colaboradores (2018) salientam que a maioria das transmissões Homem – mosquito, resultam da infecção do artrópode em indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos, desta forma ampliando a atenção das pautas de vigilância epidemiológica. Contudo, além desta via clássica de transmissão homem-mosquito, sabe-se que a fêmea infectada pode transmitir o vírus à sua prole, através da via transovariana (Rigau-Perez *et al.*, 1998).

Embora a transmissão vetorial seja a mais importante em termos de saúde pública, um estudo demonstrou que o DENV também permanece infectivo em bolsas de plaquetas e de células vermelhas, podendo assim oferecer riscos de infecção aos indivíduos que façam uso de hemoderivados (Sutherland *et al.*, 2016).

Outra via de grande importância que vem se destacando ao longo dos últimos anos, é a via transplacentária (Maroun *et al.*, 2008), em especial, devido ao potencial risco de danos ao feto/conceito e até mesmo à própria gestante/puérpera (Pouliot *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2016; Brasil e Lupi, 2017).

A recente descrição do genoma do vírus em sêmen de paciente com 37 dias de sintomas, reforça a necessidade de estudos que investiguem a persistência viral e um possível meio de transmissão sexual (Lalle *et al.*, 2018).

1.1.6. Evolução e Diversidade Genética do DENV

A evolução do DENV tem tido um impacto importante sobre a sua virulência para os seres humanos e epidemiologia da doença em todo o mundo. Embora diferenças antigênicas e genéticas nas cepas virais sejam evidentes, a falta de modelo animal que reproduza as formas graves da doença dificulta estudos sobre a virulência dos DENV. Entretanto, estudos filogenéticos permitem a correlação entre estas variantes específicas e gravidade da doença. Apesar do complexo conjunto de fatores que contribuem para a epidemiologia, estudos sugerem que estruturas virais específicas podem contribuir para o aumento da replicação nas células-alvo humanas e intensificar a transmissão pelo mosquito vetor. Entretanto, o estado imunológico e possivelmente características genéticas do hospedeiro também são determinantes de virulência ou manifestação da doença (Rico-Hesse, 2003; Weaver e Vasilakis, 2009).

Durante o ciclo replicativo viral, a falta do mecanismo de correção da RNA polimerase RNA dependente, associada às rápidas taxas de replicação, o grande tamanho populacional e a pressão imunológica do hospedeiro, podem levar a mutações do vírus e, variantes genéticas, são observadas para os quatro sorotipos de DENV. Aproximadamente uma mutação ocorre a cada ciclo replicativo do genoma (Steinhauer *et al.*, 1992; Drake, 1993; Twiddy & Holmes, 2003).

O sequenciamento do genoma viral permitiu a caracterização das diferentes variantes de DENV e estabelecer as relações evolutivas entre quatro sorotipos. O termo "genótipo" foi definido como o agrupamento de DENV com divergência nucleotídica $\geq 6\%$ para uma determinada região do genoma (Rico-Hesse, 1990; Chen e Vasilakis, 2011). A identificação dos diferentes genótipos pode ser realizada pela análise completa do genoma, no entanto o gene E, que possui cerca de 1495 pares de bases (pb), é, geralmente o alvo comumente utilizado (Lanciontti *et al.*, 1994, Klungthong *et al.*, 2008).

Os avanços nas técnicas moleculares e disponibilidade de programas de bioinformática tem permitido, cada vez mais, o processamento, não só de fragmentos genômicos maiores, mas também de maiores quantidades de sequências (de Bruycker-Nogueira *et al.*, 2016), de grande relevância para os estudos filogenéticos e evolutivos. Conforme mencionado, de acordo com Rico-Hesse (1990), define-se como genótipo, grupos dentro de um sorotipo que possuem divergência nucleotídica maior ou igual a 6%. Já o termo "linhagem" é atribuído aos grupos ou clades inferiores aos genótipos (Mendez *et al.*, 2012; de Bruycker-Nogueira, 2015; 2018).

Atualmente, atribui-se ao DENV-1 a existência de cinco genótipos (tabela 1.1). Genótipo I: reúne cepas do Sudeste Asiático, China e Leste Africano; Genótipo II: Cepas originárias da Tailândia; Genótipo III: Cepas originárias da Malásia; Genótipo IV: Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália; Genótipo V: Cepas das Américas, Oeste Africano e algumas cepas da Ásia (Rico-Hesse, 1990; Weaver & Vasilakis, 2009; Chen & Vasilakis, 2011). No Brasil, até o momento, três linhagens do Genótipo V já foram descritas (Dos Santos *et al.*, 2011; De Bruycker-Nogueira *et al.*, 2015; 2018).

Em relação ao DENV-2 foram caracterizados seis genótipos distintos: Genótipo Asiático I: Malásia e Tailândia; Genótipo Asiático II: Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; Genótipo Cosmopolita: Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio; Genótipo Americano: América Latina, Cepas antigas do Caribe, Subcontinente indiano e Ilhas do Pacífico; Genótipo Sudeste Asiático/Americano: Tailândia e Vietnã, e Cepas americanas das duas últimas décadas; Genótipo Selvagem: Oeste Africano e Sudeste Asiático (Weaver e Vasilakis, 2009; Chen & Vasilakis, 2011). No Brasil, o genótipo circulante é o genótipo sudeste asiático, com duas linhagens identificadas.

A linhagem I circulou na década de 1990, e linhagem II reemergiu em uma grave epidemia de DENV-2 em 2007/2008 (Oliveira *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2013).

O DENV-3 era um sorotipo que compreendia inicialmente quatro genótipos (Lanciotti *et al.*, 1994). No entanto, através de análises disponíveis no próprio GenBank, atribui-se na atualidade cinco genótipos: Genótipo I: Sudeste Asiático, Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas, Taiwan e Ilhas do Sul do Pacífico. Genótipo II: Tailândia, Cingapura, Indonésia, Taiwan, Vietnã, Bangladesh, Camboja, China Japão e Mianmar. Genótipo III: Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Cingapura, Samoa, Leste Africano, Américas Central e do Sul, Caribe e Europa. Genótipo IV: Porto Rico e Taiti. Genótipo V: Filipinas, Japão, China e cepas do Brasil (Chen & Vasilakis, 2009). No Brasil, há a descrição que os Genótipos I (Barcelos Figueiredo *et al.*, 2008), III (Miagostovich *et al.*, 2002) e V (Nogueira *et al.*, 2008) circularam no país. No entanto, através em um estudo filogenético da proteína E que incluiu 103 amostras de vários países, Araújo e colaboradores (2009) concluíram que o genótipo descrito por Barcelos Figueiredo e colaboradores e Nogueira e colaboradores, tratava-se do Genótipo V.

Por último, o DENV-4 ao qual era atribuído apenas dois genótipos (Lanciotti *et al.*, 1997), atualmente é constituído por quatro genótipos: Genótipo I: Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia, Japão, China e Brasil; Genótipo II: Sudeste Asiático, China, Ilhas oeste do Oceano Pacífico, Austrália, Caribe, Américas e Ilha de Páscoa; Genótipo III: Tailândia; Genótipo IV: Malásia (Klungthong *et al.*, 2004; Villabona-Arenas *et al.*, 2011; Chen & Vasilakis, 2011). No Brasil, as cepas de DENV-4 circulantes são pertencentes aos Genótipo I e II (Nunes *et al.*, 2012; Heringer *et al.*, 2017).

Tabela 1.1: Genótipos de DENV baseados em análise filogenética do sequenciamento do gene E (Adaptado de Weaver & Vasilakis, 2009).

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

1.2. Manifestações clínicas das infecções pelos DENV

A dengue possui amplo espectro clínico, que inclui tanto manifestações de período prodromico a manifestações clinicas graves (WHO, 2009). O período de incubação da doença dura cerca de 3 a 15 dias. Contudo, por volta do quinto ou sexto dia pós-infecção, começam a surgir os primeiros sinais e sintomas, como a febre alta de início súbito e intensa cefaleia (SVS/MS, 2010; Malavige *et al.*, 2004).

1.2.1. Classificação dos Casos de Dengue

Inicialmente a classificação dos casos de dengue era baseada na definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) do ano de 1997. A antiga classificação classificava a doença em Febre do dengue (FD), Febre hemorrágica do dengue

(FHD) e Síndrome do choque por dengue (SCD) (Tukasan *et al.*, 2017). Além da classificação de casos de 1997, a partir de 2001, o Brasil passou a adotar o termo “Dengue com complicações” (DCC) utilizado somente no país, o que por sua vez complicava a comparação das taxas de dengue com outros países (Cavalcanti *et al.*, 2015). Contudo, o fato que levou a revisão da classificação antiga foi dificuldade em aplicar os critérios propostos pela OMS (1997) na prática clínica, juntamente com o aumento do número de casos de dengue grave, que não preenchiam os critérios estritos para classificação em FHD (WHO, 2009).

Com o intuito de facilitar o manejo dos pacientes diagnosticados com dengue e após um estudo denominado “DENCO” (do inglês Dengue Control), em 2009, a OMS passou a classificar os casos de dengue em Dengue com sinais de alarme (DCSA), Dengue sem sinais de alarme (DSSA) e Dengue grave (DG), figura 1.3. Os pacientes com DSSA podem apresentar sinais ou sintomas como náusea, vômito, erupções cutâneas, mialgia, cefaleia, artralgia, teste do torniquete positivo sem sinais de hemorragia e leucopenia. Os pacientes com DCSA podem apresentar dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de líquido, letargia, agitação, hepatomegalia (aumento >2cm), elevação das transaminases hepáticas e diminuição na contagem de plaquetas. Os pacientes com DG apresentam extravasamento plasmático grave, podendo levar ao choque e ao acúmulo de fluido, desconforto respiratório, hemorragias graves e comprometimento de órgãos e sistemas, tais como fígado, sistema nervoso central (com alteração da consciência) e coração (WHO, 2009). Esta nova classificação, apesar de menos específica, permitiu o melhor manejo dos casos graves (Cavalcanti *et al.* 2015).

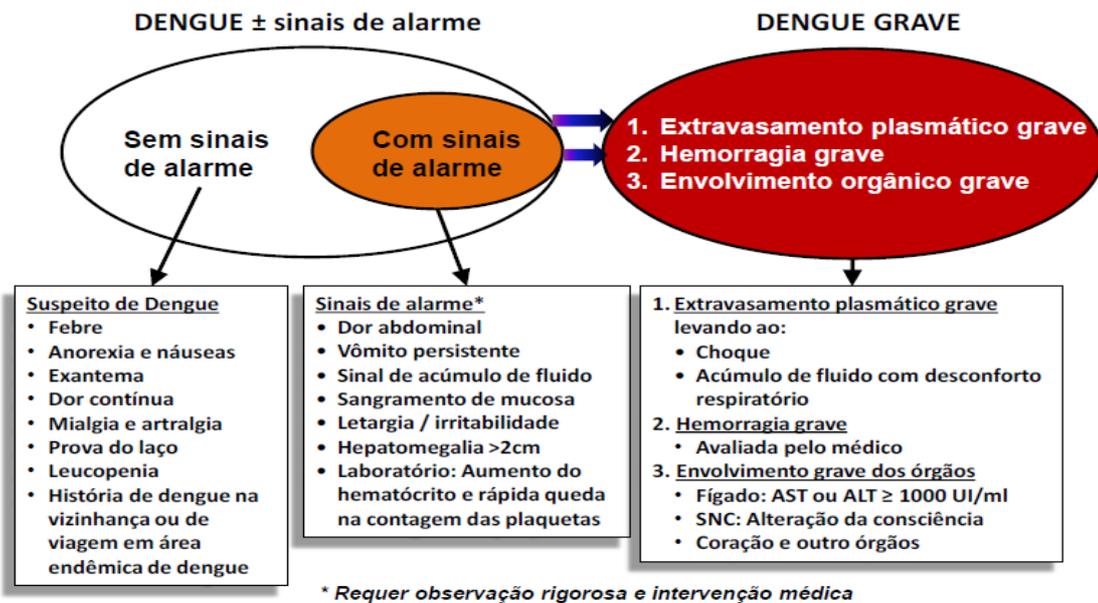


Figura 1.3: Classificação clínica proposto pela OMS em 2009 (Adaptado de WHO, 2009).

1.3. Resposta imune ao DENV e imunopatogênese

A imunidade inata constitui a primeira barreira à entrada e instalação de patógenos. A resposta imune inata é ativada durante as infecções virais. Células como as Natural Killer (NK), Células Dendríticas (DC), Células Dendríticas Plasmocitóides (pDC) e monócitos são importantes mediadores do sistema imune inato. Estas células expressam “Receptores de Reconhecimento Padrões” (PRR) na membrana plasmática e no citoplasma. Atrelado a isto, variados patógenos possuem os chamados “Padrões Moleculares Associados a Patógenos” (PAMP) que são estruturas reconhecidas pelas células do sistema imune inato (Akira & Takeda, 2004). A ação efetora das células da imunidade inata resulta na produção dos interferons (IFN) tipo I (α e β) e na indução da resposta inflamatória com produção de citocinas. Sendo assim, as células dendríticas presentes na pele, são as primeiras a serem infectadas após a inoculação do DENV no hospedeiro (Back & Lundkvist, 2013). Em consequência, as DCs iniciam a produção dos IFNs do tipo I no início da infecção. Evento de fundamental importância para a ativação da resposta imune inata e amplificação da resposta imune adaptativa (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007).

Dentre várias funções efetoras, a produção de citocinas é considerada de fundamental importância durante a resposta imune celular ao DENV, que por sua vez

pode ser considerada protetiva ou danosa ao hospedeiro (Back & Lundkvist, 2013). A produção de mediadores inflamatórios solúveis é considerada uma das chaves para a patogênese da dengue (Patro *et al.*, 2019), pois observa-se que níveis aumentados de citocinas e quimiocinas, tais como TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-8 e IL-18 relacionam-se com quadros graves de dengue (revisto por Solórzano, 2014). Como exemplo da interferência de citocinas e quimiocinas na fisiopatologia da dengue, destaca-se o extravasamento plasmático de curta duração mediado pela resposta imunológica do hospedeiro, como sendo resultado da alteração da integridade do tecido endotelial promovido pela ação destes mediadores inflamatórios solúveis (Srikiatkachorn & Green 2010).

1.3.1. Tempestade de citocinas

A tempestade de citocinas consiste na produção exacerbada e a falta de controle na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este evento, embora marcante na imunopatogênese da dengue, é visto em outras doenças virais como Epstein-Barr, Citomegalovírus, Varíola, Influenza, Síndrome Respiratória por *Coronavírus*, e até mesmo em infecções bacterianas como aquelas produzidas por *Streptococos* do grupo A. Além destas doenças infecciosas, a tempestade de citocinas também aparece em doenças como a Esclerose Múltipla e a Pancreatite (Tisoncik *et al.*, 2012).

Sabe-se que citocinas como TNF- α , IFN-gama e IL-1 β possuem ação sinérgica no que concerne a integridade endotelial, em especial a permeabilidade. É visto que altas concentrações de citocinas solúveis liberadas por linfócitos T, monócitos, macrófagos e células endoteliais em pacientes com infecção por DENV, estão associadas em quadros graves da patogênese do dengue (Malavige & Ogg, 2012). Estudos tem apontado uma vasta ativação imune e produção exacerbada de citocinas, com o melhoramento da permeabilidade vascular, o que consequentemente desencadeia um quadro de extravasamento plasmático (Her *et al.*, 2017).

Além das citocinas supracitadas, há o registro de outras citocinas associadas à permeabilidade do tecido endotelial, tais como IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10,

IL-12, HMGB1 (high-mobility group protein 1), MIF, CCL2/MCP-1 e metaloproteinases de matriz (Rothman, 2011).

1.3.2. Facilitação Dependente de Anticorpo (ADE).

A observação de que muitos pacientes apresentando a FHD apresentavam anticorpos heterólogos levou a formulação da teoria da Facilitação Dependente de Anticorpo (ADE). A ADE foi sugerida por Halstead na década 1970, através de estudos utilizando primatas não humanos. As células dos animais tratadas com anticorpos anti-DENV apresentaram maior carga viral comparadas aquelas não tratadas. Desta forma, a presença de anticorpos heterólogos durante infecções sequenciais, foi e ainda é objeto de especulação tendo papel importante na patogênese da infecção pelo DENV (Halstead, 1965). Anticorpos chamados de sub-neutralizantes e de reação-cruzada participariam efetivamente no mecanismo de ADE. Por outro lado, anticorpos neutralizantes protegem contra a infecção.

O processo de ADE ocorre quando um anticorpo heterólogo liga sua porção Fc à porção FcγR na superfície de células-alvo, monócitos e macrófagos (Zaitseva *et al.*, 2010; Welsch *et al.*, 2009). Sendo assim, a endocitose do complexo vírus-anticorpo anti-DENV ocorre de forma mais eficiente se comparada a entrada na célula de partículas virais livres.

Durante a ADE, em decorrência da facilidade em infectar células ocorre um aumento da viremia e simultânea liberação de citocinas e quimiocinas. O fenômeno conhecido como tempestade de citocinas (“cytokine storm”) é resultante da exacerbação da resposta inflamatória e é bastante discutido na infecção pelo DENV e frequentemente associado aos casos graves. (Revisado por Brown *et al.*, 2006).

1.3.3. Pecado Antigênico Original

Na infecção pelo DENV, subpopulações de células T de memória respondem de forma cruzada aos sorotipos heterólogos durante as infecções secundárias, no entanto estas subpopulações não conferem proteção contra o sorotipo atual durante as infecções secundárias (Kurane *et al.*, 2011). Este mecanismo é conhecido como Pecado Antigênico Original. A associação deste mecanismo com a patogênese do DENV foi proposta por Mongkolsapaya e

colaboradores em 2003 (Mongkolsapaya et. al.2003). De acordo com a teoria do Pecado Antigênico Original, durante as infecções sequenciais as células de memória induzidas pela exposição prévia a outro sorotipo, respondem mais rapidamente se comparadas aquelas ativadas pelo sorotipo infectante. De fato estas células de memória possuem baixa avidéz pelos epítópos do sorotipo infectante e consequentemente seriam menos eficazes no “*clearence*” viral, com alta produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL-1 β e IL-6. Este cenário culminaria com a alteração das células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular contribuindo para o desenvolvimento de formas graves da doença (Remy, 2014).

1.3.4. Virulência

Fatores virais possuem papel importante na patogênese de casos graves de dengue. Adicionalmente, a taxa de replicação e a infectividade do DENV variam conforme a cepa (revisado por Gubler *et al.*,1998). Especula-se que determinantes primários de dengue grave residam (i) no aminoácido 390 da proteína E, podendo alterar interações com receptores celulares; (ii) nos nucleotídeos de 68-80 da região 5' não traduzida (UTR), podendo levar implicações na tradução inicial; (iii) nos 300 nucleotídeos anteriores à região 3' UTR, que podem regular a replicação viral (Weaver & Vasilakis, 2009).

A primeira forte evidência em relação aos determinantes genéticos na gravidade de casos de dengue, veio através de estudos com DENV-2, que indicaram que o genótipo asiático está associado com gravidade da doença, enquanto que isolados de genótipo Americano não estão (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Além disto, os sorotipos DENV-1 e DENV-3 estão associados a FHD em infecções primárias, enquanto que DENV-2 e DENV-4 foram associados com FHD em infecções secundárias (Nisalak *et al.*, 2003; Anantapreecha *et al.*,2005).

Em 2007/2008 o DENV-2 causou uma das maiores epidemias de dengue da história do Brasil, com cerca de 491 mortes. Embora o genótipo isolado tenha sido o mesmo de sua introdução no Brasil, o Sudeste-Asiático, observou-se a emergência de uma nova linhagem (linhagem II) apresentando asparagina, que é uma mutação associada a FHD em cepas de origem Asiática (Faria *et al.*, 2013).

1.4. Diagnóstico clínico-epidemiológico

Para a realização do diagnóstico com base em achados clínicos e epidemiológicos, deve-se proceder na anamnese do paciente e levar em consideração que pacientes suspeitos de dengue, são pacientes que apresentam febre aguda e pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retroorbitária, mialgias, artralgias, prostração ou exantema, associados ou não a presença de hemorragias. Além de ter estado em áreas com incidência dengue ou infestação de *Aedes aegypti* (SVS/MS, 2010).

1.5. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial específico de dengue envolve a detecção do vírus, do ácido nucleico, antígenos e anticorpos. Para pacientes em fase aguda, ou seja, com até cinco dias doença, aconselha-se o uso de isolamento viral e detecção de ácido nucleico e antígenos. Embora os métodos de diagnóstico de dengue nem sempre estejam disponíveis para os profissionais da assistência médica, sabe-se que alguns métodos como isolamento viral, detecção do genoma e do antígeno viral são de alta especificidade, portanto de grande valia para o diagnóstico diferencial (WHO, 2009; SVS/MS, 2016).

1.5.1. Isolamento viral e imunofluorescência indireta

Esta técnica, considerada padrão-ouro, consiste na inoculação de amostras coletadas em estágio de viremia, em linhagens de células de mosquitos *Ae. albopictus* (C6/36) ou em células de *Ae. pseudoscutellaris* (AP61). Além destas, células Vero, LLCMK2 e BHK21, também são células eficientes para inoculação viral (WHO, 2009). No entanto, células C6/36 são as linhagens celulares mais utilizadas, além do fato de serem fácil manutenção e mais sensíveis se comparadas a células de vertebrados (Igarashi, 1978; Tesh, 1979).

Após a etapa de inoculação viral, é comum as células apresentarem efeito citopático (ECP), e a tipagem viral pode ser realizada através da detecção dos

antígenos virais através de imunofluorescência e a tipagem viral pode ser realizada utilizando anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo (Gubler *et al.*, 1984).

1.5.2. Ensaio imunoenzimático

Ensaio sorológico são mais comumente utilizados para o diagnóstico de dengue, em especial pelo fato do baixo custo e de simples execução, se comparados com as técnicas de biologia molecular (Guzman *et al.*, 2010).

Anticorpos anti-dengue da classe IgM começam a ser produzidos entre o terceiro e quinto dia após o início da doença (Guzman *et al.*, 2010), e podem ser detectados a partir do sexto dia de doença, com pico de detecção após 2 semanas e permanecem detectáveis por um período de até três meses (Gubler & Sather, 1988). Sendo assim, o teste sorológico MAC-ELISA quando reativo pode revelar infecção ativa ou recente. No passado, o teste era realizado utilizando antígenos específicos para os quatro sorotipos, derivados de inoculação em cérebro de camundongos, no entanto a comercialização do método aperfeiçoou-o e atualmente utilizam-se antígenos derivados da proteína E, substituindo desta forma o protocolo inicial (Kuno *et al.*, 1987).

Os anticorpos anti-DENV da classe IgG, são detectados a partir do 5º dia de doença na infecção primária, e na infecção secundária ocorre em altos títulos já na fase aguda da doença, permanecendo detectáveis por toda a vida (Schilling *et al.* 2004; Guzman *et al.* 2010). Desta forma, além de caracterizar a resposta primária e secundária, o teste substitui o teste HI (Miagostovich *et al.*, 1999). Além disto, a OMS recomenda o uso combinado de IgM e IgG para a caracterização da resposta primária e secundária (WHO, 2009).

Kits comercialmente disponíveis para detecção de IgM e IgG são muito utilizados, porém a sensibilidade e especificidade destes pode variar muito e, resultados falso-positivos podem ocorrer em pacientes com infecções prévias de dengue ou outros flavivírus, devido a epítomos de reação cruzada compartilhados na proteína E destes vírus (Peeling *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2017).

O método de detecção do antígeno NS1 é amplamente utilizado para diagnóstico de infecções agudas, pois a NS1 é uma proteína que pode ser detectada

na forma secretada na corrente sanguínea durante a replicação viral (Young *et al.*, 2000). Testes de ELISA e imunocromatográficos rápidos para a detecção específica da proteína NS1 de DENV foram desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Dussart *et al.*, 2006; Phuong *et al.*, 2009; Blacksell *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2014).

Apesar da boa sensibilidade e especificidade para casos de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Lima *et al.*, 2010); uma menor sensibilidade para casos de DENV-4, foi reportada, principalmente em casos de infecção secundária, quando a formação de imuno-complexos entre o antígeno NS1 e anticorpos prévios, pode ocorrer. Diante disso, a utilização de protocolos de dissociação térmica ou ácida, pode aumentar significativamente a sensibilidade na confirmação destes casos (Lima *et al.* 2014).

1.5.3. RT-PCR e RT-PCR em tempo real

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é considerada um método rápido, simples, sensível e reprodutível. Este método pode ser empregado para detectar RNA em amostras clínicas humanas, tecidos de autópsia e mosquitos (Gubler *et al.*, 1996).

Embora as opções de protocolo sejam diversas, o protocolo mais utilizado é que foi descrito por Lanciotti *et al.*, (1992), que é baseado em duas etapas de amplificação. A primeira consiste na hibridização de iniciadores ou primers nos genes C e prM do genoma viral. Em seguida, afim de identificar os sorotipos de DENV, utilizam-se primers específicos para cada sorotipo (DENV1-4). Os produtos desta segunda reação são submetidos a um processo de eletroforese, cujos fragmentos de DNA são visualizados mediante a luz ultra-violeta (UV). A posição dos fragmentos das amostras no gel de agarose, identifica o sorotipo viral (Lanciotti *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1991).

Avanços no diagnóstico molecular, permitiram o desenvolvimento RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) fundamentada no uso de corantes e sondas (SYBR green e TaqMan), que é realizado em uma única etapa e é capaz de fornecer dados quantitativos (Holland *et al.*, 1991; Muller *et al.*, 2017). Além da quantificação, as vantagens do qRT-PCR sobre a RT-PCR convencional incluem rapidez, maior

sensibilidade e especificidade (Sekaran et al., 2017). Diversos protocolos para o diagnóstico ou para a quantificação dos DENV já foram descritos (Drosten et al., 2002; Johnson et al., 2005; Kong et al., 2006; Gurukumar et al., 2009; Waggoner et al., 2013; Salles *et al.*, 2018).

1.6. Epidemiologia da dengue

Em um cenário mundial, Bhatt e colaboradores (2013) estimaram em 390 milhões, o número de casos de infecções anuais por dengue, das quais, 96 milhões apresentariam a doença em qualquer grau de gravidade. Além disso, cerca de 3.9 bilhões de pessoas em 128 países se encontram em situação de risco de contrair a infecção (Brady et al. 2012). Contudo, a distribuição dos casos de dengue no mundo (figura 1.4) pode estar subestimada, devido às limitações de comunicação entre a OMS e os órgãos de notificação regionais (WHO, 2018).

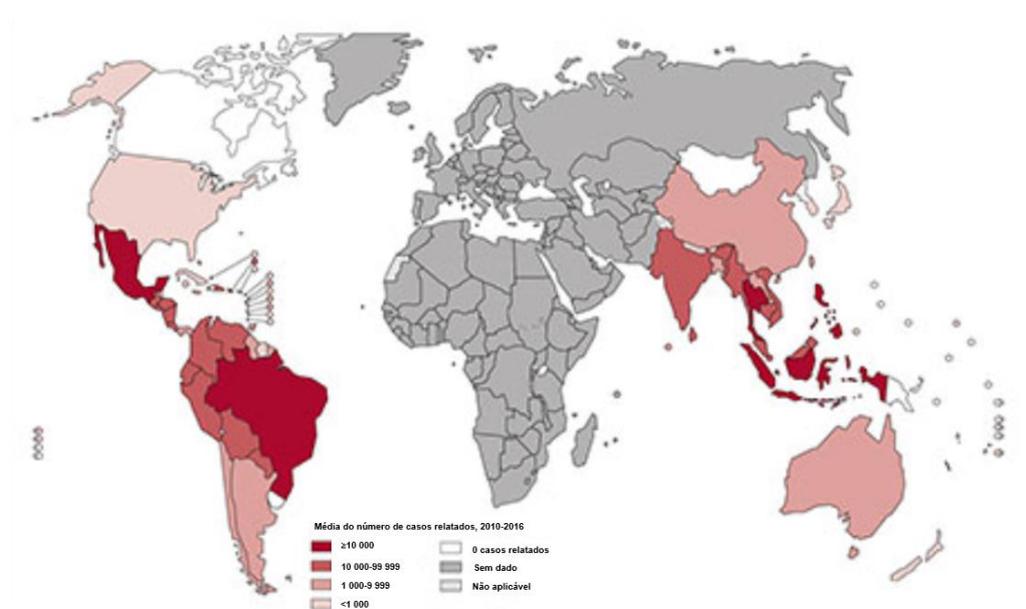


Figura 1.4. Distribuição mundial da média do número de casos de Dengue suspeitos ou confirmados relatados à OMS. (Adaptado de WHO, 2018).

1.6.1 Dengue nas Américas.

Com a descontinuidade das políticas de combate ao vetor da febre amarela urbana (revisado por Costa *et al.*, 2011), o *Ae. aegypti* reinfestou inúmeros países do

continente americano, o que, conseqüentemente, desencadeou várias epidemias na região, a partir da década de 1970 (revisado por Gubler, 2011).

No que concerne à introdução dos DENV nas Américas, sabe-se que em 1953 o DENV-2 foi o primeiro sorotipo identificado na ilha de Trinidad, seguido pelo DENV-3 em 1963 em Porto Rico (Gubler & Trent, 1993). Acredita-se que estes sorotipos tenham sido responsáveis pelas epidemias subsequentes de dengue na região do Caribe e na região Norte da América do Sul até os anos de 1977. No entanto, em 1977 na Jamaica, foi registrada a introdução do DENV-1 no continente americano. Este sorotipo causou ainda epidemias nas ilhas do Caribe, e mais tarde se dispersou pelo norte da América do Sul e pelos países da América Central, causando surtos inclusive nos Estados Unidos (EUA) (Gubler, 1993).

Em 1981 ocorreu a introdução de DENV-4 nas ilhas orientais do Caribe e, posteriormente este sorotipo se dispersou para demais áreas do Caribe, México, América Central e América do Sul (Dick *et al.*, 2012).

A década de 1980 registra importantes problemas de saúde pública causados pelo DENV. Ao mesmo tempo em que ocorria uma introdução de DENV-4 no continente americano, Cuba enfrentava uma grave e inesperada epidemia de FHD causada pelo DENV-2. Estima-se que esta epidemia tenha atingido o número de 344.000 casos e 158 óbitos (Kouri *et al.*, 1983; Gubler, 2006). Além disso, em 1989, a Venezuela registra outra grave epidemia de FHD/SCD, resultando em cerca de 20 mil casos, com a circulação dos DENV-1, 2 e 4 (Malavige *et al.*, 2004).

Em 1990 ocorreram epidemias de dengue em aproximadamente 25 países do continente americano (Pinheiro & Chuit, 1998). Em 1994, o DENV-3 foi reintroduzido na Nicarágua e, em seguida dispersou-se para o Panamá. Nos anos seguintes, o DENV-3 dispersou-se para outros países do continente Americano (Pinheiro e Corber, 1997; Rigau-Perez *et al.*, 2002).

A primeira década do novo milênio também foi marcada por sucessivas epidemias de dengue nas Américas (Dick *et al.*, 2012). Num panorama de 2001 a 2007, a OMS estimou que países do Cone Sul representam 64,6% dos casos registrados, seguido por Países Andinos 19%, países da América Central e México 12,5% e países do Caribe 3,9% (WHO, 2009). No ano de 2009, o México registrou uma epidemia de dengue que atinge cerca de 250.000 pessoas, com circulação dos quatro sorotipos virais (Dick *et al.*, 2012).

Num panorama de 2011-2017, ocorreu um crescimento de 30% no número de notificações de casos de dengue nas Américas, se comparado ao período de 2001-2010. Além disto, o período de 2011-2017 representa um total de 47% no número de casos de dengue notificados nas Américas, considerando o período 1980-2017 (Salles *et al.*, 2018). Até a 52ª semana epidemiológica de 2018, foram registrados um total de 560.586 casos de dengue, com 3.535 casos graves e 336 óbitos no continente americano (PAHO, 2018).

1.6.2 Dengue no Brasil.

O primeiro registro da dengue no Brasil, remonta ao período colonial do ano de 1685 em Recife, Pernambuco (PE), seguido por outra epidemia, sete anos depois em Salvador, Bahia (BA), com cerca de 2000 mortes devido a infecção pelo dengue (Salles *et al.*, *apud* MS, 2018). Relatos de Dengue também ocorreram durante uma epidemia no estado do Rio de Janeiro (RJ) no ano de 1846 (Figueiredo, 2000). Além disso, o histórico brasileiro conta com outras duas importantes epidemias que ocorreram entre 1851-1853 e 1916-1923 (Pinheiro & Nelson, 1997).

O primeiro registro laboratorial de infecção pelo DENV ocorreu em 1981 na cidade de Boa Vista em Roraima (RR), com a detecção dos sorotipos 1 e 4 (Osanai *et al.*, 1983). No entanto, somente após 1986, a dengue tornou-se um problema de saúde pública no Brasil, quando o sorotipo DENV-1 foi isolado na cidade de Nova Iguaçu-RJ (Schatzmayr *et al.*, 1986), após este período foram registradas epidemias nos estados Ceará (CE), Alagoas (AL) e PE (Barreto & Teixeira, 2008).

Na década de 1990, ocorreu a introdução do DENV-2 no RJ, com registros de quadros de dengue clássico (DC) e pela primeira vez casos de FHD (Nogueira *et al.*, 1993). Figueiredo (2000) relata que as cepas de DENV-1 e DENV-2 introduzidas no Brasil, pertenciam as cepas Caribe e Jamaica, respectivamente.

De março de 1986 a junho de 1996, o Brasil registrou cerca de 579.037 casos de dengue. Contudo, uma das mais graves epidemias de dengue no Brasil, foi registrada em 1996 atingindo cerca de 530.578 pessoas. No ano seguinte, o país somou cerca de 208.000 casos de Dengue (Figueiredo, 2000).

O ano de 2000, foi marcado com a introdução de DENV-3. O vírus foi isolado pela primeira vez e foi originário da cidade de Nova Iguaçu (Araújo, 2009). A

partir de então, o DENV-3 dispersou-se com rapidez para outros 24 estados da união, causando em 2002 a maior epidemia registrada na década (SVS/MS, 2010). O DENV-3 foi sorotipo predominante até o primeiro trimestre de 2007. No entanto, este ano foi marcado pela reemergência de DENV-2 com um caráter mais agressivo, ocasionando uma extensa epidemia no ano de 2008, com alto número de casos graves e fatais, com maior acometimento indivíduos menores de 15 anos (Teixeira *et al.*, 2009).

A reemergência do DENV-4 ocorreu no estado de RR (Temporão *et al.*, 2011). O DENV-4 foi isolado em 2011 no RJ, evidenciando a cocirculação dos quatro sorotipos virais no estado (Heringer *et al.*, 2017). No entanto, Ferraz e colaboradores (2013) identificam a presença de quatro amostras de DENV-4 em uma epidemia de dengue em Belo Horizonte/MG.

Nos últimos anos, o Brasil registrou grandes e crescentes epidemias de dengue (figura 1.5), com grande número de registros em 2015 (Salles *et al.*, 2018). No entanto, notou-se uma queda nos números de casos registrados de 2016 em diante, com 1.500.535 casos registrados e 642 mortes. Em 2017, o Brasil registrou uma queda maior no número de casos de dengue, com 252.041 casos registrados e 137 óbitos. Até a 52ª semana epidemiológica de 2018, foram registrados um total de 265.934 casos de dengue, incluindo 321 casos de dengue grave e 155 óbitos no país (SVS/MS, 2019). É importante ressaltar que, o Brasil enfrentou uma tríplice epidemia causada pelo vírus Zika (ZIKV), vírus Chikungunya (CHIKV) e ainda, casos de febre amarela (YF).

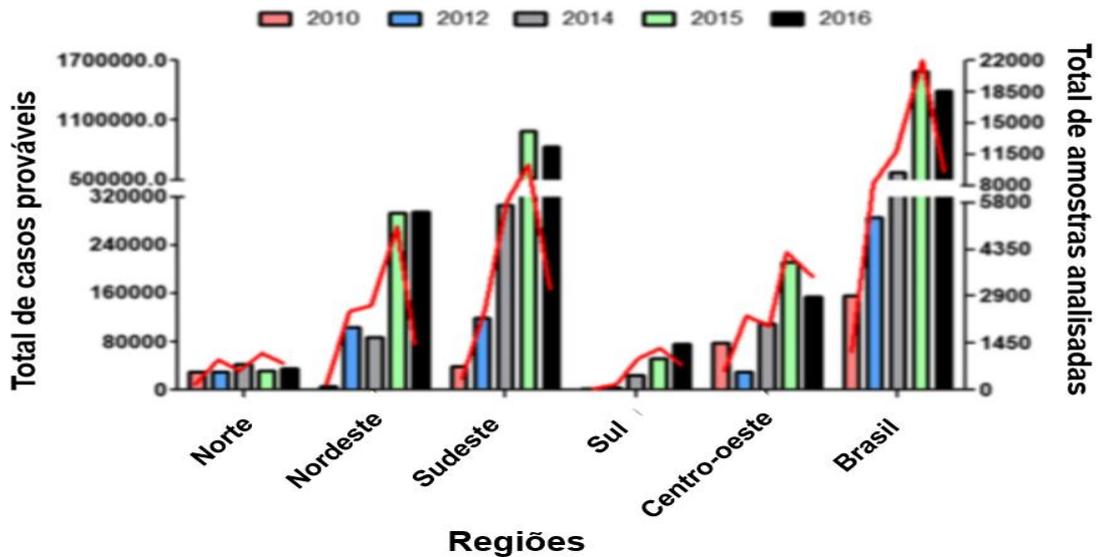


Figura 1.5: Panorama da dengue no Brasil durante os anos de 2010-2016 (adaptado de Salles et al., 2018).

1.6.2.1. Dengue em Pernambuco

A história da dengue em PE começou a ter importância em 1987, com registro de epidemia causada pelo DENV-1. A epidemia foi controlada e no estado e não foram relatados casos autóctones da doença até o ano de 1994 (revisto por Cordeiro, 2008). À partir desse período, PE começou a reportar crescentes números de casos de dengue. Num panorama de 1995 a 2018 (até a 49ª semana epidemiológica de 2018), o estado somou um total de 649.403 casos notificados de dengue; e na região liderou o número de notificações nos anos de 1999, 2000, 2002 e 2015. Adicionalmente, PE registrou as cinco maiores epidemias de sua história, ocorridas em 2015, 2002, 2016, 1998 e 2010, respectivamente (SVS/MS, 2017; SVS/MS, 2019).

Em 2010 e 2011, um total de 34.590 e 22.101 casos de dengue foram notificados, respectivamente (SVS/MS, 2017), resultantes da cocirculação de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em 2010 e, pela primeira vez, dos quatro sorotipos no estado em 2011 (revisto por Silva, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a dengue possui caráter hiperendêmico, tendo as regiões sudeste e nordeste como as regiões que mais notificam casos de dengue no país, respectivamente. O estado de Pernambuco (PE) tem apresentado relevância no número de casos notificados de dengue, registrando grandes epidemias nos anos de 1998, 2002, 2010, 2015 e 2016. Na região nordeste, o estado lidera o ranking com o maior número de casos nos anos de 1999, 2000, 2002 e 2015. Em 2010, o estado apresentou o maior número de casos graves de dengue notificados de sua história. No ano seguinte, quando foi registrado pela primeira vez a cocirculação dos quatro sorotipos virais de dengue, o estado manteve elevado número de casos graves, o terceiro maior de sua história.

Considerando a dengue como uma doença dinâmica, com manifestações variadas e com mecanismos ainda pouco conhecidos, destaca-se a importância da descrição de suas manifestações e do perfil dos pacientes acometidos pela doença. Acredita-se que, o ponto crítico da fisiopatologia da dengue, seja o extravasamento plasmático mediado pela resposta imunológica do hospedeiro, principalmente no que se trata de mediadores inflamatórios solúveis, resultando em derrames, choques e hemorragias graves (Srikiatkachorn & Green 2010).

Considerando-se o atual cenário epidemiológico da dengue no país e na região Nordeste, com um aumento nas notificações de casos graves e fatais, de caráter hiperendêmico e cocirculação dos quatro sorotipos virais, principalmente a partir de 2010 e 2011 no estado de Pernambuco, este projeto visou investigar os aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e imunológicos de casos confirmados durante epidemias ocorridas neste período.

Apesar da dengue ser importante problema de saúde pública no nosso país, existem poucos estudos caracterizando estas epidemias, especialmente no estado de Pernambuco. Métodos de diagnóstico laboratorial específicos para a infecção pelo DENV tais como métodos moleculares para a tipagem dos sorotipos virais circulantes, assim como o sequenciamento do genoma são essenciais às pesquisas em desenvolvimento. Adicionalmente, a caracterização do perfil de quimiocinas e fatores de crescimento dos casos confirmados, poderá contribuir para ao entendimento da imunopatogênese da doença.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar os aspectos clínico-epidemiológicos, laboratoriais, virais e imunológicos de casos de dengue originários das epidemias de 2010 e 2011 no estado de Pernambuco.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Aspectos clínico-epidemiológicos

- Descrever as características demográficas dos casos suspeitos e confirmados;
- Identificar a prevalência das manifestações clínicas apresentadas por casos suspeitos de dengue durante o período estudado e classificar os casos suspeitos e confirmados de acordo com os critérios da OMS (2009).

3.2.2. Aspectos laboratoriais e virais

- Avaliar a contribuição das técnicas de RT-PCR para identificação do sorotipo viral e dos métodos sorológicos (MAC-ELISA, IgG-ELISA e Captura de NS1) para a confirmação dos casos confirmados por critérios clínico-epidemiológicos;
- Identificar o genótipo de DENV circulante pelo sequenciamento parcial do genoma viral.

3.2.3. Aspectos imunológicos

- Avaliar o perfil inflamatório entre os diferentes grupos de pacientes em relação a produção das quimiocinas: CCL2/MCP-1 (chemokine (C-C motif) ligand 2; Monocyte chemoattractant protein-1), CXCL10/IP-10 (C-X-C motif chemokine ligand 10; IFN-gamma-inducible protein 10) e CCL5/RANTES (C-C motif chemokine ligand 5; regulated on activation, 8 normal T cell expressed and secreted).
- Avaliar os fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor – EGF), fator de crescimento dos hepatócitos

(Hepatocyte Growth Factor - HGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet-derived Growth Factor - PDGF).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Os casos analisados neste estudo provêm de um Projeto colaborativo entre o Laboratório Imunologia Viral (LIV) do Instituto Oswaldo Cruz e a Universidade de Pernambuco (UPE - Recife, PE), sendo este previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UPE (CEP/UPE 186/08 - 57221416.0.1001.5248 e 13318113.7.0000.5248). Todos os pacientes envolvidos assinaram um termo de consentimento informado por escrito. Este estudo acessou as informações dos pacientes sobre características demográficas, sinais físicos e sintomas.

4.2 Desenho do estudo e critérios de inclusão e exclusão para a investigação de casos suspeitos de dengue

O presente estudo possui caráter descritivo, observacional e transversal. Os critérios de inclusão abrangem casos de pacientes em qualquer faixa etária e qualquer gênero que experimentaram uma doença febril acompanhada semelhante a febre do dengue (WHO, 2009), provenientes de municípios do estado de Pernambuco (tabela 4.1), atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, que é uma unidade de referência em Recife/PE, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011. Os critérios de exclusão englobam os pacientes que não concordaram em participar do estudo ou com suspeita de outros agravos.

Tabela 4.1: Características geográficas e populacionais dos municípios selecionados para a investigação de casos suspeitos de dengue no estado de Pernambuco, PE, Brasil.

Município	Latitude	Longitude	Extensão (km ²)	População (hab.)
Abreu e Lima	07° 54' 42" S	34° 54' 10" O	126,2	98.201
Afogados da Ingaseira	07° 45' 03" S	37° 38' 20" O	377,7	36.547
Arcoverde	08° 25' 15" S	37° 03' 41" O	353	73.667
Belo Jardim	08° 20' 09" S	36° 25' 26" O	653,6	76.185
Bezerros	08° 14' 00" S	35° 47' 49" O	492,56	60.714
Cabo	08° 17' 13" S	35° 02' 06" O	448,7	95.979
Camaraçibe	08° 01' 19" S	34° 58' 51" O	55,083	144.466

Carpina	07° 51' 03" S	35° 15' 17" O	146	81.054
Caruaru	08° 17' 00" S	35° 58' 34" O	920,611	351.686
Catende	08° 40' 01" S	35° 43' 01" O	206,9	40.857
Chã da Alegria	08° 00' 03" S	35° 12' 46" O	48,453	13.206
Chã grande	08° 14' 18" S	35° 27' 42" O	70,192	21.274
Escada	08° 21' 33" S	35° 13' 25" O	348,8	63.517
Ferreiros	07° 26' 52" S	35° 14' 38" O	74	11.456
Gameleira	08° 35' 02" S	35° 23' 13" O	257,7	29.829
Garanhuns	08° 53' 25" S	36° 29' 34" O	458,6	112.462
Goiana	07° 33' 39" S	35° 00' 10" O	445,8	78.618
Gravatá	08° 12' 04" S	35° 33' 53" O	513,367	83.241
Igarassu	07° 50' 03" S	34° 54' 23" O	305560	112.463
Ilha de Itamaracá	07° 44' 52" S	34° 49' 33" O	67	24.888
Itaíba	08° 56' 51" S	37° 25' 22" O	1.068,29	26.462
Itaquitinga	07° 40' 20" S	35° 05' 58" O	103,4	16.696
Jaboatão	08° 06' 46" S	35° 00' 54" O	256,1	335.371
João Alfredo	07° 51' 21" S	35° 35' 16" O	133,5	33.563
Lagoa do Carro	07° 50' 41" S	35° 19' 11" O	69,87	17.247
Lagoa dos gatos	08° 39' 30" S	35° 54' 00" O	189,22	16.131
Lajedo	08° 39' 49" S	36° 19' 12" O	189	39.240
Machados	07° 41' 09" S	35° 30' 54" O	56,957	15.046
Mirandiba	08° 07' 13" S	38° 43' 46" O	821,676	15.185
Moreno	08° 07' 07" S	35° 05' 32" O	195,603	61.016
Nazaré da Mata	07° 44' 31" S	35° 13' 40" O	150,816	31.951
Olinda	08° 00' 32" S	34° 51' 18" O	41681	370.332
Orobó	07° 44' 42" S	35° 36' 08" O	140,785	167.69
Palmares	08° 40' 58" S	35° 35' 31" O	336,8	62.300
Passira	07° 59' 42" S	35° 34' 51" O	329,755	29.031
Paudalho	07° 53' 48" S	35° 10' 47" O	277,796	54.547
Paulista	07° 56' 27" S	34° 52' 22" O	93,52	300.466
Pesqueira	08° 21' 42" S	36° 41' 41" O	995,5	66.881
Poção	08° 11' 09" S	36° 42' 18" O	199,742	11.265
Pombos	08° 08' 29" S	35° 23' 45" O	207,656	28.841
Quixabá	07° 43' 12" S	37° 50' 52" O	210	6.835
Recife	08° 03' 14" S	34° 52' 51" O	218,435	1.637,83
Ribeirão	08° 30' 11" S	35° 22' 26" O	288	46.877
Salgueiro	08° 04' 27" S	39° 07' 09" O	1,687	60.453
Santa Cruz do Capibaribe	07° 57' 25" S	36° 12' 18" O	335,6	105.761
São Joaquim do Monte	08° 25' 55" S	35° 48' 14" O	242,629	21.215
São José da Coroa Grande	08° 53' 52" S	35° 08' 52" O	69,196	20.005
São José do Belmonte	07° 51' 39" S	38° 45' 36" O	1479,964	33.742
São José do Egito	07° 28' 44" S	37° 16' 28" O	791,901	33.789
São Lourenço da Mata	08° 00' 07" S	35° 01' 04" O	264,3	92.190
Serra Talhada	07° 59' 09" S	38° 17' 45" O	2,965	84.970
Sertania	08° 04' 14" S	37° 15' 57" O	2 421,511	35.367
Surubim	07° 49' 55" S	35° 45' 21" O	252,845	64.520

Tacaratu	09° 06' 21" S	38° 09' 00" O	1265	24.626
Timbaúba	07° 30' 18" S	35° 19' 04" O	289,511	50.956
Toritama	07° 59' 56" S	36° 03' 03" O	30,93	37.631
Triunfo	07° 50' 16" S	38° 06' 07" O	191,516	15.221
Verdejante	07° 55' 32" S	38° 58' 18" O	476,034	9.430
Vitoria De Santo Antão	08° 07' 35" S	35° 18' 27" O	368	111.541
Xexeu	08° 48' 08" S	35° 37' 37" O	110,803	14.549

4.3 Coleta, armazenamento e classificação das amostras

Um total de 403 fichas de acompanhamento (anexo 9.1.) contendo dados referentes à coleta, observações clínicas e dados laboratoriais dos pacientes do Hospital Universitário Oswaldo Cruz foram recebidas no Laboratório de Imunologia Viral (LIV). Destas, 191 amostras de soro e plasma foram recebidas junto às suas respectivas fichas e armazenadas em freezers -70°C. As informações contidas nas fichas epidemiológicas dos pacientes foram armazenadas em Banco de Dados no software Microsoft Excel (Microsoft, Washington, EUA).

As amostras foram classificadas como sendo de fase aguda (≤ 7 dias após o início dos sintomas) e de fase convalescente (> 7 dias após o início dos sintomas). Clinicamente, os casos foram classificados como dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG), de acordo com a OMS (2009).

4.4 Análise estatística

As informações contidas nas fichas epidemiológicas dos pacientes foram armazenadas em Banco de Dados no software Microsoft Excel (Microsoft, Washington, EUA). As análises estatísticas foram realizadas no Programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), o teste de Fisher para as variáveis qualitativas e o teste não paramétrico Mann-whitney para os diferentes grupos.

4.5 Diagnóstico laboratorial

4.5.1 Teste de captura de antígeno NS1 e dissociação térmica e ácida

O kit ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag (BioRad Laboratories, Califórnia, EUA) foi utilizado no diagnóstico laboratorial das amostras agudas (≤ 7 dias após o início dos sintomas). Este kit possui sensibilidade de 88,9% (DENV-1), 87,1% (DENV-2), 100% (DENV-3) e 93,3% (DENV-4), de acordo com o registro do fabricante. Amostras que inicialmente apresentaram resultado negativo para a captura de NS1 foram submetidas ao pré-tratamento para dissociação térmica de imunocomplexos de acordo com o protocolo estabelecido por Lima e cols. (2014), que consiste em 50 μ l do soro adicionados à 100 μ l de água RNase (Free UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Invitrogen™, California, EUA), seguido de fervura por 5 min. Adicionalmente, foi realizada a técnica de dissociação ácida de acordo com o protocolo estabelecido por Koraka e cols. (2003), que consiste na incubação de 50 μ l de soro mais 50 μ l de glicina/ácido hidroclicórico (1,5M, pH 2.8) à 37°C por 1 hora, seguido de interrupção da reação com a adição de 50 μ l de Tris/ácido hidroclicórico (1,5M/pH 9.7).

4.5.2 Determinação dos anticorpos anti-DENV classe IgM

A captura de anticorpos anti-DENV classe IgM foi realizada em amostras contendo 1-14 dias de doença através do kit Panbio Dengue IgM capture ELISA (Alere™, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Este kit apresenta sensibilidade de 94,7% (infecção primária), 55,7% (infecção secundária).

4.5.3 Determinação dos anticorpos anti-DENV classe IgG

A captura de anticorpos anti-DENV classe IgG foi realizada em amostras contendo 1-14 dias de doença através do kit Panbio Dengue IgG Indirect Elisa (Alere™, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

Este kit apresenta sensibilidade de 97.9% (infecção secundária), 33.3% (infecção primária).

4.5.4 Caracterização da resposta imune humoral (Primária e secundária)

Para a caracterização da resposta imune, foi utilizado o método recomendado por WHO (2009), que consiste na divisão das taxas de absorvância (DO) dos testes de IgM pela DO do IgG. Desta forma, é definido como caso primário se o resultado da divisão for maior que 1.2 (para soro diluído 1/100) ou maior que 1.4 (soro diluído para 1/20), e secundário caso o valor seja abaixo de 1.2 (para soro diluído 1/100) e 1.4 (soro diluído para 1/20).

4.5.5 Extração de RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 140µl do soro através do PureLink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen™, California, EUA) e o QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, EUA), de acordo com os protocolos descritos pelos fabricantes.

4.5.6 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

A detecção e tipagem dos vírus dengue (sorotipos 1-4) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lanciotti e cols. (1992), que utiliza um procedimento *semi-nested* para gerar *amplicons* com tamanhos específicos (em pb) para cada sorotipo dos DENV. A primeira etapa consiste na amplificação de uma região do gene da proteína C e prM através dos *primers* D1 e D2. A segunda etapa consiste na adição de primers específicos (Ts1, Ts2, Ts3 e Ts4) para amplificação das regiões dos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente, Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a sorotipagem dos DENV, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e cols. (1992).

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

A reação de RT-PCR consiste em duas etapas, Tabela 4.3. Na primeira etapa, é adicionado 5µL de RNA viral juntamente com 10µL de mix de reagentes em tubo tipo eppendorf, para transcrição em cDNA no GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) através dos seguintes parâmetros de termociclagem: 1 ciclo de 1 hora a 42°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento do *primer* (55°C por 1 minuto) e extensão da fita (72°C por 2 minutos). A reação é finalizada com uma etapa de extensão final (72°C por 10 minutos). Na segunda etapa de tipagem dos sorotipos de DENV, 5µL de produtos oriundos da primeira reação foram diluídos (1/50) e então, juntamente com 20µL submetidos aos seguintes parâmetros de termociclagem: 20 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento do *primer* (55°C por 1 minuto), extensão da fita (72°C por 2 minutos) e uma extensão final (72°C por 10 minutos).

Tabela 4.3: Reagentes utilizados na RT-PCR para detecção e tipagem dos vírus dengue, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e cols. (1992).

Reagentes	Concentração de Estoque	Concentração Final	µL/tubo
<i>PRIMEIRA REAÇÃO</i>			
PCR Master Mix - Promega	2x	0,83x	6,25
PRIMER D1	10 µM	0,22 µM	0,325
PRIMER D2	10 µM	0,22 µM	0,325
SS IV-RT	2.5U/ µL	0,08/ µL	0,5
DTT	100µM	4,17 µM	0,625
DdH2O	-	-	2,225
Volume Final= 10 µL			
<i>SEGUNDA REAÇÃO</i>			
PCR Master Mix - Promega	2X	1,0x	12,5
PRIMER D1	10 µM	0,26 µM	0,65
PRIMER TS1-4	20 µM	1,0 µM	1,25
DdH2O	-	-	1,85
Volume Final= 20 µL			

Os produtos obtidos na segunda etapa de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%) acrescido de brometo de etídeo (4µl). Após 45 minutos de corrida, os fragmentos de DNA foram visualizados através de luz ultravioleta com o auxílio de pesos moleculares (50pb e 100pb) e da orientação dos controles de DENV 1-4.

4.5.7 Isolamento Viral

Amostras representativas de soro na fase aguda foram selecionadas para inoculação em células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 de acordo com o protocolo descrito por Igarashi (1978).

As células utilizadas para este experimento foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 2,0 ml de meio L-15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). Após a formação da monocamada, o meio foi substituído por igual volume de L-15 contendo 2% de SFB. Os soros dos pacientes foram diluídos na proporção 1/10 em meio L-15 e posteriormente foram inoculados em alíquotas de 0,1ml da monocamada de C6/36. Para cada grupo de amostras, foram incluídos controles de

vírus (C+) e de células (C-). Após a inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período de 10-14 dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss, Deutschland, Alemanha), com aumento de até 400 vezes. Após o período de 14 dias, os isolados foram submetidos à extração de RNA viral e confirmação do sorotipo de dengue pelo RT-PCR descrito anteriormente (Lanciotti et al., 1992).

4.5.8 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento dos DENV

Amostras de soro representativas foram selecionadas para sequenciamento parcial do genoma (gene E) do DENV-1 através da metodologia descrita por Miagostovich e cols. (2006). Foram utilizados 4 pares de iniciadores para a amplificação de fragmentos sobrepostos de aproximadamente 900 pb (com ~200pb de sobreposição entre regiões) de acordo com de Bruycker *et al.*, (2018).

O RNA extraído foi transcrito em cDNA e amplificado através da RT-PCR para sequenciamento utilizando o kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em um tubo tipo eppendorf de 0,2mL foi acrescentado 45µL da mistura de reagentes (Tabela 4.4) e 5µL do RNA extraído. A transcrição reversa do RNA e a amplificação do cDNA foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, California, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: 35 ciclos de desnaturação (de 94°C por 1 minuto), anelamento (de 63°C por 2 minutos), extensão (de 63°C por 4 minutos) e temperatura final (4°C até retirada do termociclador) (modificado de Miagostovich *et al.*, 2006).

Tabela 4.4: Reagentes utilizados na RT-PCR para sequenciamento de cepas representativas de DENV-1, de acordo com o protocolo modificado de Miagostovich e cols. (2006).

Reagente	Concentração de estoque	Concentração final	µL/tubo
Access Quick™ RT-PCR	2X	1,0	25
<i>Primer (sense)</i>	10µM	0,50	2,5
<i>Primer (anti-sense)</i>	10µM	0,50	2,5
AMV-RT	5U	0,10	1
ddH ₂ O	-	-	14
Volume final= 50µL			

4.5.9 Sequenciamento, genotipagem e análise filogenética dos DENV

Os fragmentos de cDNA previamente amplificados e purificados foram sequenciados em ambas as direções utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems®, California, EUA) de acordo com o protocolo adaptado de Miagostovich e cols. (2006). Após a reação do sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o Centri-Sep Spin Columns DyeEx 2.0 Spin Kit Procedure (Qiagen, Inc., California, EUA) e armazenados a 37°C por 24h para secagem. Posteriormente, o DNA purificado foi ressuspensão em 10µL de Formamida e transferido para uma placa de 96 orifícios (MicroAmpOptical 96 Well Reaction Plate - Applied Biosystems®, California, EUA). A placa foi enviada para a Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde os produtos passaram por eletroforese capilar em Analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, California, EUA).

Os produtos sequenciados foram analisados através do programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A identidade da sequência foi determinada pelo uso do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e o alinhamento das sequências pelo software CLUSTAL ÔMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Por fim, a árvore filogenética foi construída com suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) utilizando o Programa MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net/>), método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei 93+G (0.31), determinados de acordo com o resultado obtido pela ferramenta de escolha do melhor modelo de substituição baseado na Máxima

Verossimilhança (MV). As referências para a elaboração do data set foram selecionadas a partir do GenBank.

4.5.10 Quantificação de quimiocinas por ELISA.

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos a partir do soro dos pacientes, utilizando kits Pepro Tech (Nova Jersey, EUA), de acordo com os protocolos descritos pelo fabricante. Estes ensaios tinham como objetivo a dosagem dos fatores solúveis CCL2/MCP-1 (Cat. 900T31; Lot:0514T031), CXCL10/IP-10 (Cat. 900-T39; Lot: 0515T039) e CCL5/RANTES (Cat. 900-K33; Lot:0109033).

Foram adicionados 100µL do respectivo anticorpo de captura por poço em placas de 96 poços. As concentrações finais dos anticorpos de captura foram de 0,25µg/mL (CCL2/MCP-1), 0,5µg/mL (CXCL10/IP-10) e 0,5µg/mL (CCL5/RANTES) diluídos em PBS pH 7,2. As placas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente e após o período de incubação, foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem (0,05% de Tween-20 em PBS pH 7,2). Posteriormente, foram adicionados 200µL por poço da solução de bloqueio (1% de BSA em PBS pH 7,4), seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram novamente lavadas 4 vezes com solução de lavagem e foram adicionados 100µL dos respectivos padrões e amostras de soro dos pacientes, seguido de nova incubação *overnight* à 4°C. Os padrões foram diluídos em série conforme estabelecido pelo fornecedor. No dia seguinte, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem e foi adicionado 100µL do anticorpo de detecção na concentração de 0,25µg/mL (CCL2/MCP-1), 0,5µg/mL (CXCL10/IP-10) e 0,5µg/mL (CCL5/RANTES), diluídos em reagente diluente (0,05% de Tween-20, 0,1% de BSA em PBS pH 7,4), seguido de incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem, seguido de adição de 100µL da Streptavidin-HRP e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 4 vezes com solução de lavagem, seguido de adição de 100µL do substrato ABTS. As placas foram protegidas da luz e monitoradas entre 5 a 30 minutos para posterior interrupção da reação pela adição de 50µL/poço de Stop Solution. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405/650nm.

4.5.11. Quantificação dos fatores de crescimento por ELISA

A dosagem dos fatores de crescimento PDGF (Cat. 900-MO4; Lot: 0912004-M) e EGF (Cat. 900-MO5; Lot. 0814005-M) foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (PEPROTECH) a partir do soro dos pacientes, de acordo com os protocolos descritos pelos fabricantes.

Foi adicionado 100µL do respectivo anticorpo de captura em placas de 96 poços. As concentrações finais dos anticorpos foram de 1.0 µL/ml (PDGF) e 0.25µL/ml (EGF). As placas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente e posteriormente lavadas 4 vezes utilizando 300µL da solução de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS pH 7.4). Em seguida, foi adicionada a solução de bloqueio (1% de BSA em PBS pH 7.4), seguido de incubação à temperatura ambiente por no mínimo 1 hora e posterior lavagem por 4 vezes, adição de 100µL dos respectivos padrões e amostras de soros dos pacientes, seguido de nova incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Os padrões foram diluídos de forma seriada de 1000pg/ml a 0. Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de lavagem, foram adicionados 100µL de anticorpo de detecção, seguido de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas por 4 vezes com solução de lavagem, seguido de adição de 100µL de ABTS. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405/650nm.

A dosagem do fator de crescimento HGF (Cat. BGK14210) foi também realizada através de ensaio imunoenzimático (BIOGEMS) a partir do soro dos pacientes, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Foram adicionados 100µL do padrão e amostras em cada poço de uma placa de 96 poços previamente sensibilizada, seguido de incubação à 37°C por 90 minutos. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi descartado e foi adicionado 100µL do anticorpo anti-HGF, seguido de nova incubação à 37°C por 1 hora. Após este período, a placa foi lavada por 3 vezes com 300µL de solução de lavagem e foi adicionado 100µL de Avidin-Biotin-Peroxidase, seguido de incubação à 37°C por 30 minutos. Após a incubação, a placa foi novamente lavada por 5 vezes e foi adicionado 90µL de reagente desenvolvedor de cor, seguido de incubação à 37°C por 30 minutos. Por fim, foi adicionado 100µL de solução STOP em cada poço e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos aspectos clínicos-epidemiológicos de casos de dengue ocorridos nas epidemias de 2010 e 2011 no estado de Pernambuco.

Neste estudo, inicialmente, foram analisados os dados das fichas epidemiológicas de casos suspeitos de dengue (n=403), ocorridos no estado de Pernambuco nos anos de 2010 (n=309) e 2011 (n=94).

Para o diagnóstico laboratorial e outras análises, o presente estudo analisou 191 amostras de soro, referentes aos anos de 2010 (n=158) e 2011 (n=33) e, todas as amostras foram submetidas à pelo menos um método de diagnóstico laboratorial, considerando o número de dias de sintomas para tal.

O gráfico de distribuição temporal (figura 5.1) desta casuística, apontou que, em 2010 (n=309), o aumento nas notificações de dengue ocorreu no mês de fevereiro, com uma maior ocorrência em junho (n=89) e com ausência de registros nos meses de novembro e dezembro. Em 2011 (n=94), um aumento de casos registrados ocorreu em abril, com uma maior ocorrência no mês de julho (n=24).

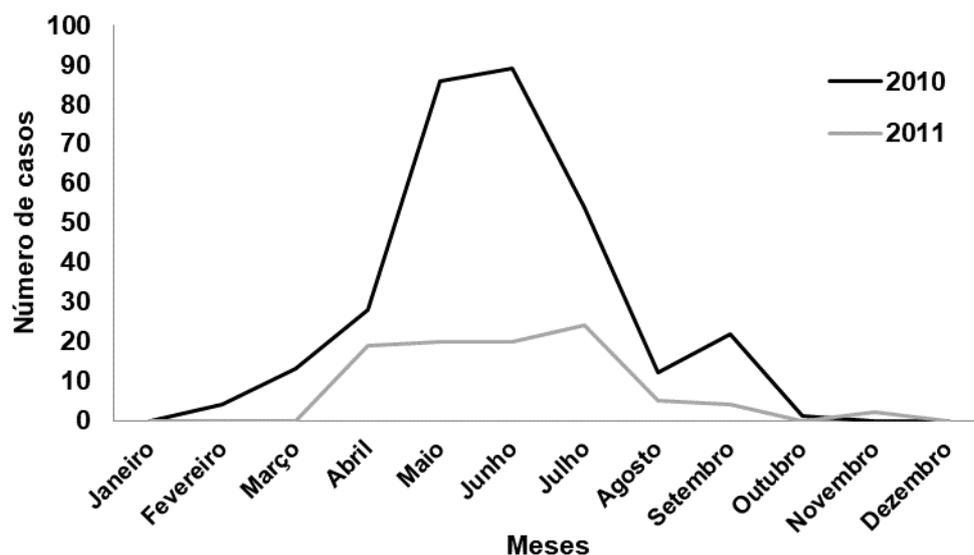


Figura 5.1: Distribuição temporal dos casos suspeitos de dengue no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

O município de Recife apresentou uma maior frequência de casos suspeitos em ambos os anos (147/403, 36,48%). No entanto, em 2010 o município de Recife, foi seguido pelos municípios de Jaboatão, Olinda, Camaragibe, Paulista e Cabo. Em

2011, observamos um novo perfil, onde Olinda, Paulista, Igarassu, Jaboatão e Carpina apresentam uma maior frequência de casos suspeitos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Distribuição dos municípios com maior número de casos suspeitos de dengue no ano de 2010 (n=309) e 2011 (n=94), no estado de Pernambuco.

2010		2011	
Município	n=309	Município	n= 94
Recife	123	Recife	24
Jaboatão	40	Olinda	14
Olinda	33	Paulista	7
Camaragibe	18	Igarassu	6
Paulista	17	Jaboatão	6
Cabo	9	Carpina	4
Quixabá	4	Abreu e Lima	3
São Lourenço da Mata	3	Camaragibe	3
Arcoverde	2	Goiana	3
Belo Jardim	2	Arcoverde	2
Gameleira	2	Catende	2
Garanhuns	2	Não declaradas	2
Goiana	2	Palmares	2
Tacaratu	2	Vitoria De Santo Antão	2
Joao Alfredo	2	Afogados da Ingaseira	1
Ribeirão	2	Bom Jardim	1
Salgueiro	2	Chã da Alegria	1
Santa Cruz do Capibaribe	2	Ferreiros	1
Serra Talhada	2	Garanhuns	1
Toritama	2	Itaquitinga	1

*Em 2010 a cidade de Venturosa apresentou 2 casos. Já as cidades de Abreu e Lima, Afogados da Ingaseira, Araçoiaba, Auricuri, Bezerros, Caruaru, Chã Grande, Escada, Gravatá, Igarassu, Itaíba, Ilha de Itamaracá, Lagoa do Carro, Lagoa dos Gatos, Lajedo, Mirandiba, Moreno, Não declaradas, Nazaré da Mata, Orobó, Pau d'alho, Poção, Pombos, São Joaquim do Monte, São José Da Coroa Grande, São José do Belmonte, São José do Egito, Sertania, Surubim, Timbaúba e Triunfo apresentaram 1 caso cada; Em 2011 as cidades de Ilha de Itamaracá, Toritama, Machados, Passira, Pesqueira, Verdejante e Xexéu apresentaram 1 caso cada.

Independente do ano analisado, pacientes do sexo feminino foram mais acometidas por dengue do que os do sexo masculino (216/403, 53,60%) (figura 5.2).

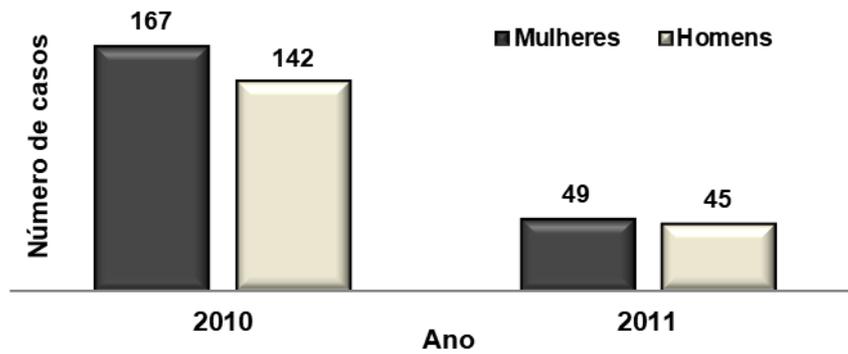


Figura 5.2: Número de casos suspeitos de dengue por gênero, no período de 2010 a 2011, no estado de Pernambuco (n=403).

Nesta casuística, a faixa etária mais acometida foi a de crianças entre 6 a 10 anos de idade (23,33%, 94/403) e 11 a 15 anos (18,36%,74/403) e, jovens adultos, adultos e idosos (7,69% ,29/403) foram menos acometidos (figura 5.3). Num panorama de 0-15, 16-60 e ≥ 61 anos, o grupo 0-15 representou 54,34% (219/403) dos acometidos por dengue.

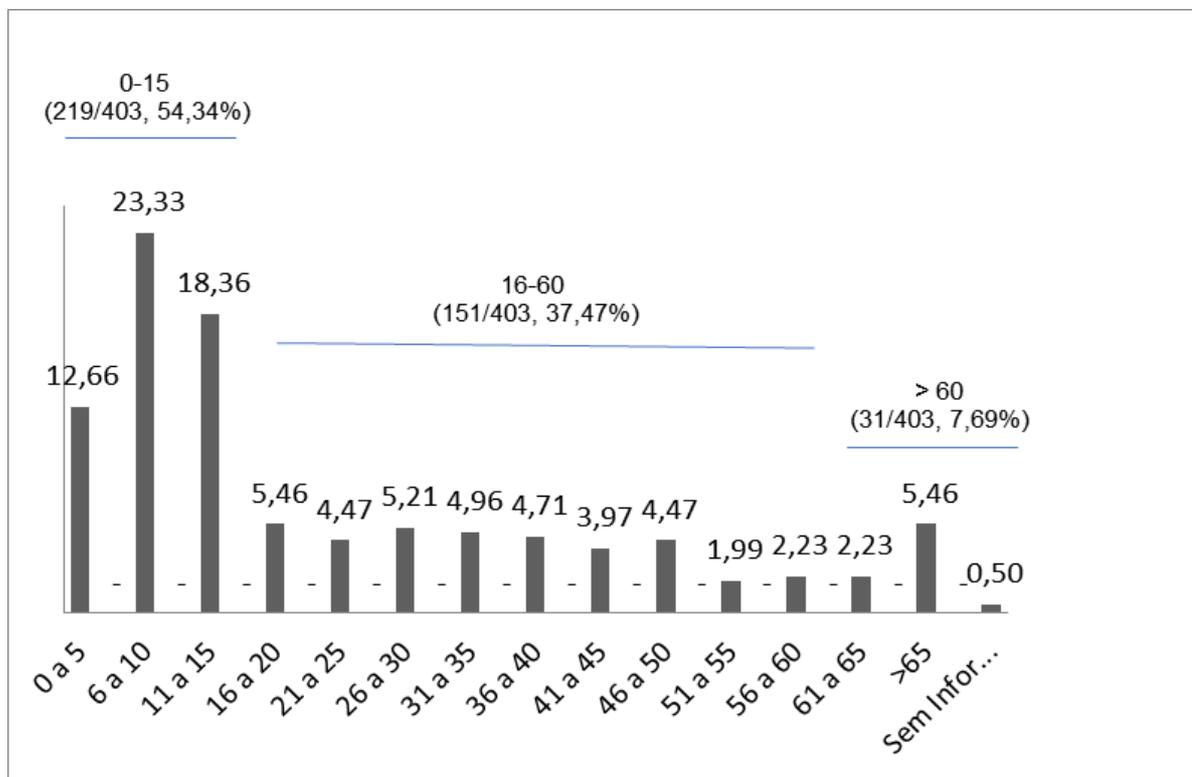


Figura 5.3: Distribuição de casos suspeitos de dengue por faixa etária no período de 2010 a 2011, no estado de Pernambuco (n=403).

A febre foi o sinal clínico mais reportado pelos pacientes (99,26%, 400/403), seguida de sintomas como cefaleia (57,57%, 232/403), náuseas e vômitos (54,84%, 221/403), mialgia (50,37%, 203/403), prurido (28,54%, 115/403), astenia (24,83%, 98/403), diarreia (13,15%, 53/403), dor retro-orbitária (12,90%, 52/403), artralgia (7,20%, 29/403), tosse/tosse seca (3,47%, 14/403) e anorexia (1,24%, 5/403) (figura 5.4). Destaca-se que, a dor abdominal, também considerada um importante sinal de alarme, foi o sintoma mais frequente nos pacientes (66%, 266/403) através do exame físico.

O exantema foi o segundo sinal mais frequente nos pacientes (38,71%, 156/403), figura 5.4. Nesta casuística, foram descritos variados tipos de exantemas tais como rash difuso, rash petequial/eritematoso, rash eritematoso difuso, rash eritematoso, rash eritematoso disseminado, rash cutâneo, rash morbiliforme, rash papular e macular, rash disseminado importante, rash macular eritematoso, rash difuso muito intenso, rash maculopapular, exantema pruriginoso, exantema morbiliforme disseminado e rash cutâneo difuso.

O derrame pleural (12,41%, 50/403) foi o sinal mais frequente de acúmulo de fluido, ocorrendo de forma bilateral (20%, 10/50) e unilateral direito (32%, 16/50). Além disto, o derrame cavitário (9,43%, 38/403) e ascite (5,21%, 21/403) foram achados identificados nos pacientes. Adicionalmente a isto, o desconforto respiratório (0,99%, 4/403) foi observado em um paciente com derrame cavitário e ascite e dois pacientes com derrame pleural.

Nesta casuística, também foi possível identificar alterações na diurese dos pacientes, como oligúria (0,2%, 1/403) e disúria (0,2%, 1/403). Além disto, alterações de consciência também foram identificadas, como tontura (9,7%, 39/403) e síncope (0,5%, 2/403). Por fim, observou-se choque em dois pacientes (0,50%, 2/403), com uma evolução para óbito de paciente idosa com concomitante infecção do trato urinário e sepse.

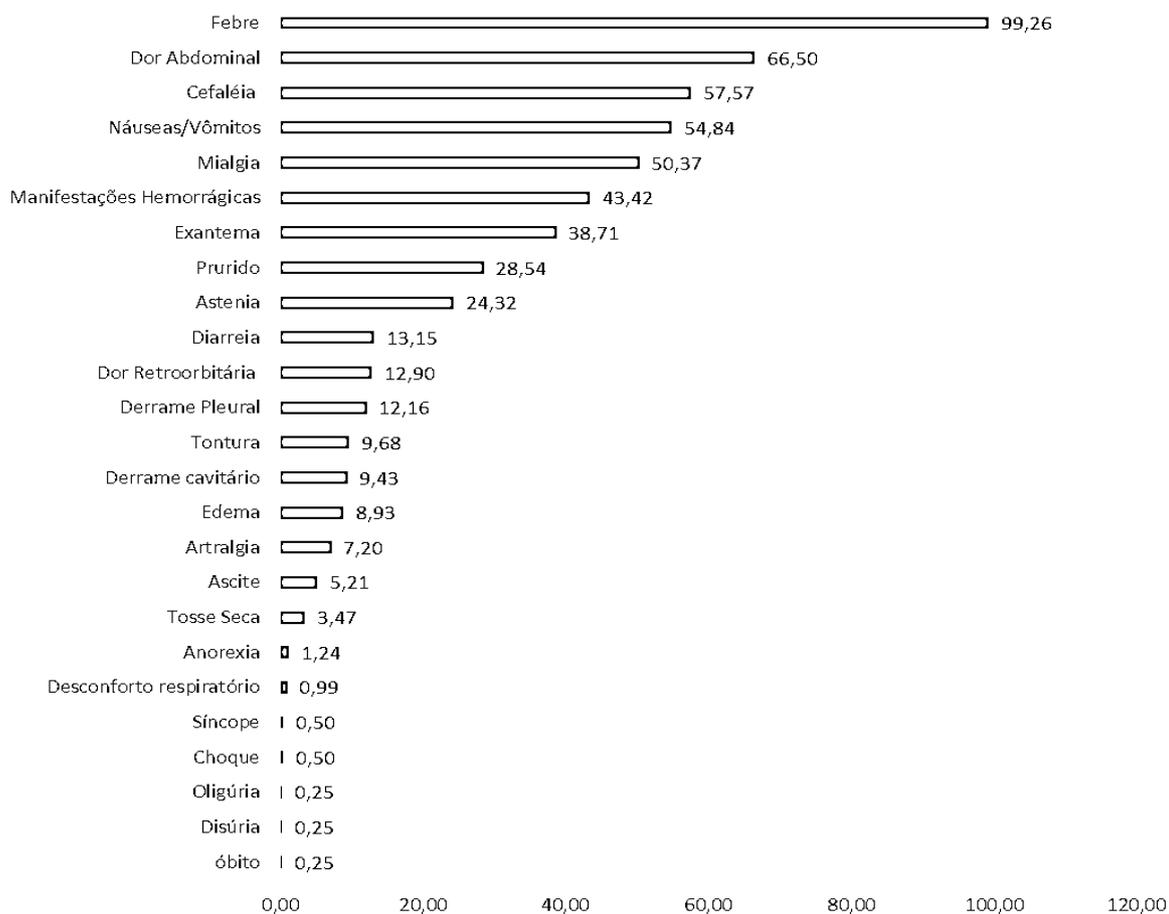


Figura 5.4: Frequência das manifestações clínicas dos casos suspeitos de dengue (n=403) ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Manifestações hemorrágicas ocorreram em 43,42% dos pacientes (175/403), sendo as petéquias o sinal mais frequente (35,48%, 141/403), seguido de sangramento nasal (14,14%, 57/403), gengivorragia (13,65%, 55/403), prova do laço positiva (11,17%, 45/403), hematêmase (8,44%, 34/403), metrorragia (6,70%, 27/403), melena (5,71%, 23/403), equimoses (1,99%, 8/403), hematúria (1,99%, 8/403) e hemoptise (0,99%, 4/403) (figura 5.5).

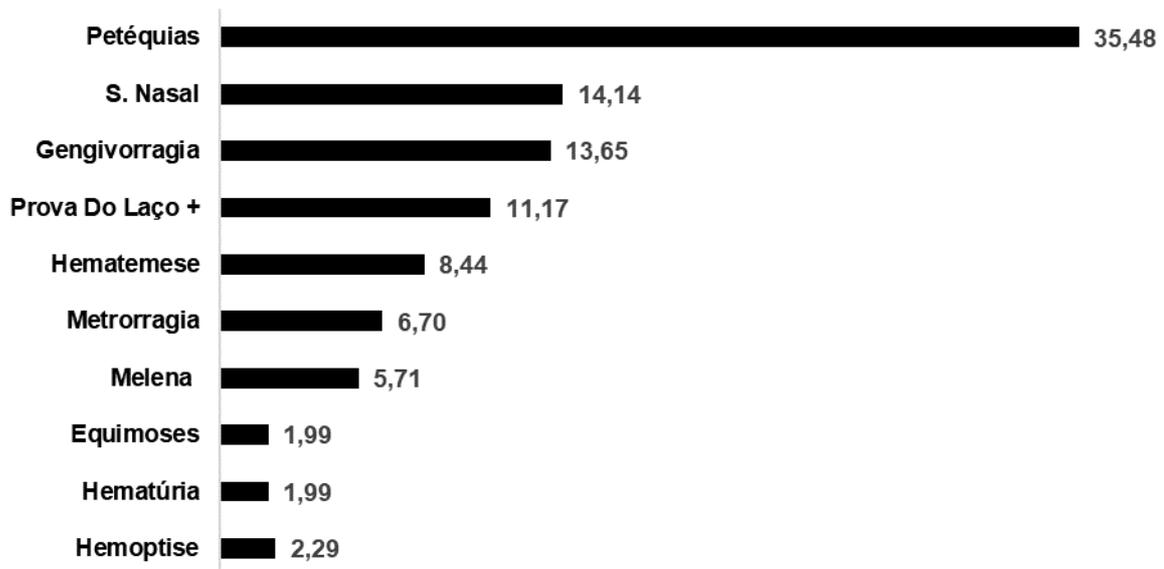


Figura 5.5: Frequência das manifestações hemorrágicas (n=175/403) dos casos suspeitos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Edema foi descrito em 8,93% (36/403) dos pacientes. Este foi classificado em edema de parede abdominal (3,23%, 13/403), edema periorbital (2,23%, 9/403), edema de membros inferiores e/ou superiores (1,49%, 6/403), edema de face (0,99%, 4/403), edema generalizado (0,50%, 2/403), edema não especificado (0,50%, 2/403) e edema de bolsa escrotal (0,25%, 1/403) (figura 5.6).

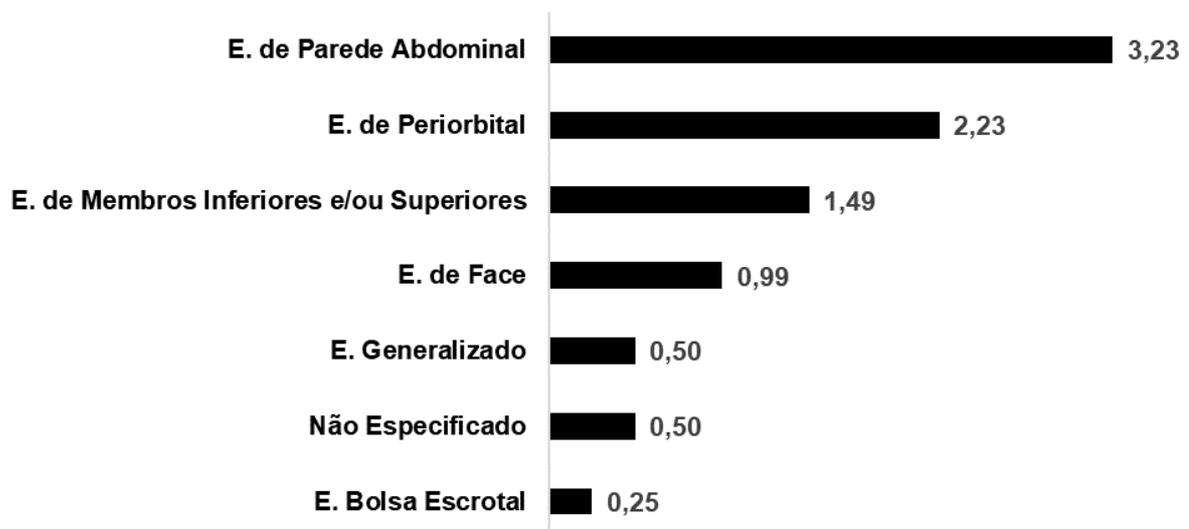


Figura 5.6: Frequência de edemas (n=36/406) dos casos suspeitos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Nesta casuística, 10% dos pacientes (42/403) possuíam condições pré-existentes. Estas comorbidades estão distribuídas entre hipertensão arterial sistêmica (7,94%, 32/403), diabetes mellitus (2,98%, 12/403), cardiopatia (0,99%, 4/403), asma (0,74%, 3/403), gravidez (0,74%, 3/403) com tempo de gestação de 8,19 e 26 semanas, alergia (0,50%, 2/403), obesidade (0,25%, 1/403), doença de chagas (0,25%, 1/403), HIV+ (0,25%, 1/403) e úlcera péptica (0,25%, 1/403) (figura 5.7).

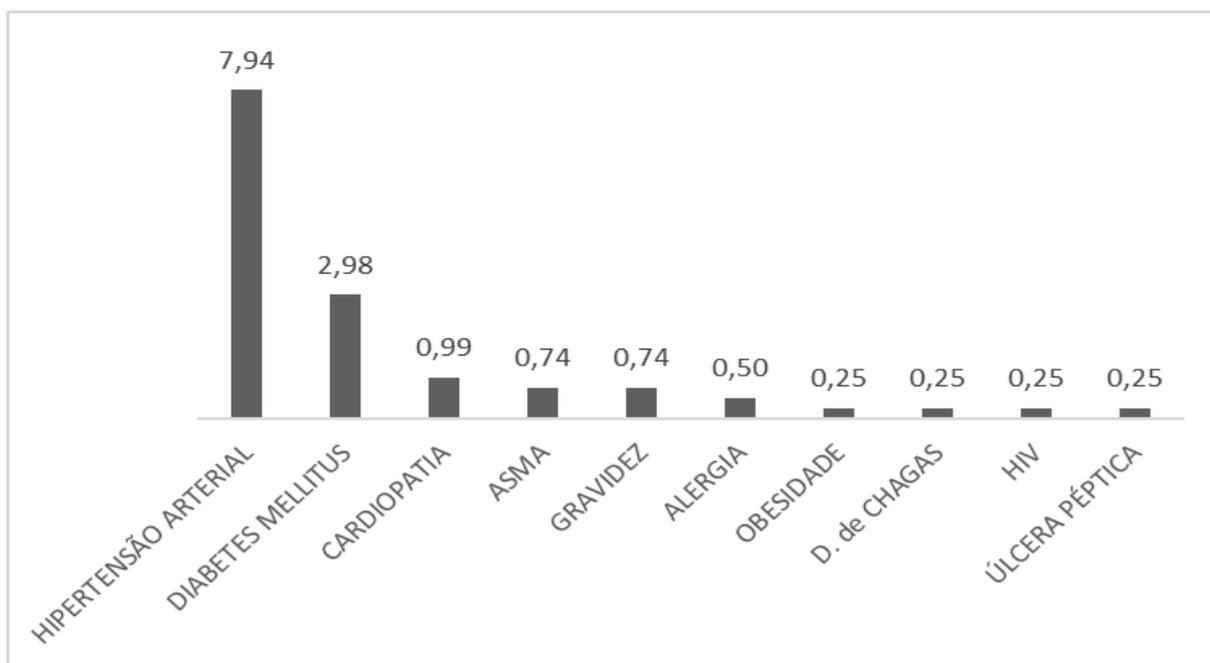


Figura 5.7: Comorbidades (42/403) descritas nos casos suspeitos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011.

Considerando os critérios de classificação de caso recomendado pela OMS (WHO, 2009), 19% (78/403) dos casos foram caracterizados como DSSA, cuja média de admissão hospitalar foi de 5,09 dias após o início dos sintomas e média de idade de 31,09 anos. Em 80% (321/403) dos casos, a classificação foi de DCSA (80%, 322/403), cuja média de admissão hospitalar de 4,09 dias e média de idade de 21,09 anos. Casos de DG ocorreram em 1% (4/403) da casuística (tabela 5.2).

Tabela 5.2: Características demográficas dos casos suspeitos de dengue (n=403) ocorridos em Pernambuco entre 2010 e 2011 e classificados de acordo com a OMS (2009).

Dados demográficos	Classificação de casos (OMS, 2009)		
	DSSA	DCSA	DG
Mulheres	38	176	2
Homens	40	146	2
Total	78	321	4
Admissão hospitalar (média de dias após início dos sintomas)	5,09	4,09	5,5
Média de idade	31,9	21,09	29
Menor Idade	5M	6M	9
Maior Idade	88	78	70

DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave; M: meses.

Informações dos resultados de exames laboratoriais (hemograma) foram analisadas em 201 casos suspeitos (figura 5.8). Observamos que 91% (183/201) dos pacientes apresentaram trombocitopenia (contagens $\leq 150.000 \text{ mm}^3$). Cinquenta e cinco por cento (55%, 112/201) dos casos suspeitos apresentaram contagens inferiores a 50.000 mm^3 . Conforme demonstrado na figura 5.8, pacientes DCSA/DG apresentaram contagens significativamente mais baixas de plaquetas quando comparados aos pacientes DSSA: plaquetas [DSSA 49 (62,9-107) n=43 vs. DCSA 46 (52,9-72,3) n=158, p=0,034] ;

Em relação aos leucócitos, casos suspeitos e classificados como DCSA/DG apresentaram contagens significativamente mais altas de leucócitos quando comparados com grupo DSSA: leucócitos [DSSA 4160 (3679-5164) n=43 vs. DCSA 4830 (4957-6004) n=158, p=0,046]. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores do hematócrito: HT [DSSA 38,3 (36,4-41,9) n=43 vs. DCSA 39 (38,1-45,5) n=158, p=0,665].

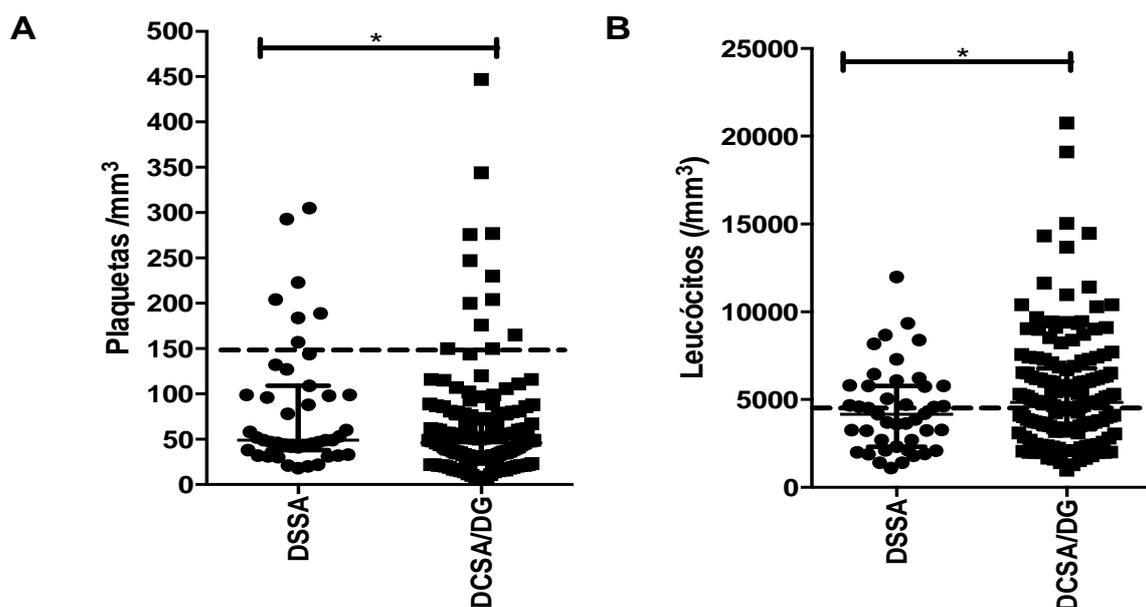


Figura 5.8: Parâmetros Hematológicos de casos suspeitos de infecção pelo DENV em Pernambuco, anos 2010/2011. A) Contagem das Plaquetas. B) Contagem dos leucócitos. Linhas verticais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25-75%). Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, * representa $p < 0,05$. DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave. Valores de referência de plaquetas: 150.000 μ L a 400.000 μ L; Leucócitos: 4.000 a 11.000/ μ L

Cento e noventa e uma amostras séricas foram submetidas ao diagnóstico laboratorial. O diagnóstico de infecção pelo DENV foi confirmado pela positividade de pelo menos um dos seguintes métodos: Isolamento viral, Detecção do antígeno viral NS1, Detecção do RNA viral por RT-PCR, e presença de anticorpos anti-DENV da classe IgM.

Os casos com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV foram classificados e agrupados: 27 pacientes (19,4%; 27/139) foram classificados como DSSA, 112 (80,6%; 112/139) foram classificados como DCSA. Ao analisarmos o gênero, observamos que 40,7% dos pacientes com DSSA pertenciam ao sexo masculino (11/27) e 59,3% ao sexo feminino (16/27). Em relação aos casos confirmados classificados como DCSA, observamos que 61,6% pertenciam ao sexo feminino (69/112), enquanto que o sexo masculino obteve 38,4% (43/112).

Tabela 5.3: Dados demográficos dos casos confirmados de infecção pelo DENV segundo classificação clínica, PE, 2010-2011.

	DSSA n=27 (19,4%)	DCSA n=112 (80,6%)	Total n=139
Idade (média)			
	35	22,4	24
Sexo			
Feminino	16/27 (59,3%)	69/112 (61,6%)	85/139 (61,2%)
Masculino	11/27 (40,7%)	43/112 (38,4%)	54/139 (38,8%)
Comorbidades			
Hipertensão Arterial	5/12 (41,7%)	7/12 (58,3%)	12/139 (8,6%)
Diabetes	1/3 (33,3%)	2/3 (66,7%)	3/139 (2,2%)
Outras	3/6 50%	3/6 (50%)	6/139 (4,3%)

DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave

Tendo em vista a classificação clínica de pacientes suspeitos e confirmados, observa-se um predomínio de casos de pacientes DCSA nesta casuística (figura 5.9). Em suma, pacientes DCSA apresentaram frequência de 79,6% (321/403) dos casos suspeitos, enquanto que para casos confirmados a frequência de DCSA foi de 80,6% (112/139).

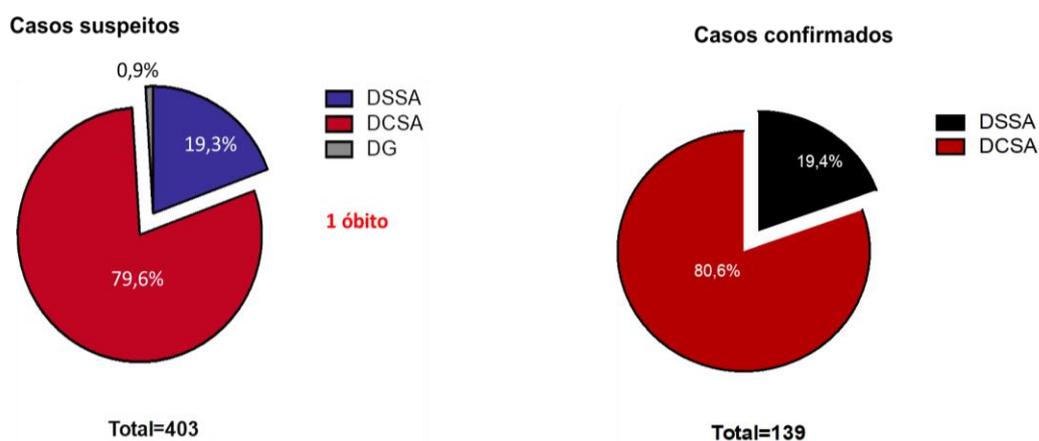


Figura 5.9: Frequência da classificação clínica de casos suspeitos e confirmados de dengue.

5.2. Avaliação dos métodos sorológicos e moleculares para a confirmação dos casos confirmados por critérios clínico-epidemiológicos:

Através de testes sorológicos, a detecção de anticorpos IgM anti-DENV por MAC-ELISA foi possível em 94,31% (116/142) dos casos, enquanto que a detecção de IgG anti-DENV foi possível em 91,35% (95/104) dos casos e a detecção do antígeno NS1 foi possível em 16,20% (23/142) das amostras testadas. Para o diagnóstico molecular, a técnica de RT-PCR foi possível em 14,60% (20/137) dos casos, enquanto o isolamento viral foi possível em 4% (1/25) das amostras testadas (tabela 5.4).

Tabela 5.4: Distribuição dos casos confirmados conforme metodologia utilizada na investigação laboratorial dos casos de dengue (n=191), inicialmente confirmados por critérios clínico-epidemiológicos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.

Metodologia	DSSA	DCSA	Total
	Positivo/Testado (%)	Positivo/Testado (%)	Positivo/Testado (%)
MAC ELISA	23/25 (92,0)	93/98 (94,90)	116/123 (94,31)
IgG ELISA	8/12 (66,67)	87/92 (94,57)	95/104 (91,35)
NS1 ELISA	4/22 (18,18)	19/120 (15,83)	23/142 (16,20)
RT-PCR	3/23 (13,04)	17/114 (14,91)	20/137 (14,60)
ISOLAMENTO VIRAL	0/6 (0)	1/19 (5,26)	1/25 (4,0)

Amostras de 1 a 14 dias de doença foram testadas por MAC-ELISA. Os anticorpos IgM anti-DENV tiveram um percentual de detecção de 0% (0/1) no primeiro dia de doença, 75% (3/4) no segundo dia de doença, 100% (8/8) no terceiro dia de doença, 92,31% (24/26) no quarto dia de doença, 100% (41/41) no quinto dia de doença, 100% (14/14) no sexto dia de doença, 83,33% (15/18) no sétimo dia de doença, 100% (5/5) no oitavo dia de doença, 100% (3/3) no nono dia de doença, 100% (1/1) no décimo dia de doença e 100% (1/1) no décimo quarto dia de doença (figura 5.9).

Amostras de 1 a 14 dias de doença foram testadas por IgG-ELISA. A detecção dos anticorpos IgG anti-DENV por IgG-ELISA foi possível em 91,35% (95/104) dos casos (tabela 5.4). Conforme se observa na figura 5.9, os anticorpos IgG tiveram um percentual de detecção de 66,67% (2/3) no primeiro dia de doença,

66,67% (2/3) no segundo dia de doença, 100% (8/8) no terceiro dia de doença, 84,65% (11/13) no quarto dia de doença, 97,22% (35/36) no quinto dia de doença, 87,50% (14/16) no sexto dia de doença, 93,75% (15/16) no sétimo dia de doença, 100% (4/4) no oitavo dia de doença, 50% (1/2) no nono dia de doença, 100% (1/1) no décimo dia de doença e 100% (1/1) no décimo quarto dia de doença (figura 5.10).

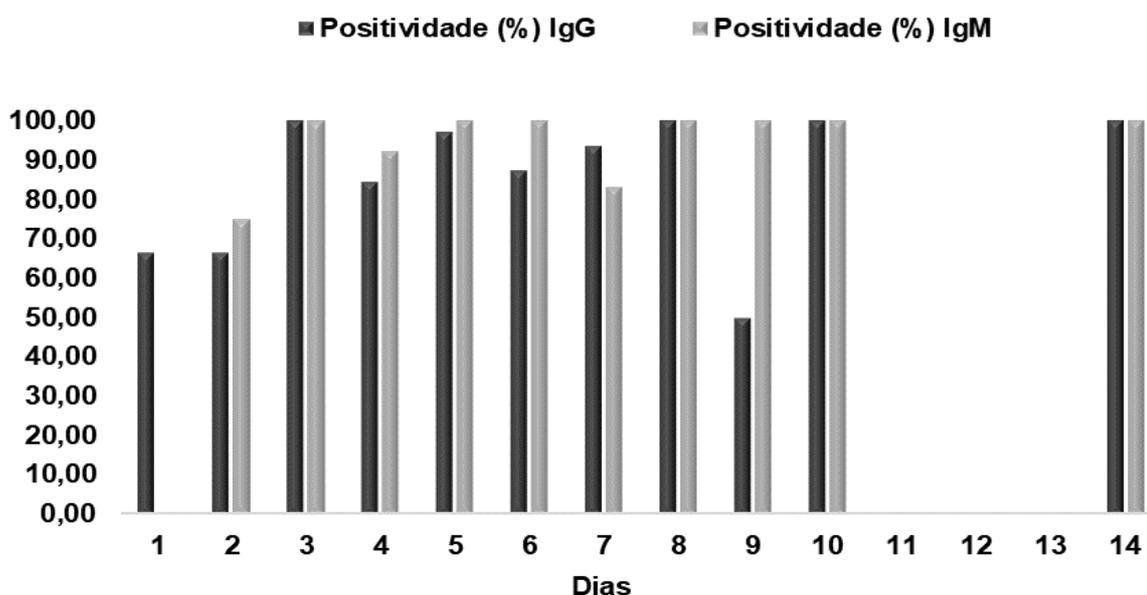


Figura 5.10: Frequência de positividade de detecção de anticorpos IgG e IgM anti-DENV dos casos de dengue, por dia de doença, inicialmente confirmados por critérios clínico-epidemiológicos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.

Para a caracterização da resposta imune, foram analisadas 54 casos positivos para IgM e IgG anti-DENV, determinando se as infecções eram primárias ou secundárias (tabela 5.5). Como resultado, identificou-se que o maior percentual das infecções foi do tipo secundária (90,74%, 49/54), com média de idade de 28,03 anos, predomínio do sexo feminino, e maior percentual de ocorrência em casos de DCSA (93,88%).

Tabela 5.5: Caracterização da resposta imune dos casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.

DADOS DEMOGRÁFICOS	TIPO DE INFECÇÃO (%)	
	Primária (n=5)	Secundária (n=49)
MÉDIA DE IDADE (ANOS)	8,98	28,03
FEMININO	60.0	75,51
MASCULINO	40.0	24,49
CLASSIFICAÇÃO DO CASO		
DSSA	20.0%	6,12%
DCSA	80.0%	93,88%
DG	0%	0%

DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave

A detecção do antígeno NS1 foi possível em um total de 16,20% (23/142) das amostras testadas. No entanto, os ensaios sorológicos foram executados de duas maneiras: a primeira consistiu em seguir as orientações do fabricante, que confirmou 12,68% (18/142) dos casos testados; e a segunda consistiu em proceder à dissociação de imunocomplexos de forma térmica e ácida, nas amostras negativas para NS1, resultando em positividade de 5,56% (4/72) e de 1,61% (1/62), respectivamente (tabela 5.6).

Tabela 5.6: Detecção de antígeno NS1 em casos negativos, após as dissociações térmica e ácida de imunocomplexos.

TIPO DE DISSOCIAÇÃO	RESULTADO		
	Positivo/Testado (%)	Negativo/Testado	Inconclusivo/Testado
DISSOCIAÇÃO TÉRMICA	4/72 (5,56)	66/72	2/72
DISSOCIAÇÃO ÁCIDA	1/62 (1,61)	56/62	5/62

Cento e trinta e sete amostras (n=137) foram testadas para RT-PCR, com média de 4,2 dias de doença. Os resultados permitiram a identificação de 20 pacientes positivos (14,60%, 20/137). No ano de 2010, os quatro sorotipos foram detectados, com prevalência de DENV-1 (52,94%, 9/17) que cocirculou com DENV-2 (23,53%, 4/17), DENV-3 (5,88%, 1/17) e DENV-4 (5,88%, 1/17). Na casuística deste estudo, dois casos de coinfeções DENV-1/2 (11,76%, 2/17) foram identificados, figura 5.9. No ano de 2011, foram identificados os sorotipos DENV-1 (33,33%, 1/3), DENV-3 (33,33%, 1/3) e uma coinfeção DENV-1/3 (33,33%, 1/3) (tabela 5.7).

Tabela 5.7: Identificação do sorotipo infectante de DENV pelo método de RT-PCR (n=20/137) em casos de dengue ocorridos no estado de Pernambuco, 2010- 2011.

ANO/SOROTIPO	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Coinfeção	Total
	Positivo/Testado (%)					
2010	9/17 (52,94)	4/17 (23,53)	1/17 (5,88)	1/17 (5,88)	2 (DENV-1/2)	17
2011	1/1 (33,33)	0	1/1 (33,33)	0	1 (DENV-1/3)	3

Visando confirmar as coinfeções identificadas, as amostras foram submetidas a uma segunda reação de RT-PCR, desta vez, com os primers tipo-específicos utilizados separadamente. Foram consideradas amostras coinfectadas aquelas amplificadas pelo mix de primers para os quatro sorotipos e com os primers separadamente (figura 5.11).

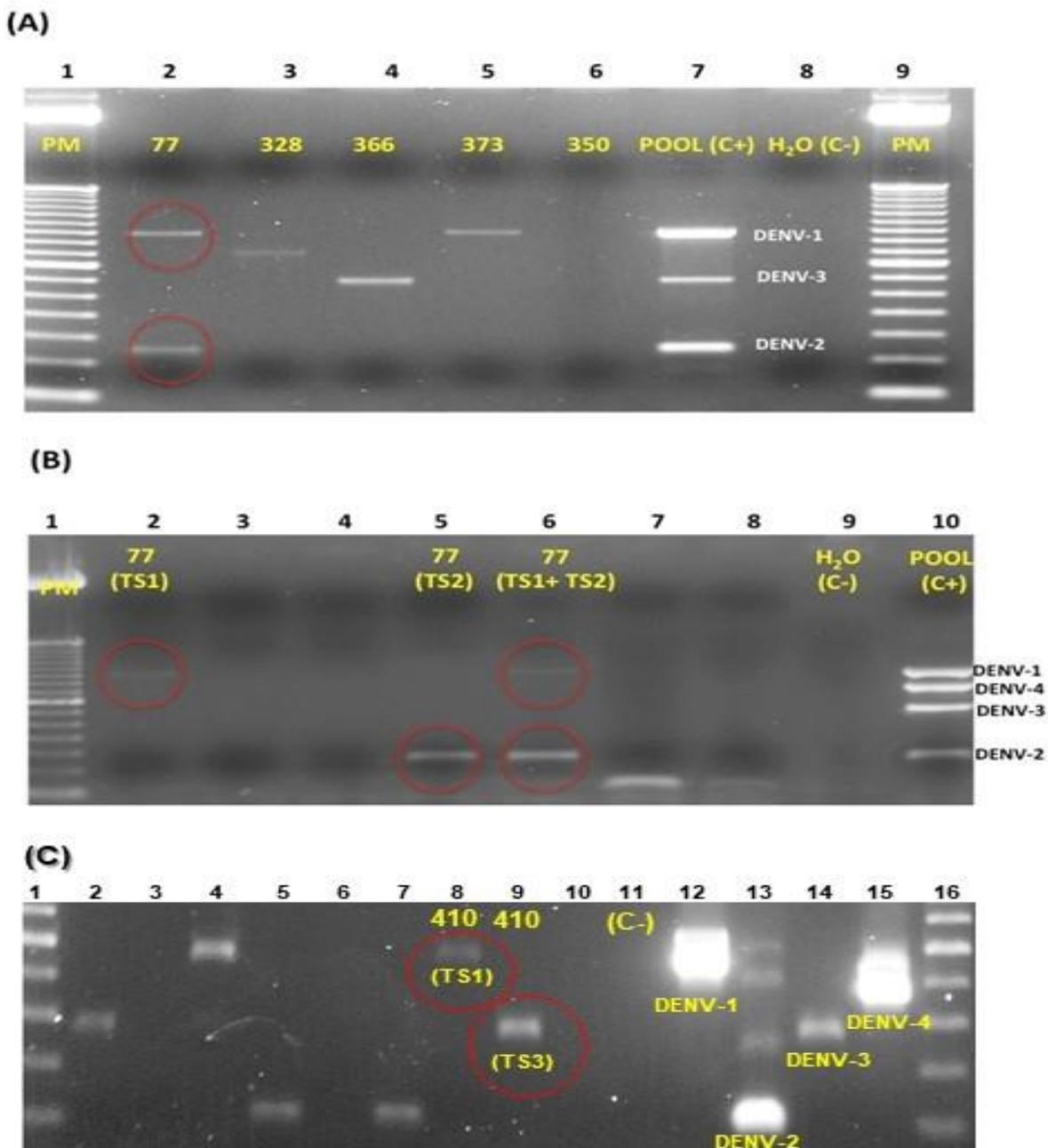


Figura 5.11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) para identificação do sorotipo infectante em casos suspeitos de dengue ocorridos em Pernambuco, 2010-2011. (A) Linha 1: PM: peso molecular 50 pb, linha 2: amostra 77 (DENV-1/DENV-2), linha 3: amostra 328 (DENV -4), linha 4: amostra 366 (DENV-3), linha 5: amostra 373 (DENV-1), linha 6: amostra 350 (negativa), linha 7: pool de controles positivos para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, linha 8: controle negativo (H₂O), linha 9: peso molecular 50 pb. (B) Linha 1: PM: peso molecular 50 pb, linha 2: amostra 77 amplificada com primer para DENV-1 (TS1), linha 5: amostra 77 amplificada com primer para DENV-2 (TS2), linha 6: amostra 77 amplificada com mix de primers (TS1+TS2) simultaneamente, linha 8: controle negativo (H₂O), linha 9: pool de controles positivos para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. (C): linha 1: peso molecular 100 pb, linha 2: amostra 151 (DENV-3), linha 3: amostra 151 (negativa), linha 4: amostra 160 (DENV-1), linha 5: amostra (DENV2), linha 6: amostra 221 (negativa), linha 7: amostra 221 (DENV-2), linha 8: amostra 410 (DENV-1), linha 9: amostra 410 (DENV-3), linha 10: amostra 410 (negativa), linha 11: controle negativo (H₂O), linha 12: C+ (DENV-1), linha 13: C+ (DENV-2), linha 14: C+ (DENV-3), linha 15: C+ (DENV-4), linha 16: peso molecular 100 pb.

Na tentativa de isolamento viral, 13,09% (25/191) das amostras foram inoculadas e a média de dias de doença foi de 4,36 dias. Após inoculação em cultura de células C6/36, nenhuma amostra apresentou efeito citopático (ECP), sugestivo de replicação viral. Porém, quando submetidas a extração de RNA viral e RT-PCR, uma amostra mostrou-se positiva para DENV-1 (figura: 5.12). A amostra positiva (DENV-1) trata-se de amostra de junho de 2010 de paciente do sexo feminino, com 4 anos de idade, com sinais e sintomas clássicos de dengue, também apresentando positividade para as técnicas de detecção de IgM e antígeno NS1.

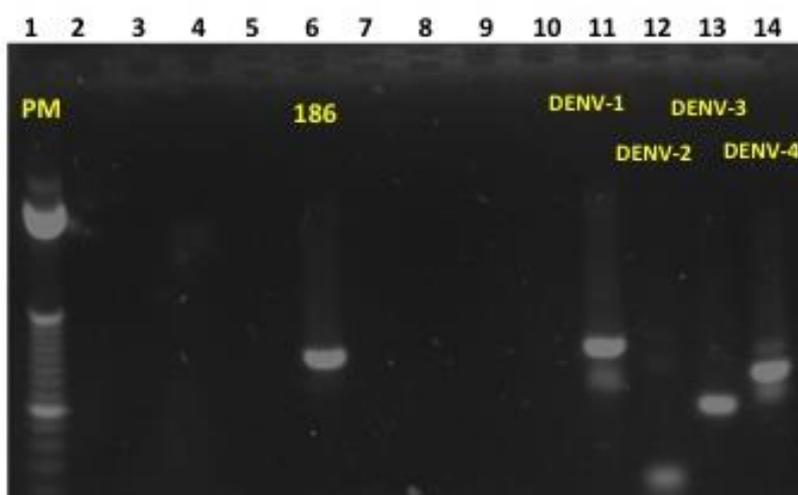


Figura 5.12: Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti et al., 1992) para identificação do sorotipo infectante em amostras com isolamento viral negativo. Linha 1: PM: peso molecular 100 pb, linhas 2 a 5: amostras negativas, linha 6: amostra 186, positiva para DENV-1 e negativa no isolamento viral, linhas 7 a 9: amostras negativas, linha 10: controle negativo (H₂O), linhas 11 a 14: controles positivos para DENV-1 a 4, respectivamente.

5.3. Identificação do genótipo de DENV circulante em Pernambuco, 2010-2011

No presente estudo, amostras positivas por RT-PCR e representativas dos DENV-2, DENV-3 e DENV-4 não puderam ser sequenciadas e, conseqüentemente, genotipadas, devido às quantidades insuficientes de DNA geradas. Visando aumentar a concentração viral, amostras representativas de todos os sorotipos (n=25) foram submetidas ao isolamento viral, conforme previamente descrito. No entanto, apenas um isolado, representante do DENV-1, cepa 186/BR/PE (figura 5.13) foi isolado (sem ECP) e parcialmente sequenciado.

A análise filogenética baseada nas sequências da região codificante do gene E, demonstrou que a cepa 186/BR/PE de DENV-1, pertence ao genótipo V (América/África), e encontra-se inserida no clado da linhagem 1b (figura 5.13).

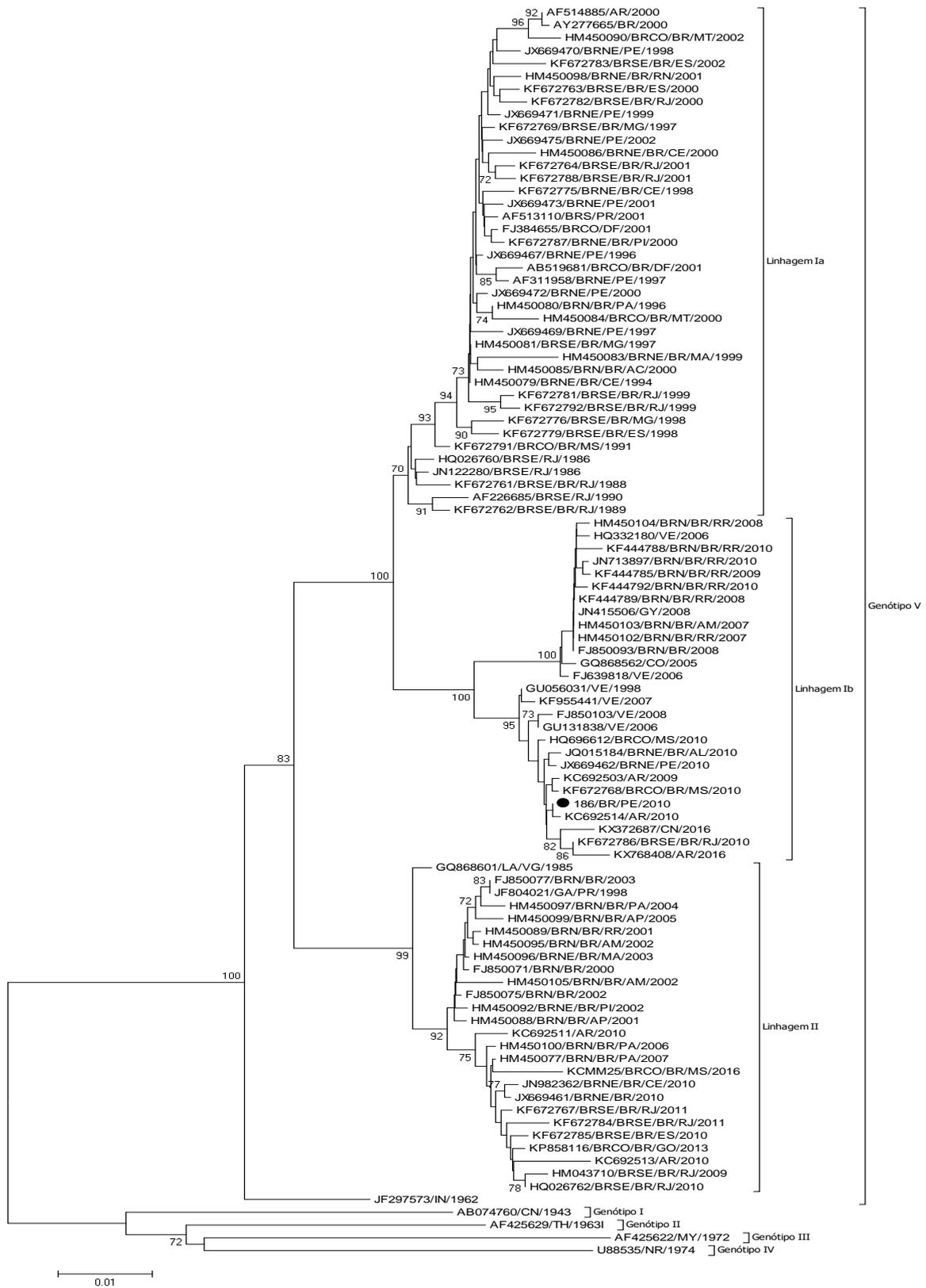


Figura 5.13: Árvore filogenética baseada no gene do envelope do DENV-1 proveniente de Pernambuco no ano de 2010. Método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei 93+G (0.31), suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. A sequência do estudo está marcada com círculo preto. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

5.4. Análise dos parâmetros hematológicos nos casos confirmados de infecção pelo DENV

Em relação aos parâmetros hematológicos nos casos confirmados de infecção pelo DENV (n=139) (figura 5.14), observamos que 94% (132/139) dos pacientes apresentaram trombocitopenia ($\leq 150.000 \text{ mm}^3$). Cinquenta e oito por cento dos casos confirmados (82/132) apresentaram contagens inferiores a 50.000 mm^3 . Conforme demonstrado na figura 5.13, não observamos diferença estatisticamente significativa nos grupos de pacientes infectados pelo DENV apresentando DSSA e/ou DCSA/DG: plaquetas [DSSA 57 (36-120) n=23 vs. DCSA 37,5 (33-47) n=116, $p=0,1062$];

Observamos que 35,9% (50/139) dos pacientes apresentavam contagens de leucócitos abaixo dos valores normais de referência, no entanto, não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes infectados pelo DENV: leucócitos [DSSA 4530 (3490-5780) n=23 vs. DCSA 4355 (4060-4950) n=116, $p=0,930$]; Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos valores do hematócrito: HT [DSSA 39,8 (38-42) n=23 vs. DCSA 38,1 (37,7-40,1) n=116, $p=0,1864$].

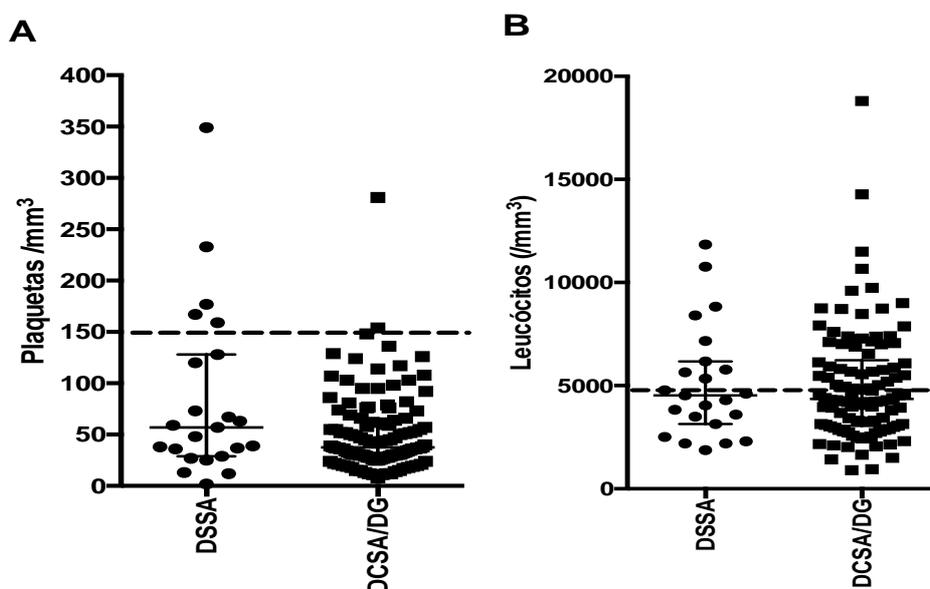


Figura 5.14: Parâmetros Hematológicos de casos confirmados de infecção pelo DENV em Pernambuco, anos 2010/2011. A) Contagem das Plaquetas. B) Contagem dos leucócitos. Linhas verticais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25-75%). Na análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, * representa $p < 0,05$. DSSA: Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave. Valores de referência de plaquetas: $150.000 \mu\text{L}$ a $400.000 \mu\text{L}$; Leucócitos: 4.000 a $11.000/\mu$

5.5. Análise dos mediadores inflamatórios (quimiocinas) em casos confirmados de infecção pelo DENV

O aumento significativo de mediadores inflamatórios é associado com casos graves de dengue, fenômeno conhecido como tempestade de citocinas (*citokine storm*). Desta forma, um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar as concentrações séricas de quimiocinas (MCP-1/CCL2, IP-10/CXL10 e RANTES/CCL5) nos casos confirmados de infecção pelo DENV. Para isto, utilizamos 3 grupos: doadores saudáveis, pacientes infectados pelo DENV com DSSA e pacientes infectados pelo DENV com DCSA/DG.

MCP-1 /CCL2

De acordo com a figura 5.15, observamos maiores dosagens de MCP-1/CCL2 nos pacientes infectados pelo DENV apresentando DSSA e DCSA/DG em comparação com grupo controle: [controles 60.94 (40.78-109.8) n=9, DSSA 112.3 (96.19-152.0) n=25, DCSA/DG 125.3 (114.4-146.8) n=46] (figura 5.15).

IP-10/CXL10

Em relação a quimiocina IP-10/CXL10, podemos observar dosagens significativamente mais altas em ambos grupos de pacientes (DSSA ou DCSA/DG) quando comparados aos controles: [controles 29.68 (21.79-49.47) n=9, DSSA 308.1 (227.6-329.7) n=25, DCSA 281.8 (257.6-332.9) n=46] (figura 5.15).

RANTES/ CCL5

Em relação à quimiocina RANTES/CCL5, os resultados demonstraram que ambos grupos de pacientes infectados pelo DENV (DSSA ou DCSA/DG) apresentaram menores níveis circulantes de RANTES/CCL5 quando comparados com o grupo controle: [controles 3510 (2725-4022) n=10, DSSA 1966 (1755-2654) n=28, DCSA 2205 (1869-2624) n=37] (figura 5.15).

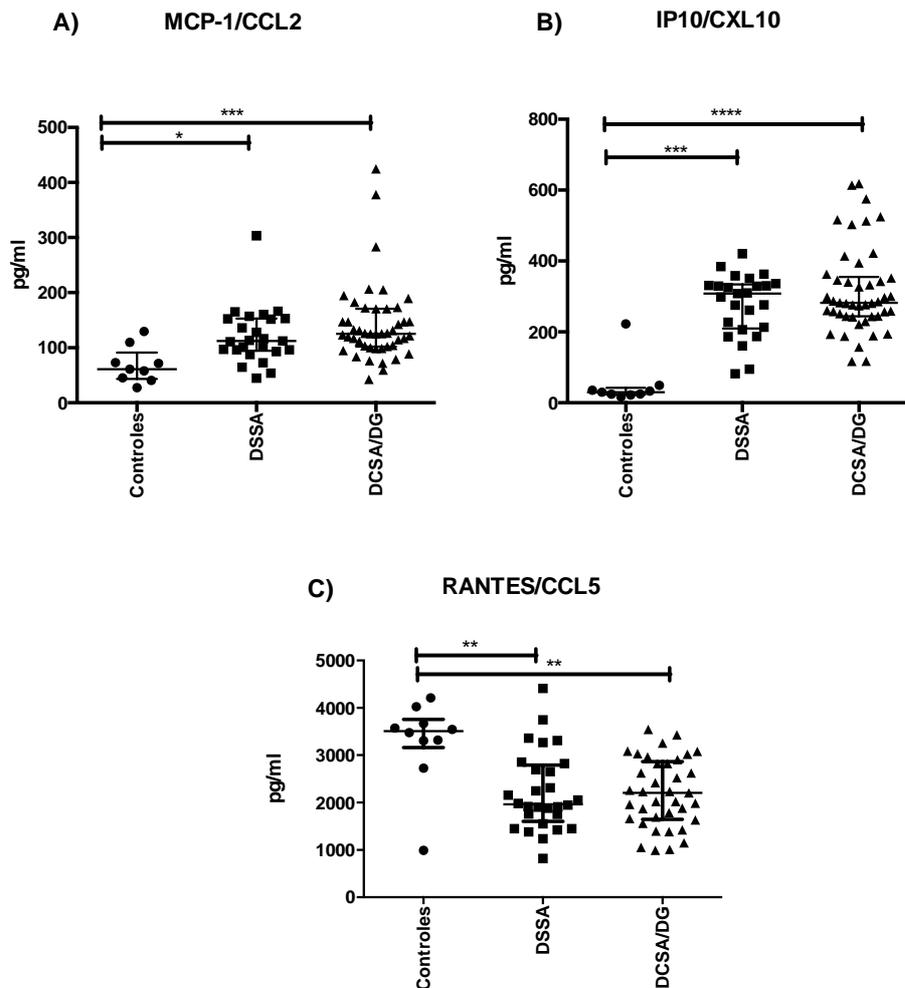


Figura 5.15. Dosagem de quimiocinas circulantes em pacientes infectados pelo DENV. A) MCP-1/CCL2. B) IP-10/CXL-10. C) RANTES/CCL2. A quantificação das quimiocinas foi feita em 3 grupos: controles (indivíduos clinicamente saudáveis), pacientes com DSSA e pacientes com DCSA/DG. Na análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de comparação de Dunn. * $P < 0,01$ ** $P < 0,001$ *** $P < 0,0001$. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave.

5.6. Análise de fatores de crescimento em casos confirmados de infecção pelo DENV

Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor – PDGF)

Conforme demonstrado na figura 5.16, apesar de observamos concentrações circulantes mais baixas de PDGF-BB em ambos grupos de pacientes

(DSSA e DCSA/DG) quando comparados aos controles, essa diferença não foi significativamente estatística através do teste de Kruskal-Wallis :[controles 269.4 (143.5-465.0) n=9, DSSA 234.6 (147.8-257.3) n=26, DCSA 194.2 (102.0-241.3) n=29]. Utilizando a análise estatística através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, observamos uma tendência em medianas mais baixas nas dosagens de PDGF-BB no grupo DCSA/DG (teste não paramétrico de Mann-Whitney, P=0,06) (figura 5.16).

Fator de crescimento epidérmico (Epidermal growth factor – EGF)

Com relação ao EGF, observamos concentrações séricas mais baixas de EGF nos pacientes DSSA e DCSA/DG em comparação com os indivíduos saudáveis [Controles 351 (145.7-417.6), DSSA 188.7 (103-285) e DCSA 155 (91-207.9) teste não paramétrico de Mann-Whitney, P=0,0165] (figura 5.16).

Fator de crescimento de hepatócitos (Hepatocyte growth factor – HGF)

Nossos resultados demonstraram concentrações elevadas de HGF nos pacientes DSSA e DCSA/DG comparados aos controles: [controles 2.854 (2.688-3.020) n=10, DSSA 4.095 (3.160-5.031) n=11, DCSA 4.262 (3.881-4.643) n=69, teste não paramétrico de Mann-Whitney DSSA vs controle P= 0,0369; DCSA/DG vs. controle P= 0,0184 respectivamente] (figura 5.16).

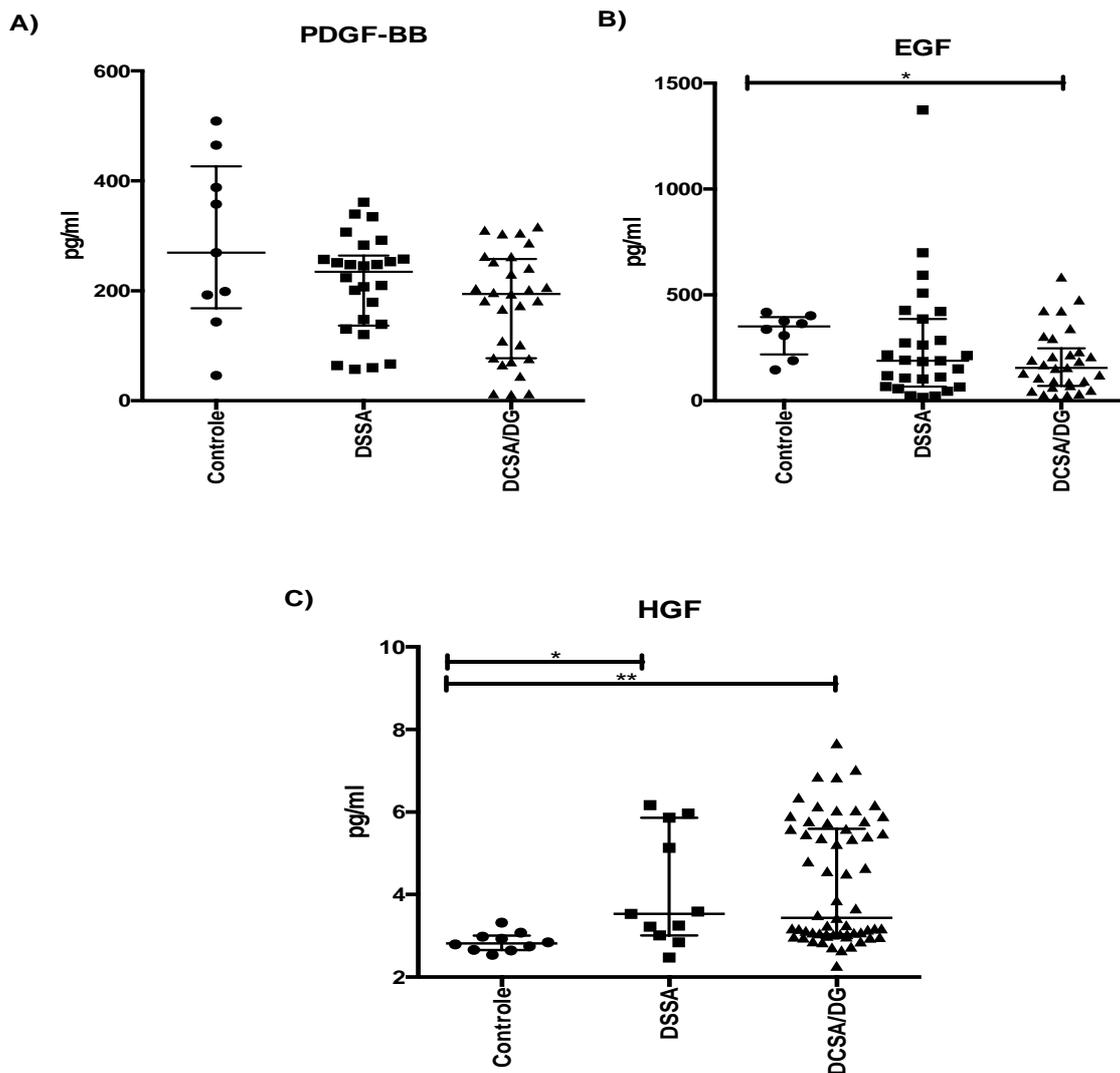


Figura 5.16. Dosagem de Fatores de crescimento circulantes em pacientes infectados pelo DENV. A) PDGF-BB. B) EGF. C) HGF. A quantificação dos fatores de crescimento foi feita em 3 grupos: controles (indivíduos clinicamente saudáveis), pacientes com DSSA e pacientes com DCSA/DG. Na análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. * $P < 0,01$ ** $P < 0,001$ *** $P < 0,0001$. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Dengue sem sinais de alarme, DCSA: Dengue com sinais de alarme; DG: Dengue grave.

6. Discussão

O estado de Pernambuco localiza-se na região nordeste do Brasil composto por 98.076,021 Km², 184 municípios e o distrito estadual de Fernando de Noronha e população 9.496.294 habitantes (IBGE, 2018). Além disto, o estado é dividido em 12 regiões de saúde, sendo a região I formada pela região metropolitana de Recife, cuja população soma cerca de 4.116.153 habitantes. Embora a região metropolitana de Recife corresponda a 2,8% da área do estado, esta é a região mais povoada do estado com uma população com cerca de 4.116.153 habitantes, sendo importante também lembrar que cerca de 81% da população de Pernambuco viva em zona urbana (revisto por Cordeiro., 2008; SVS/PE, 2016).

De acordo com os dados obtidos nesta casuística, é possível notar que em 2010 ,77,7% dos casos ocorreram na região de saúde I, enquanto que em 2011 a região foi responsável por 60,7% dos casos notificados. Quando comparados com os números do SINAN, a região I é responsável por 49,6% dos casos em 2010 e 38,7% em 2011.

O contraste observado entre os números do SINAN e os números desta casuística, podem ser o reflexo de escolha da unidade de recrutamento deste estudo (HUOC). No entanto, é real o protagonismo de Recife como líder no ranking de notificações de casos de dengue. Fato este que deve relacionar-se com a alta densidade populacional da cidade 7.039,64 hab/km², sendo a nona maior cidade do país (IBGE, 2018).

A maior parte dos casos suspeitos de dengue registrados nesta casuística concentraram-se entre o segundo e terceiro trimestre, com maior ocorrência nos meses de junho e julho de 2010 (89/309) e 2011 (24/94), respectivamente. No entanto, quando estes dados são comparados com os dados disponíveis no SINAN, é possível observar que na plataforma do ministério da saúde os picos das epidemias ocorreram em junho (7.230/33.010) e abril (2.880/16.059). Quando comparado com os picos de notificações com os demais estados da região, verificou-se que no Maranhão (MA) os picos de incidência ocorreram em agosto e fevereiro, no Piauí (PI) em maio e abril, no CE em dezembro e abril, no Rio Grande do Norte (RN) em julho e abril, na PB em julho e março, em AL em abril e março, em Sergipe em agosto/maio e maio e na BA em maio e abril nos anos de 2010 e 2011, respectivamente. Em relação ao cenário nacional, os picos de incidência de

notificações nas regiões brasileiras ocorreram em fevereiro na região Norte, em maio e abril no Nordeste, em março e abril no Sudeste, em abril e março no Sul e em janeiro e março no Centro-Oeste nos anos de 2010 e 2011, respectivamente. Os meses de abril, maio e junho representaram mais de 70% dos casos notificados de dengue no período de 2001-2012 no CE (Oliveira *et al.*, 2018).

Viana e Ignotti (2013) destacam a temperatura e a pluviosidade como importantes determinantes ecológicos da dengue, uma vez que estas condições contribuem para o aumento a densidade vetorial. Desta forma, é importante salientar que a região metropolitana de Pernambuco tem seu período chuvoso de abril a agosto, enquanto que no Sertão, as chuvas concentram-se entre os meses de janeiro e abril (revisto por Cordeiro, 2008). No município de Barreiras/BA, a incidência da dengue parece ser maior também no período chuvoso (Costa & Calado, 2016). De fato, a pluviosidade em Ribeirão Preto/SP contribuiu para ao surgimento de novos casos de dengue (Gabriel *et al.*, 2018).

A associação positiva entre o índice de infestação predial (IIP) e pluviosidade e IIP e incidência de casos sugeriu que IIP, é um fator significativo para na transmissão da dengue embora a pluviosidade não seja fator determinante para o desaparecimento do mosquito (de Souza *et al.*, 2010).

No município de Santana/Amapá, também foi observado uma relação direta entre o aumento no número de casos de dengue com o aumento da precipitação nos meses de janeiro a março (Flexa *et al.*, 2006). Em Porto Rico foi observado a associação entre a eclosão de ovos de *Aedes* e a precipitação e a sobrevivência do mosquito adulto e a umidade (Lega *et al.*, 2017).

Nos anos de 2010 e 2011, na cidade de Recife por exemplo, os meses de junho e abril foram os que apresentaram maior índice pluviométrico (APAC, 2018), respectivamente. Estes dados corroboram diretamente com o pico de notificações do SINAN, endossando a ideia de que o índice de precipitação se relaciona com o número de casos de dengue. Embora, nesta casuística os picos de notificações tenham ocorrido em junho e julho de 2010 e 2011, respectivamente. É necessário levar em consideração as outras regiões do estado que possuem variáveis climáticas diferentes das que são típicas da região metropolitana de Recife.

Em relação a distribuição dos casos investigados nesta casuística, constata-se que em ambos os anos de epidemia, a cidade de Recife concentrou a maior parte

dos casos, com cerca de 39,9% (123/309) e 25,6% (24/94) nos anos de 2010 e 2011, respectivamente. No ano de 2010, a cidade de Recife foi seguida de cinco cidades com maior número de casos: Jaboatão dos Guararapes (12,9%); 40/309), Olinda (10,1%, 33/309), Camaragibe (5,8%; 18/309), Paulista (5,5%; 17/309) e Cabo (2,9%; 9/309). No ano de 2011 a cidade de Recife foi seguida por Olinda (14,9%; 14/94), Paulista (7,4%; 7/94), Igarassu (6,4%; 6/94), Jaboatão dos Guararapes (6,4%; 6/94) e Carpina (4,3%; 4/94). Quando comparados com dados do SINAN, verifica-se que, em ambos os anos, a cidade de Recife apresentou-se como a cidade com maior número de casos, com cerca de 34,9% (11.505/32.994) e 32,1% (5.149/16.039). Em 2010, Jaboatão dos Guararapes (5,5%; 1.816/32.994), Paulista (4,8%; 1.588/32.994), Cabo de Santo Agostinho (4,4%; 1.450/32.994), Caruaru (3,8%; 1.277/32.994) e Petrolina (3,5%; 1.148/32.994), foram as cidades com maior número de casos depois da cidade de Recife. Em 2011, Garanhuns (4,8; 779/16.039), Afogados da Ingazeira (4,2%; 676/16.039), Paulista (3,5%; 569/16.039), Carpina (3,2%, 514/16.039) e Olinda (3,1%, 493/16.039), apresentaram-se como as cidades com maior número de casos de dengue, depois de Recife.

Nesta casuística, o sexo feminino foi responsável por 53,6% (216/403) das notificações enquanto que o sexo masculino obteve 46% (187/403). Estratificando, no ano de 2010 54% (167/309) dos casos corresponderam ao sexo feminino, enquanto que 46% sexo masculino. No ano de 2011, 52% (49/94) e 48% (45/94) das amostras correspondem ao sexo feminino e masculino, respectivamente. Em relação aos dados oficiais do SINAN, no de 2010 58% (18.964/32.907) dos casos foram do sexo feminino, enquanto que o sexo masculino correspondeu a 42% (13.942/32.907) dos casos. Em 2011, o percentual de 2010 se repete para os dois gêneros, somando o sexo feminino 9.217 casos e o sexo masculino 6.695 casos de um total de 15.915 casos notificados de dengue no estado.

Em um estudo realizado com pacientes hospitalizados em Cuba no ano de 1981, cerca de 60,1% dos pacientes eram do sexo feminino (Espinosa Brito, 2015). Cordeiro e colaboradores (2007) destacaram que o sexo feminino foi o gênero mais acometido em uma análise de casos de dengue durante o período de 1995-2006, correspondendo cerca de 59,3% dos casos. Além disso, o sexo feminino também foi o mais acometido em um estudo de relacionado a pacientes idosos com dengue (Graciano *et al.*, 2017). Analisando casos de dengue de 2010-2013 no município Pernambucano de Igarassu, o sexo feminino correspondeu a 57,25% dos casos de

dengue (Cruz *et al.*, 2016). Em um estudo sobre DENV-4 no RJ no período de 2011-2013, o sexo feminino também foi o gênero mais acometido por dengue (Heringer *et al.*, 2017). No entanto, em estudo realizado com DENV-2 e DENV-4 em Campos dos Goytacazes/RJ nos anos de 2010 e 2013, Faria e colaboradores (2017) relataram que os pacientes do sexo masculino foram mais afetados que o sexo feminino. Por outro lado, estudo realizado no Paquistão constatou que 69% (3.806/5.513) dos casos de dengue eram pertencentes ao sexo masculino. Os autores sugeriram que fatores como segregação, maior tempo em casa e roupas que cobrem quase todo o corpo, desempenharam papel importante na proteção das mulheres (Khan *et al.*, 2018). Araújo e colaboradores (2012) analisaram 84 casos fatais e reportaram que 54% dos casos eram do sexo masculino.

Crianças entre 6 a 10 anos de idade (23,33%, 94/403) e 11 a 15 anos (18,36%,74/403) foram os mais acometidos (figura 5.3). Num panorama de 0-15, 16-60 e ≥ 61 anos, o grupo 0-15 representou 54,34% (219/403) dos acometidos por dengue, enquanto que o grupo 16-60 foi responsável por 37,47 (151/403) e os ≥ 61 7,69 (31/403).

No banco de dados do SINAN, é possível observar que a faixa etária mais atingida pela dengue em 2010 foi a faixa etária 20-39 anos (33,3%; 10.965/32.907), seguido dos grupos 40-59 anos (17,9%; 5.882/32.907) e 10-14 anos (13,5%; 4.437/32.907). Em 2011 o grupo etário mais atingido pela dengue foi o grupo 20-39 anos (34,3%; 5.464/15.915), seguido dos grupos 40-59 anos (19,2%; 3.049/15.915) e 10-14 (11,5%; 1.829/15.915). Num panorama de 0-14, 15-59 e ≥ 61 anos, a faixa etária de 0-14 anos representa 32,9% (16.086/48.822) dos casos reportados, enquanto que 15-59 representou 61,2% (29.879/48.822) e ≥ 61 anos representou 5,7% (2.769/48.822).

Tendo em vista os resultados apresentados, observa-se um contraste pelo fato de que nesta casuística o grupo mais atingido pela doença sejam pacientes 0-15 anos de idade, enquanto que os números do SINAN demonstram que o grupo 15-59 anos representaram cerca de 61,2% dos casos. Diante disto, é importante ressaltar que os dados desta casuística tratam-se de pacientes atendidos em um setor terciário de saúde, enquanto que os dados do SINAN tratam-se de todos os setores saúde. Devido a uma limitação do próprio sistema do SINAN, não é possível estratificar mais os dados da plataforma. No entanto, estratificando os dados desta casuística em intervalos de 5 anos, é possível observar que o grupo 10-14 anos

(23,1%) foi o grupo com mais representatividade, seguido pelos grupos 5-9 anos (19,6%) e 0-4 (9,9%).

Em pacientes hospitalizados no estado de Goiás durante uma epidemia em 2013, 45,8% dos pacientes encaixavam-se na faixa etária de 21 a 50 anos (Nascimento *et al.*, 2015). Analisando casos da epidemia de 2002 em Pernambuco, Montenegro e colaboradores (2006) relataram que 57,2% dos óbitos ocorridos, foram de pacientes 20-59 anos. No entanto, Nunes e colaboradores (2018) em uma análise de 1047 casos fatais, relataram maior frequência de casos fatais nas crianças (0-15 anos) em comparação com pacientes entre 16-30 anos, além de observarem aumento das chances de fatalidade comparando as referidas faixas etárias. Cordeiro *et al.*, (2007) relataram que crianças com menos de 15 anos foram mais acometidas pela infecção no ano 2003 em comparação com epidemias anteriores. Segundo os autores, a taxa de incidência de dengue para os grupos <1, 0-4 e 5-14 anos foi de 326, 210 e 199/100,000 habitantes no ano de 2003 no estado de Pernambuco. Em 2011 no município de Igarassu, Cruz e colaboradores (2015) relataram que indivíduos menores de 20 anos foram mais acometidos por dengue do que os adultos. Analisando casos de DENV-4 no RJ, Heringer e colaboradores (2017) relataram que o grupo de 11-15 anos foi o grupo com maior número de casos de dengue. Durante epidemia de 2008 no estado do Ceará, Oliveira e colaboradores (2018) apontaram aumento no número de casos positivos de dengue na faixa etária de 0-9 anos. Figueirêdo e colaboradores (2013) reportam que pacientes a partir de 60 anos estão mais suscetíveis à dengue, sendo a idade um fator de proteção para indivíduos menores de 60 anos.

A média de idade nesta casuística é de 29,4 anos. Espinosa Brito e colaboradores (2015) apontaram que a média de idade em pacientes hospitalizados em 1981 era de 36,3 anos. Faria e colaboradores (2017) analisando casos de dengue em 2010 e 2013, relatam que a média de idade dos infectados por dengue era de 34 anos. No entanto, Oliveira *et al.*, (2018) numa análise de 2002 a 2011 no nordeste, aponta 27,7 anos como média de idade dos indivíduos de estudo. O ministério da saúde (SVS/MS, 2016) recomenda que pacientes ≤ 2 anos e ≥ 65 anos, devam receber acompanhamento diferenciado, pois estes podem apresentar desfechos desfavoráveis.

No Brasil até o ano de 2013, classificação dos casos de dengue era feita com base em critérios do guia de dengue da OMS de 1997. Esta classificação

agrupava os pacientes em grupos de: Febre do dengue, FHD (Grau I-IV) e SCD (Tukasan *et al.*, 2017). A partir de 2001, o Brasil passou a adotar o termo “Dengue com complicações” utilizado somente no país, o que por sua vez complicava a comparação das taxas de dengue com outros países (Cavalcanti *et al.*, 2015). Contudo, uma revisão da classificação da OMS de 1997 foi necessária devido à dificuldade em aplicar os critérios de FHD na prática clínica, juntamente com o aumento do número de casos de dengue grave que não preenchiam os critérios estritos para FHD (WHO, 2009). Desta forma, a OMS através de um estudo denominado DENCO em 2009, passou a classificar os casos de dengue em DCSA, DSSA e DG (WHO, 2009). Cavalcanti *et al.*, (2015), relatam maior sensibilidade e melhor habilidade de incluir grande número de casos com a classificação de 2009 do que com a classificação de 1997.

A classificação dos casos de dengue, é de suma importância para o manejo clínico do paciente. Além disso, embora as manifestações de dengue sejam complexas, seu manejo é simples e muito efetivo, desde que as intervenções ocorram de forma correta e em tempo apropriado (WHO, 2009). Todo paciente classificado como DCSA deve receber pronto atendimento em leito de internação até a sua estabilização, enquanto que a assistência a pacientes DSSA poderá ser feita em domicílio com acompanhamento diário, salvo casos com condições clínicas especiais e/ou risco social ou comorbidade (SVS/MS, 2016). Oitenta por centos (80%) dos casos desta casuística pertencem ao grupo DCSA, enquanto que o grupo DSSA representou 19% do total de casos.

Comparando com dados do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2018), as epidemias de 2010 e 2011 apresentaram cerca de 28.210 e 13.607 casos de DC, 18 e 15 casos de dengue com complicações, 260 e 193 casos de FHD, 4 e 8 casos de SCD, 25 e 30 casos de óbitos, 225 e 156 casos de extravasamento plasmático, 282 e 202 casos com manifestações hemorrágicas, respectivamente. Em suma, 85,22% dos pacientes foram reportados para o ministério da saúde, como sendo casos de DC, 0,07% como Dengue com complicações, 0,92% FHD e 0,02% SCD, enquanto que 13,77% como casos inconclusivos.

Embora os métodos de classificação adotados nesta casuística e pelo ministério da saúde naquela época, sejam distintos. É perceptível a subnotificação de casos de graves, quando na verdade o óbito foi uma realidade para pelo menos 55 desfechos. Em outras palavras, é como se num universo de 493 pacientes

classificados como FHD, Dengue com complicações e SCD, um a cada 9 pacientes viesse a óbito. Desta forma, fica evidente a dificuldade em classificar pacientes com dengue seguindo os antigos critérios adotados pelo ministério da saúde até 2013. Tendo em vista isto, a nova classificação reforça a importância do manejo adequado dos pacientes infectados pelo DENV e reconhecimento precoce dos sinais de alerta. Esses sinais são importantes à medida que surgem antes do início da dengue grave (WHO, 2009).

Em relação as manifestações clínicas, observa-se a maior frequência de febre (99,26%; 400/403) e cefaleia (57,57; 232/403). A febre alta é um sinal clínico de início súbito que geralmente cursa acompanhada de cefaleia de intensa. Em geral estes sintomas costumam aparecer por volta do quinto e sexto dia pós-infecção (Malavige *et al.*, 2004; SVS/MS, 2010). Náuseas e vômitos, mialgia, prurido, astenia, diarreia, dor retroorbitária, artralgia, tosse/tosse seca, anorexia e dor abdominal são achados típicos da doença demonstrado por muitos trabalhos observacionais (Nogueira *et al.*, 1999; Espinosa Brito, 2015; Faria *et al.*, 2017; Heringer *et al.*, 2017; Azeredo *et al.*, 2018).

A dor abdominal (66%; 266/403) foi o segundo aspecto clínico mais reportado nesta casuística, e o sinal de alarme mais frequente nos indivíduos de deste estudo. De fato, Heringer e colaboradores (2017) também relataram alto numero de casos de dor abdominal em pacientes DCSPA. Em relação a frequência deste sintoma, Ramalho e colaboradores (2018) relataram que este sintoma representou cerca de 69,4% dos casos estudados em 2012 no Ceará, enquanto Espinosa Brito (2015) relatou que dor abdominal foi um sintoma mais frequente em mulheres. Os sinais de alarme estão fortemente relacionados ao aumento da permeabilidade vascular, sendo assim a valorização da dor abdominal pode auxiliar o manejo clínico para um melhor prognóstico do paciente (Guzman *et al.*, 2010; SVS/MS, 2016).

Neste estudo, 38,71% dos casos (156/403) apresentaram exantema. O exantema está presente em 50% dos casos de dengue e, manifesta-se tipicamente por tipo maculo-papular, atingindo face, tronco e membros, podendo apresentar-se sob outras formas com ou sem prurido (SVS/MS, 2016).

No entanto, Lupi e colaboradores (2007) relatam que erupções cutâneas são manifestações frequentes (50-80%), no entanto em pacientes com alto fototipo de

pele, a observação destes sinais pode ser limitada. Tendo em vista isto, o SINAN reporta que 38,4% (18.748/48.822) dos casos de dengue notificados, tratava-se de pessoas com cor de pele negra e parda.

O extravasamento de plasma é um marco de gravidade da dengue, e frequentemente associa-se a disfunção da microvasculatura endotelial, especialmente dos pulmões e da cavidade abdominal, o que conseqüentemente resulta em derrame pleural e ascites (revisto por Cardozo *et al.*, 2017). Nesta casuística, cerca de 18,1% (73/403) dos indivíduos apresentaram sinais de acúmulo de fluidos distribuídos entre derrame pleural (12,41%; 50/403), derrame cavitário (9,43%; 38/403) e ascite (5,21%, 21/403). Malavige *et al.*, (2004) ressaltam que derrames pleurais geralmente são vistos no lado direito, embora nesta casuística este achado tenha sido identificado em 32% dos casos de derrame pleural (16/50), uma vez que não tenha informação sobre a localização dos casos dos 48% restantes. De acordo com a nova classificação, embora o acúmulo de fluido seja um importante sinal de permeabilidade vascular, este por si só não caracteriza o paciente como um caso de DG. Em geral os casos de DG com acúmulo de fluidos estão relacionados a quadros de desconforto respiratório, que por sua vez pode ser causado por síndrome da angústia respiratória, pneumonites e sobrecargas de volume (WHO, 2009; SVS/MS, 2016). Nesta casuística, dentre os quatro casos (1%) de desconforto respiratório, três pacientes apresentavam acúmulo de fluido, enquanto que um paciente não apresentava sinais de acúmulo de fluido, edemas, manifestações hemorrágicas, porém apresentava plaquetopenia (80.000 cell/mm^3) e dor abdominal.

Além dos sinais e sintomas expostos acima, nesta casuística também foi possível encontrar alterações na diurese, como oligúria (0,2%; 01/403) e disúria (0,2%; 01/403). Infecções por DENV estão relacionadas a uma variedade de desordens renais tais como insuficiência renal aguda, proteinúria, hematúria e glomerulonefrite (Lizarraga & Nayer, 2014). Em relação à oligúria, este é importante sinal de choque quando a diurese é menor que 1,5 ml/kg/h (SVS/MS, 2016).

A dengue grave é caracterizada por importante extravasamento vascular, que pode ocasionar choque, hemorragias e sério comprometimento de outros órgãos, como o coração e fígado (SVS/MS, 2016; WHO, 2009). Nesta casuística, dois casos de choque foram relatados. Um dos casos teve óbito como desfecho. Este óbito tratava-se de paciente sexo feminino (70 anos), com infecção do trato

urinário com evolução para sepse, cursava também bradicardia com frequência cardíaca de 42 bpm, temperatura corpórea de 35°C e Leucocitose de 25.020 cells/mm³. É importante salientar que infecções bacterianas podem surgir na fase de recuperação da doença, porém estas tem caráter grave e podem levar o paciente ao óbito (SVS/MS, 2016).

As manifestações hemorrágicas descritas neste trabalho, atingiram cerca de 43,42% dos casos (175/403).

No presente estudo, 94% dos pacientes infectados pelo DENV apresentaram trombocitopenia corroborando estudos prévios em pacientes brasileiros (Oliveira et al, 2009; Azeredo et al., 2006). Além disso, cerca de 58% dos casos com confirmação laboratorial de infecção pelo DENV apresentaram contagens de plaquetas inferiores a 50.000 mm³. De fato, a trombocitopenia acentuada é associada com casos graves e como surgimento das manifestações hemorrágicas (Oishi, K et al., 2007).

As manifestações hemorrágicas são sinais que podem ocorrer tanto na fase febril como crítica. Em geral na fase febril, os sinais de sangramentos são caracterizados pelo aparecimento de petéquias e sangramentos provocados por prova do laço, sinais estes compatíveis com quadro de DSSA. No entanto, manifestações hemorrágicas espontâneas como as de mucosas estão relacionadas com a fase crítica da doença, ou seja, quando ocorre concomitante aumento de hematócrito e plaquetopenia, o que por sua vez também caracterizam os quadros de DCSA. Manifestações hemorrágicas graves, por exemplo as hemorragias massivas do aparelho digestivo, e não necessariamente estão relacionadas a trombocitopenia e hemoconcentração (SVS/MS, 2016; WHO, 2009).

Nesta casuística, 8,9% (36/403) dos indivíduos apresentaram edema. Edema subcutâneos em geral estão associados a pacientes DCSA e DG, embora nesta casuística seis casos de edema estão relacionados com pacientes DSSA. Os edemas subcutâneos podem surgir devido a perda capilar, e não estão necessariamente ligados a casos de super-hidratação. No entanto estes podem aumentar após a hidratação satisfatória (SVS/MS, 2016). O edema de bolsa escrotal foi o menos frequente tipo de edema nesta casuística, sendo este um achado raro e autolimitado que desaparece em alguns dias sem deixar sequelas (Shamim & Naqvi, 2011).

Neste estudo 10,4% dos casos suspeitos apresentaram comorbidades, sendo a hipertensão arterial a mais frequente (7,9%). A hipertensão arterial é relatada em alguns trabalhos como a comorbidade mais frequente corroborando nossos achados (Nascimento *et al.*, 2015; Faria *et al.*, 2016; Azeredo *et al.*, 2018).

As doenças pré-existentes devem ser levadas em consideração para o adequado manejo da dengue. Pacientes hipertensos, cardíacos, diabéticos, pacientes obesos, renais crônicos, com doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC), pacientes com hepatopatias, pacientes com doenças hematológicas, doenças autoimunes e pacientes com doenças ácido pépticas. Comorbidades podem influenciar o desenvolvimento de formas graves de dengue (Toledo *et al.*, 2016), enquanto que em pacientes com comorbidade possuem cerca de 11 vezes mais chances de morrerem por dengue do que aqueles que não possuem comorbidades (Werneck *et al.*, 2018). Além dos cuidados com medicamentos, pacientes com hipertensão arterial podem desenvolver choque com níveis pressóricos normais (SVS/MS, 2016).

Em relação aos pacientes com diabetes e alergias, estes corresponderam a 2,98 (12/403) e 0,50% (2/403) dos casos desta casuística, respectivamente. Figueiredo e colaboradores (2010) reportaram que pacientes com estes dois tipos de comorbidades possuem 2,5 vezes mais chances de desenvolverem FHD do que pacientes sem estas comorbidades. Pacientes com alergias graves liberam citocinas pró-inflamatórias que quegridem o endotélio, levando a fragilidade capilar. A diabetes mellitus produz mudanças anatômicas e fisiológicas na integridade do endotélio, em especial pela liberação de IFN- γ e TNF, que por sua vez possuem papel importante no agravamento das infecções por DENV (revisto por Figueiredo *et al.*, 2010).

O diagnóstico empregado nesta casuística consistiu de métodos sorológicos e de biologia molecular, conforme descrito na metodologia. Foram analisadas 191 amostras de soro, das quais 139 apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das metodologias empregadas.

As epidemias de dengue em Pernambuco tornaram-se um problema de saúde pública, por volta do de 1995. O DENV-1 predominou nos anos de 1997-2001, e nos anos de 2010 e 2011. O DENV-2 predominou nos anos de 1995 e 1996, o DENV-3 nos anos de 2002-2009 e DENV-4, o último sorotipo a ser introduzido,

predominou no ano de 2012 (revisto por Silva, 2013). Nesta casuística, os quatro sorotipos virais foram identificados através de RT-PCR, com prevalência de DENV-1 (50%; 10/20), corroborando os dados relatados por Silva (2013).

Dentre os sorotipos identificados, ressalta-se a identificação do DENV-4 em uma amostra de agosto de 2010 em uma paciente de 47 anos da cidade de Camaragibe da RMR. No entanto, de acordo com dados da vigilância em saúde do estado de Pernambuco, o DENV-4 foi introduzido no estado em 2011 no município de Serra Talhada (SVS/PE, 2013). Contudo, diante da impossibilidade de isolamento viral em cultura celular, esta cepa não pôde ser sequenciada para a identificação do genótipo circulante na época.

Os métodos sorológicos ainda são a ferramenta mais útil para o diagnóstico da doença durante as epidemias. Neste estudo, a detecção de anticorpos IgM por MAC-ELISA, foi a metodologia mais sensível.

Encontramos alta positividade de amostras nos dias 3 e 5 após o surgimento dos sintomas. Gubler e colaboradores (1998) demonstraram que anticorpos IgM podem ser detectados ainda na fase aguda da doença, podendo ser detectáveis até 90 dias, embora resultados negativos durante os dias 3 e 7, possam ser considerados falso-negativos (Daumas *et al.*, 2013). Nogueira e colaboradores (1988) relatam que altos níveis de IgM são detectados a partir do 14º dia de doença, com declínio a partir do 60º dia de doença.

Em Belo Horizonte, durante epidemia ocorrida em 2011, o MAC-ELISA confirmou 80,4% (100/124) dos casos suspeitos convalescentes investigados (Ferraz *et al.*, 2013). No Rio Grande do Sul, área de baixa incidência para os DENV, o MAC-ELISA foi a metodologia que mais contribuiu para a investigação de casos suspeitos entre 2007 e 2013 (18,9%) (Tumioto *et al.* 2014). No RJ, o MAC-ELISA confirmou 27,2% e 37,5% dos casos investigados durante as epidemias de 2011 e 2012, respectivamente, após a introdução do DENV-4 (Heringer *et al.*, 2017). A confirmação de casos por MAC-ELISA pode estar diretamente relacionada ao período de coleta da amostra. Em concordância com os achados desta casuística, Harron e colaboradores (2018) relatam que considerando a positividade dos testes sorológicos separadamente, a detecção de IgM é mais prevalente do IgG, que é mais prevalente que detecção de antígeno NS1.

A detecção de anticorpos anti-DENV da classe IgG obteve 100% de positividade nos dias 3,8,10 e 14. É sabido que altos títulos de IgG são encontrados ainda durante a fase aguda em pacientes com infecção secundária, quanto que na infecção secundária baixos títulos de IgM são detectados (WHO, 2009). Neste sentido, utilizamos o método de razão de anticorpos IgM/IgG para distinguir infecção primária e secundária (WHO, 2009). Nesta casuística, 90,74% (49/54) dos casos de dengue eram provenientes de infecção secundária e tinham média de idade de 28,03 anos enquanto que infecções primárias (9,26%; 5/54) 8,98 anos. A alta proporção de casos secundários nesta casuística, ressalta a importância da combinação de diferentes testes sorológicos e também reflete a cocirculação dos sorotipos de dengue na região (Schilling *et al.*, 2004).

O teste de captura de antígeno NS1 é um método sorológico que permite o diagnóstico precoce de infecções por DENV, durante o estágio inicial da doença, mesmo em laboratórios com recursos técnicos e equipamentos limitados (Andries *et al.*, 2012). Em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu o teste de captura de antígeno NS1 em unidades de sentinela para identificação precoce de casos suspeitos em vários estados (de Souza *et al.*, 2010).

Neste estudo, amostras com 1 a 8 dias de doença foram submetidas à detecção de antígeno NS1 com um total de 12,68% (18/142) amostras positivas. As amostras positivas foram encontradas do segundo ao sétimo dia doença, com melhor dia para detecção NS1 o 4º dia de doença, seguida pelo 5º dia de doença, corroborando o fato da secreção da NS1 ocorrer durante a fase aguda da dengue (revisto por Lima *et al.*, 2010). Fatores como origem geográfica das amostras, infecções secundárias e sorotipos podem influenciar negativamente a performance dos testes (da Costa *et al.*, 2014). Lima *et al.*, (2014) observaram uma baixa sensibilidade de testes NS1 em casos de DENV-4. Embora uma única amostra de DENV-4 tenha sido detectada neste estudo, sabe-se que o vírus foi reintroduzido no Brasil no ano de 2010 (Temporão *et al.*, 2011). Desta forma, a baixa sensibilidade dos testes de captura do antígeno NS1 pode ser devida a circulação de DENV-4 no estado de Pernambuco e a hiperendemicidade do local, com muitos casos de infecções secundárias. Um estudo realizado durante uma epidemia de DENV-4, demonstrou 15% de resultados falso negativos para o teste de NS1 e, apontou a necessidade de avaliação desta abordagem para o diagnóstico precoce da doença por este sorotipo (Colombo *et al.*, 2013).

Tendo em vista a baixa positividade dos testes, 72 amostras negativas foram submetidas a dissociação térmica e 62 amostras submetidas a dissociação ácida, resultando em uma positividade de 5,5% (4/72) e 1,6% (1/62) para ambos os métodos, respectivamente. Considerando-se os ensaios de detecção de antígeno NS1 convencional e os ensaios por dissociação térmica e ácida, obteve-se uma positividade de 16,20% (23/142). A formação de imunocomplexos com NS1 está relacionada a altos níveis de IgG em infecções secundárias (Koraka et al., 2003), sendo assim a utilização de métodos de dissociação pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico como descrito previamente (Panakitsuwan *et al.*, 1997; Troisi *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 2001). Estudos prévios demonstraram baixa sensibilidade dos testes de captura de NS1 em casos de infecção secundária e infectados pelo DENV-4 (Colombo *et al.*, 2013). De fato, 90,74% dos casos testados no teste de NS1 apresentaram anticorpos anti-DENV classe IgG (infecção secundária).

A utilização da RT-PCR, permitiu a confirmação de 14,60% (20/137) dos casos analisados. Em 2010, os quatro sorotipos de DENV foram detectados, com prevalência de DENV-1 (52,94%). Em 2011, foi identificada a circulação de DENV-1 (33,33%) e DENV-3 (33,33%). Em um estudo no RJ em casos ocorridos de 2010 a 2012, a RT-PCR confirmou 91,0% (183/201) dos testados, no entanto, a alta taxa de positividade obtida naquele estudo foi devido aos critérios de seleção das amostras, que incluía a análise de amostras até o 5º dia dos sintomas e, em muitos casos, previamente positivos para o antígeno NS1 (Heringer *et al.*, 2017). Na epidemia ocorrida em Belo Horizonte em 2011, a RT-PCR em tempo real utilizada identificou a cocirculação dos quatro sorotipos de DENV, com uma maior prevalência do DENV-1 (73,2%), seguido do DENV-3 (10,1%), DENV-2 (5,8%) e do DENV-4 (2,9%), recém introduzido (Ferraz *et al.*, 2013). Em Cuiabá, o RT-PCR confirmou o sorotipo infectante em 54,8% dos casos investigados entre 2011 e 2014 e, DENV-1, DENV-3 e DENV-4 foram os sorotipos identificados, sendo este último o sorotipo mais prevalente (Heinen *et al.*, 2015). No entanto, um menor percentual de positividade foi observado na investigação de casos suspeitos ocorridos no Rio Grande do Norte entre 2010-2012, quando 24,1% foram confirmados por esta técnica (Branco et al., 2015). Na Paraíba, a investigação de casos entre 2007 e 2015, identificou por RT-PCR, o DENV-1 como o sorotipo prevalente no período, apesar da cocirculação dos quatro sorotipos em 2013 e 2014 (Guerra-Gomes *et al.*, 2017). Em regiões de circulação de outros arbovírus, como o Amazonas, o RT-PCR também se mostrou de grande importância para a investigação de casos suspeitos de dengue em 2011,

determinando o sorotipo em 38,4% (260/677) dos casos investigados. Naquele estudo, o DENV-2 foi o sorotipo predominante (46.2%), seguido do DENV-4 (29%), DENV-1 (10.0%) e DENV-3 (9.2%) (Martins *et al.*, 2014).

Uma importante contribuição do estudo, foi a identificação de dois casos de coinfeção entre DENV-1/2 e um caso de DENV1/3. Coinfectados por DENV-1/2 tratavam-se de dois pacientes do sexo masculino e feminino com 17 e 33 anos, ambos com 4 dias de doença, febre, cefaleia, plaquetopenia, exantema, manifestações hemorrágicas e tontura. O caso de coinfeção de DENV-1/3 trata-se de paciente sexo feminino, 11 anos de idade, apresentando febre, cefaleia e crise convulsiva.

O primeiro relato de caso de coinfeção na história da dengue, ocorreu em um paciente de 16 anos de Porto Rico, coinfectado por DENV-1/4 na década de 1980 (Gubler *et al.*, 1984). No Brasil, o primeiro relato de caso de coinfeção ocorreu em Miranda-MS no ano de 1996 pelos sorotipos DENV-1/2 (Rocco *et al.*, 1998). Anos mais tarde um paciente de 36 anos no CE apresentou infecção simultânea por DENV2/3 no ano de 2003 (Araújo *et al.*, 2006). Martins e colaboradores (2014) durante caracterização molecular no estado do Amazonas em 2011, relataram que 2,3% (13/260) das amostras positivas para DENV, tratavam-se de casos de coinfeção de DENV-2/4, DENV-1/4, DENV-1/2 e DENV-3/4. Além destes, em 2012, dois casos de coinfeção por DENV-1/4 são reportados, um em São José do Rio Preto/SP (Colombo *et al.*, 2013) e um no RJ (de Bruycker-Nogueira *et al.*, 2018). Coinfecções por DENV-1/DENV-4 e DENV-2/DENV4 também foram reportadas em casos investigados entre 2011 e 2014 em Cuiabá (Heinen *et al.*, 2015).

Coinfecções por DENV-1/3, também foram identificadas em dois casos na epidemia de 2010 em Belo Horizonte (Ferraz *et al.*, 2013). Bharaj e colaboradores (2008) relataram que, em um primeiro estudo detectando coinfecções entre sorotipos de DENV na Índia, a coinfeção DENV1/3 foi a mais prevalente das coinfecções relatadas na região de Delhi. Embora casos de coinfeção entre DENV sejam passíveis de ocorrer em áreas hiperendêmicas (Loroño-Pino *et al.*, 1999), é necessário investigar a importância de eventos de recombinação genética e o potencial risco para o surgimento de cepas mais virulentas (Bharaj *et al.*, 2008).

Mesmo em regiões de baixa circulação viral, como no Rio Grande no Sul, que teve seu primeiro caso autóctone de dengue em 2007, a RT-PCR é uma metodologia importante para a vigilância da doença. Naquele estado, mesmo com baixa prevalência, o método identificou 1,7% dos casos investigados entre 2007 e

2013, quando comparado à investigação por isolamento viral (0,25%) (Tumioto *et al.*, 2014).

Os DENV são altamente diversificados (Wang *et al.*, 2002) e esta diversidade genética foi descrita em diferentes genótipos dentro de cada sorotipo (Weaver e Vasilakis, 2009). Como já esperado, a análise filogenética baseada nas sequências da região codificante do gene E, demonstrou que a cepa sequenciada neste estudo, a cepa 186/BR/PE de DENV-1, pertence ao genótipo V (América/África), e encontra-se inserida no clado da linhagem 1b, corroborando a prevalência deste genótipo no continente americano (de Bruycker-Nogueira *et al.*, 2016; 2018). Além das Américas, este genótipo também é circulante no Oeste da África e em países da Ásia (Weaver & Vasilakis, 2009).

Walimbe e colaboradores (2014) relatam a importância da Índia para a introdução do genótipo Cosmopolita (V) na região do Caribe e Vilabonas-Arenas e colaboradores (2013) apontam a região do Caribe como importante epicentro da dengue nas Américas. De fato, estudos com o genótipo V do DENV-1 tem demonstrado que uma dinâmica de circulação e substituição de linhagens tem ocorrido em diversos países da América (Mendez *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2011; Muñoz-Jordán *et al.*, 2013; Tittarelli *et al.*, 2014), e que múltiplos eventos de introdução tem ocorrido no Brasil (de Bruycker *et al.*, 2016, 2018).

A cocirculação de duas linhagens distintas no país nos últimos anos tem sido relatada (dos Santos *et al.* 2011, de Bruycker-Nogueira *et al.*, 2018) e, o envolvimento de ambas as linhagens em casos brandos, graves e fatais demonstra que possivelmente não estão correlacionadas com algum desfecho da doença em particular. O estudo de de Bruycker-Nogueira e colaboradores (2016) demonstra que a linhagem 1b do genótipo V apresentou uma rota de introdução no Norte do Brasil, à partir da Venezuela e permaneceu circulante somente no Norte do país. No entanto, o estudo descreveu uma movimentação mais recente para a região Nordeste do Brasil e para a Argentina, o que corrobora a identificação desta linhagem nesta casuística. Além disto, Silva (2013) também descreve a presença das linhagens 1b e 2 no estado de Pernambuco durante o ano de 2010.

Diversos estudos demonstram níveis circulantes elevados de mediadores inflamatórios durante a infecção pelo DENV. Neste estudo investigamos fatores solúveis tais como quimiocinas (MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IP-10/CXCL10) e

fatores de crescimento (EGF, PDGF-BB e HGF) nos casos confirmados de dengue visando determinar o perfil de ativação do sistema imunológico.

Durante a infecção por DENV, linfócitos T, monócitos, células NK, células endoteliais, macrófagos e hepatócitos produzem mediadores inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas. Níveis de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 e quimiocinas como CCL2/MCP-1, CCL4, CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10, foram associados com casos graves dengue (St. John *et al.*, 2013).

A quimiocina MCP1-1/CCL2 é uma quimiocina relacionada com recrutamento de macrófagos, migração de células T de memória e células dendríticas para os sítios inflamados. A MCP-1/CCL2 é produzida tanto após a lesão tecidual ou processos infecciosos (Yoshimura *et al.* 1991). Nesta casuística, demonstramos elevados níveis circulantes de CCL2/MCP-1, tanto em pacientes DSSA como DCSA/DG em comparação com o grupo controle. No entanto, maiores concentrações foram encontradas nos pacientes com DCSA/DG. De fato, estudos prévios demonstraram que casos graves de dengue apresentaram altas concentrações de MCP-1/CCL2 (revisto por Zhao *et al.*, 2016). Lee e colaboradores (2006), relataram elevados concentrações e MCP-1/CCL2 nos pacientes com FHD. Além disto, estudos prévios relataram a associação desta quimiocina com hipotensão e trombocitopenia (Bozza *et al.*, 2008; de Oliveira-pinto *et al.*, 2012).

CCL5 também conhecida como RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted-RANTES) é fundamental para o recrutamento de leucócitos aos sítios inflamados. Nossas análises demonstraram que todos os pacientes infectados pelo DENV, independente da classificação clínica em DSSA ou DCSA/DG, apresentaram baixas concentrações séricas de CCL5/RANTES. Esses resultados corroboram estudos prévios que já demonstraram baixas concentrações de CCL5/RANTES no sangue de pacientes infectados pelo DENV (de-Oliveira-Pinto *et al.* 2012). Zhao e colaboradores (2016) relataram baixos níveis de CCL5/RANTES nos pacientes graves enquanto que Hottz e colaboradores (2016) demonstraram a associação de CCL5/RANTES com a trombocitopenia em pacientes com baixas dosagens. Embora não tenhamos encontrado diferença estatisticamente

significativa entre os grupos, nossos dados corroboram estudos prévios que relataram baixos níveis desta quimiocina durante a infecção pelo DENV.

CXCL-10 também conhecida como proteína induzida pelo IFN gama (Interferon gamma-induced protein-IP-10) é produzida por vários tipos celulares em resposta ao IFN- γ . CXCL10/IP-10 possui diversas funções tais como quimiotaxia de monócitos/macrófagos, linfócitos T, células NK além de promover a adesão dos linfócitos T às células endoteliais. Na infecção pelo DENV, CXCL10/IP-10 é produzida pelas células infectadas, e, por isso possui maior concentração durante a fase de viremia. Além de também promover o clearance viral (revisto por Conroy *et al.*, 2015).

Nesta casuística, demonstramos elevados níveis séricos de CXCL-10/IP-10 nos pacientes DCSA/DG e DSSA comparados com indivíduos controles. Conforme observado na figura 5.14, podemos observar que alguns pacientes DCSA/DG apresentaram elevadas dosagens. Estudos anteriores e com pacientes brasileiros demonstraram elevadas dosagens de CXCL-10/IP-10 em pacientes infectados pelo DENV corroborando nossos resultados (De oliveira Pinto *et al.*, 2012). Além disso, estudo com crianças brasileiras e infectadas pelo DENV-2 demonstram o envolvimento de CXCL-10/IP-10 com a indução de extravasamento vascular e disfunção hepática (Ferreira *et al.*, 2015).

Os fatores de crescimento são substâncias de natureza proteica, que assim como os hormônios e as citocinas, desempenham importante papel na comunicação intercelular. Estas proteínas estimulam a proliferação, migração e diferenciação celular. O HGF é um fator de crescimento parácrino secretado pelas células mesenquimais e apresenta ações nas células epiteliais e endoteliais. Possui papel fundamental na angiogênese e regeneração dos tecidos. Na infecção pelo DENV, as concentrações circulantes de HGF foram significativamente elevadas no início da fase febril e o HGF foi associado com gravidade da infecção (Voraphani, *et al.*, 2010). Além disso, outro estudo mostrou que os níveis de HGF aumentaram significativamente em pacientes graves e com choque em comparação com pacientes apresentando manifestações clínicas brandas (van de Weg *et al.*, 2013). Recentemente, Her e colaboradores demonstraram altas concentrações circulantes de HGF em pacientes com extravasamento plasmático e infecção secundária (Her *et*

al., 2017). Não observamos diferença estatística entre os grupos analisados, no entanto, é necessário considerar o n amostral de pacientes DSSA (n=11), que nesta casuística foi um fator limitante para a análise do teste. Contudo, observamos elevados níveis de HGF nos pacientes infectados pelo DENV, concordando com estudos prévios.

Fatores de crescimento, tais como EGF e PDGF são liberados pelas plaquetas ativadas após lesão vascular. Recentemente, nosso grupo relatou menores dosagens séricas de PDGF-BB em pacientes DCSA e alta frequência de plaquetas expressando PDGF e HGF nos pacientes infectados pelo DENV (Costa-Barros et al. 2018). Nossos resultados demonstraram que os pacientes com dengue apresentaram baixas contagens de plaquetas. Neste sentido, avaliamos as concentrações séricas de EGF e PDGF-BB nos pacientes infectados pelo DENV.

O fator de crescimento epidérmico (EGF - epidermal growth factor) é essencial para a cicatrização de feridas e reparação tecidual, estimula proliferação celular, aumenta a neovascularização e a migração de células (Kim et al., 2017). Observamos que pacientes DCSA/DG apresentaram baixas concentrações de EGF comparados aos controles. Estes achados corroboram os relatos de Cardozo e colaboradores (2017), cujo trabalho demonstrou a associação dos baixos níveis de EGF com pacientes que tiveram extravasamento plasmático. Ainda segundo os autores, os baixos níveis de EGF na infecção pelo DENV, estaria relacionado à trombocitopenia e ao consumo deste fator durante o reparo endotelial. Neste sentido, Butthep e colaboradores (2012) estudando lesão endotelial, relataram menores níveis de EGF nos pacientes com SCD, FHD e DC, respectivamente.

O fator derivado de plaquetas (PDGF) promove proliferação celular, inibe apoptose e é um componente integrante da manutenção das redes vasculares (Cao et al., 2003). Nesta casuística, encontramos baixas concentrações de PDGF-BB nos pacientes. Pacientes DSCSA/DG apresentaram tendência de menores concentrações (DCSSA/DG vs controles, P=0,06) em concordância com nossos estudos prévios (Costa-Barros et al. 2018). Rathakrishnan et al. e colaboradores (2012) relataram correlação entre trombocitopenia e baixas concentrações de PDGF. Além disso, os autores demonstraram menores níveis de PDGF em pacientes com infecção secundária.

Interessantemente, estudo recente com a síndrome trombocitopênica grave-SFTS (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome) causada pelo vírus SFTS, gênero *bunyavirus*, relatou baixas dosagens de PDGF-BB nos pacientes com trombocitopenia grave (Zhang et al., 2016). Nossos estudos, demonstraram baixos níveis de PDGF-BB em pacientes com DCSA e com trombocitopenia.

Embora não tenhamos encontrado diferença estatística entre os grupos analisados, DSSA e DCSA/DG, com os diferentes fatores de crescimento analisados, esses resultados demonstram que além dos mediadores clássicos (citocinas/quimiocinas), os fatores de crescimento parecem desempenhar um papel importante na patogênese da infecção pelo DENV e devem ser mais estudados futuramente.

7. CONCLUSÃO

- A alta incidência de dengue no município de Recife no período estudado é refletida pela maior concentração populacional daquela região, assim como pela área da abrangência da unidade de saúde selecionada;
- Junho de 2010 foi o mês com maior incidência de notificação desta casuística, o que corrobora dados do ministério da saúde e o maior índice de pluviosidade do ano. A maior incidência de casos em 2011 ocorreu em julho;
- Os dados demográficos demonstraram que o sexo feminino foi o mais acometido em relação aos casos suspeitos, assim como naqueles com diagnóstico positivo de infecção pelo DENV.
- A faixa etária mais acometida foi de 0-15 anos.
- Febre foi o sinal mais frequente nesta casuística. Dor abdominal, Manifestações hemorrágicas e sinais de acúmulo de fluidos refletiram o alto percentual de casos de DCSA desta casuística.
- Os parâmetros hematológicos evidenciaram trombocitopenia em pacientes suspeitos e confirmados.
- MAC-ELISA foi o teste mais sensível para o diagnóstico de dengue. Seguindo de detecção de antígeno NS1, cujos métodos de dissociação de imunocomplexos refletiram em baixa positividade.
- O diagnóstico molecular possibilitou a identificação de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e pela primeira vez DENV-4, caracterizando um cenário hiperendêmico. Além disto coinfeções entre DENV-1/2 e DENV-1/3 foram identificadas.
- A identificação da cepa 186/BR/PE/2010 corrobora dados sobre a circulação do genótipo V de DENV-1 no Brasil.
- A dosagem das quimiocinas e fatores de crescimento demonstrou níveis circulantes aumentados de MCP-1/CCL2, IP10/CXCL10 e HGF e baixos níveis circulantes de RANTES/CCL5, PDGF-BB e EGF. Esses resultados corroboram dados da literatura e sugerem a associação destes mediadores com a imunopatogênese da infecção pelo DENV.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, pretendemos realizar a análise filogenética e caracterização de subpopulações virais de cepas de DENV detectadas em pacientes apresentando diferentes desfechos clínicos da doença, assim como em casos de coinfeção entre os DENVs e/ou outros arbovírus.

9. REFERÊNCIAS

1. Adikari TN, Gomes L, Wickramasinghe N, Salimi M, Wijesiriwardana N, Kamaladasa A, et al. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. *Clin Exp Immunol*. 2016;184(1):90–100.
2. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499–511.
3. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections *Enzyme-Linked Immunosorb*. 2002;40(2):1–7.
4. Allonso D, Meneses MDF, Fernandes CA, Ferreira DF, Mohana-Borges R. Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from a 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2014;9(11):6–8.
5. Amorim JH, Alves RP dos S, Boscardin SB, Ferreira LC de S. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res*. 2014;181:53–60.
6. Anantapreecha S, Chanama S, A-Nuegoonpipat A, Naemkhunthot S, Sa-Ngasang A, Sawanpanyalert P, et al. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect*. 2005;133(3):503–7.
7. Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, et al. Field Evaluation and Impact on Clinical Management of a Rapid Diagnostic Kit That Detects Dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12).
8. APAC. Monitoramento Pluviométrico [Internet]. 2018. acesso em 20 de novembro de 2018. Disponível em: <http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/monitoramento-pluvio.php>
9. Araujo FM de C, Nogueira RMR, de Araujo JMG, Ramalho ILC, Roriz MLF de S, de Melo MEL, et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Dec;101(8):925–8.
10. Araújo JMG de, Bello G, Romero H, Nogueira RMR. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):1–10.
11. Araújo JMG de, Schatzmayr HG, de Filippis AMB, dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*. 2009;155(1):34–8.
12. Ashburn PM & Craig CF. No Title Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. . *J Infect Dis*. 1907;4:440-75.
13. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. *J Infect Dis*. 2006;193(8):1078–88.

14. Azeredo EL, Dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Correa J, Sanchez-Arcila JC, et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018 Feb;10.
15. Azeredo EL, Zagne SMO, Alvarenga AR, Nogueira RMR, Kubelka CF, De Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):437–49.
16. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013;3.
17. Bancroft TL. On the aetiology of dengue fever. *Aust Med Gaz.* 1906;(25:17).
18. Barcelos Figueiredo L, Cecílio AB, Ferreira GP, Drumond BP, De Oliveira JG, Bonjardim CA, et al. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(2):314–6.
19. Barreto, Maurício L. & Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud Avançados.* 2008;22:53–72.
20. Barros TA da C, Batista D de O, Torrentes de Carvalho A, Costa Faria NR da, Barreto-Vieira DF, Jacome FC, et al. Different aspects of platelet evaluation in dengue: Measurement of circulating mediators, ability to interact with the virus, the degree of activation and quantification of intraplatelet protein content. *Virus Res.* 2019 Jan;260:163–72.
21. Basílio-de-Oliveira C a, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva W a, Paes M V. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:341–7.
22. Beatty, P. Robert; Puerta-Guardo, Henry; Killingbeck, Sarah S; Glasner, Dustin R; Hopkins, Kaycie; Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* 2015;7(304):304ra141-304ra141.1.
23. Bharaj P, Chahar HS, Pandey A, Diddi K, Dar L, Guleria R, et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. *Virology.* 2008;5:1–5.
24. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496(7446):504–7.
25. Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons R V., Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP, Nisalak A, et al. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(5):804–10.
26. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010;87(2):125–48.
27. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SMO, Azeredo EL, Nogueira RMR, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008;8:1–11.

28. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8).
29. Branco MSD, Sousa DMC, Sousa DMC, Monteiro JD, Costa DMP, Almeida Junior RF, et al. Dengue in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010-2012. *Trop Med Int Heal*. 2015;20(12):1707–10.
30. Brasil P, Lupi O. Dengue infection during pregnancy and risk of preterm birth. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(9):885–6.
31. Brown MG, King CA, Sherren C, Marshall JS, Anderson R. A dominant role for Fc γ RII in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release Abstract: Dengue virus is a major mosquito-borne human pathogen with four known serotypes. The presence of antidengue virus antibody. *Cell*. 2006;80(December):1242–50.
32. Butthep P, Chanhakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(12):232–8.
33. Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol*. 2007 Apr;79(4):386–92.
34. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 1989;70(1):37–43.
35. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*. 2003 May;9(5):604–13.
36. Cardozo FTGDS, Baimukanova G, Lanteri MC, Keating SM, Moraes Ferreira F, Heitman J, et al. Serum from dengue virus-infected patients with and without plasma leakage differentially affects endothelial cells barrier function in vitro. *PLoS One*. 2017;12(6):1–17.
37. Cavalcanti LP de G, Braga DN de M, Pompeu MM de L, Lima AAB, da Silva LMA, Aguiar MG, et al. Evaluation of the world health organization 2009 classification of dengue severity in autopsied individuals, during the epidemics of 2011 and 2012 in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):658–64.
38. Chambers et al. Flavivirus Genome: Organization, Expression and replication. *Rev Microbiol*. 1990;44:649–88.
39. Chen R, Vasilakis N. Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011;3(9):1562–608.
40. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol*. 1996;70(12):8765–72.
41. Cleland BYJB, Sydney CHM, Wales NS, Bradley B, Syd CHM, London DPH, et al. VOLUME XVI JANUARY, 1918 No. 4 Dengue Fever in Attstralia. 1918;XVI(4).

42. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol*. 2006;80(23):11418–31.
43. Colombo TE, Vedovello D, Mondini A, Reis AFN, Cury AAF, Oliveira FH de, et al. Co-infecção por vírus dengue, sorotipos 1 e 4, em paciente de cidade de porte médio no Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(4):275–81.
44. Conroy AL, Gélvez M, Hawkes M, Rajwans N, Tran V, Liles WC, et al. Host biomarkers are associated with progression to dengue haemorrhagic fever: A nested case-control study. *Int J Infect Dis*. 2015;40:45–53.
45. Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Maria R, Nogueira R, Felix De Oliveira V, Tavares De Melo W, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(6):605–11.
46. Cordeiro MT. Evolução da dengue no estado de Pernambuco 1987-2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife; 2008.
47. Costa IMP, Calado DC. incidência dos casos de dengue (2007-2013) e distribuição sazonal de culicídeos (2012-2013) em Barreiras, Bahia*. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2016;25(4):735–44.
48. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2011;2(1):11–26.
49. Costa ZGA, Romano APM, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2011;2(1):11–26.
50. Crill WD, Chang GJ. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein. *Cell*. 2004;78(24):13975–86.
51. Cruz, Nadine Louise Nicolau da; Lima, Victor Fernando Santana; Silva, Edson Moura da; Ramos JV de A. Epidemiologia da dengue e sua relação com a variabilidade climatológica no município de Igarassu, Pernambuco, Brasil. 2016;(December 2015).
52. da Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. *PLoS One*. 2014;9(4):e94655.
53. Dumas RP, Passos SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, et al. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: A diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1).
54. de Bruycker-Nogueira F et al. Molecular Biology Approaches for Dengue Diagnosis and Research in Brazil: An Overview. In: BERHARDT L V., editor. *Advances in Medicine and Biology*. 97th ed. New York: Nova Biomedical; 2016. p. 1–29.
55. de Bruycker-Nogueira F, Faria NR da C, Nunes PCG, Nogueira RMR, de Filippis AMB, Dos Santos FB. First detection and molecular characterization of a DENV-1/DENV-4 co-infection during an epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Clin case reports*. 2018 Nov;6(11):2075–80.

56. de Bruycker-Nogueira F, Mir D, dos Santos FB, Bello G. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect Genet Evol.* 2016;45:454–60.
57. de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RMR, Faria NR da C, Simões JBS, Nunes PCG, de Filippis AMB, et al. Insights of the genetic diversity of DENV-1 detected in Brazil in 25years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect Genet Evol.* 2015;34:126–36.
58. de la Cruz Hernández SI, González Mateos S, Flores Aguilar H, López Martínez I, Alpuche Aranda C, Ludert JE, et al. Evaluation of a novel commercial rapid test for dengue diagnosis based on specific IgA detection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(2):150–5.
59. de Souza SS, da Silva IG, da Silva HHG. Associação entre incidência de dengue, pluviosidade e densidade larvária de *Aedes aegypti*, no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):152–5.
60. De-Oliveira-Pinto LM, Marinho CF, Pova TF, de Azeredo EL, de Souza LA, Barbosa LDR, et al. Regulation of inflammatory chemokine receptors on blood T cells associated to the circulating versus liver chemokines in dengue fever. *PLoS One.* 2012;7(7).
61. Diamond MS. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(3):196–206.
62. Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(4):584–93.
63. Dos Santos, F.B. N, M.G. C, P.C. N, A.M.B. DF, N.R. F, J.B. S, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology.* 2011;8:7–10.
64. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. 1993;90(May):4171–5.
65. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2323–30.
66. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MRT, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(11):1185–9.
67. Edwards F. Diptera.family culicidae. “Genera Insectorum.” P Wystman. 1932;
68. Erbel P, Schiering N, D’Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(4):372–3.
69. Espinosa Brito A. Fiebre hemorrágica dengue. Estudio clínico en pacientes adultos hospitalizados Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Study of Hospitalized Adult Patients. MediSur.* 2015;12(4):570–91.
70. Faria NR da C, Nogueira RMR, de Filippis AMB, Simões JBS, Nogueira F de B,

- da Rocha Queiroz Lima M, et al. Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3).
71. Faria NR da C, Solorzano VEF, De Souza LJ, Nogueira RMR, Bruycker-Nogueira F De, Chouin-Carneiro T, et al. Analysis of clinical and laboratory alterations related to dengue case severity: Comparison between serotypes 2 and 4 in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(1):137–45.
 72. Faria NR da C, Solorzano VEF, Nogueira RMR, Chouin-Carneiro T, Nune PCG, Simões JBS, et al. Dengue epidemics in two distinct periods reveal distinct epidemiological, laboratorial and clinical aspects in a same scenario: Analysis of the 2010 and 2013 epidemics in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2016;110(4):228–36.
 73. Ferraz FO, Bomfim MRQ, Totola AÔH, Ávila TV, Cisalpino D, Pessanha JEM, et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *J Clin Virol*. 2013;58(1):41–6.
 74. Ferreira RAX, de Oliveira SA, Gandini M, Ferreira L da C, Correa G, Abiraude FM, et al. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Trop*. 2015;149:138–47.
 75. Figueiredo LTM. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1643–9.
 76. Figueiredo MAA, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima JWO, Costa MCN, Morato V, et al. Allergies and diabetes as risk factors for dengue hemorrhagic fever: Results of a case control study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(6):2–7.
 77. Figueirêdo, B.C.L; Santos, J.C; Cruz, D. V; Esteves GH. Análise estatística dos casos de dengue de 2011 a 2012 na região nordeste do brasil. 2013;2012–4.
 78. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999;73(7):6104–10.
 79. Flexa, G.G; Cunha HFA. Avaliação da correlação de precipitação pluviométrica. *Rev Humanidades do Curso Ciências Sociais*. 2006.
 80. Gabriel AFB, Abe KC, Guimarães M de P, Miraglia SGEK, Gabriel AFB, Abe KC, et al. Avaliação de impacto à saúde da incidência de dengue associada à pluviosidade no município de Ribeirão Preto, São Paulo. *Cad Saúde Coletiva*. 2018;26(4):446–52.
 81. Gebhard LG, Filomatori C V., Gamarnik A V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*. 2011;3(9):1739–56.
 82. Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *J Virol*. 2010;84(20):10438–47.
 83. Graciano AR, Assis LPF de, Cozer AM, Amâncio VC, Oliveira JMR de. Dengue morbidity and mortality in elderly in Brazil. *Rev Educ em Saúde*. 2017;5(1):56–65.

84. Graham H. The dengue: A study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med L.* 1903;(6):209–214.
85. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33(1):158–65.
86. Gubler DJ. Commentary: Ashburn PM, Craig CF. experimental investigations regarding the etiology of dengue. *TT - J Infect Dis.* 2004;189(9):1744–83.
87. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever, 1996. *Epidemiol Bull.* 1996;17(4):12–4.
88. Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. *Trop Med Health.* 2011;39(4SUPPLEMENT):S3–11.
89. Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp.* 2006;(277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-253).
90. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330–42.
91. Gubler, DJ & Sather G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue.* 1988;(Rio de Janeiro, Brasil.).
92. Gubler, DJ; Trent D. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis.* 1993;2 (6):383–93.
93. Guerra-Gomes IC, Gois BM, Peixoto RF, Oliveira CA, Maciel BLL, Sarmiento MIF, et al. Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(1):19–26.
94. Gurukumar K, Priyadarshini D, Patil J, Bhagat A, Singh A, Shah P, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J.* 2009;6:1–8.
95. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Nathan MB, et al. Europe PMC Funders Group Dengue : a continuing global threat Europe PMC Funders Author Manuscripts. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 0):s7-16.
96. Halstead S. Dengue haemorrhagic fever: a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ.* 1980;58:1-21.
97. Halstead SB. Dengue and hemorrhagic fevers of Southeast Asia. *Yale J Biol Med.* 1965;37(6):434–54.
98. Hammon WM, Rudnick A SG. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science (80-).* 1960;131:1102-1103.
99. Haroon M, Jan H, Faisal S, Ali N, Kamran M, Ullah F. Dengue Outbreak in Peshawar: Clinical Features and Laboratory Markers of Dengue Virus Infection. *J Infect Public Health.* 2018.
100. Haroon M, Jan H, Faisal S, Ali N, Kamran M, Ullah F. Dengue Outbreak in Peshawar: Clinical Features and Laboratory Markers of Dengue Virus Infection. *J Infect Public Health.* 2018;

101. Heinen LB da S, Zuchi N, Cardoso BF, Santos MAM dos, Nogueira ML, Dezengrini-Slhessarenko R. Dengue Outbreak in Mato Grosso State, Midwestern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;57(6):489–96.
102. Heinz, FX; Allison S. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res*. 2003;59:63–97.
103. Her Z, Kam YW, Gan VC, Lee B, Thein TL, Tan JLL, et al. Severity of Plasma Leakage Is Associated With High Levels of Interferon γ -Inducible Protein 10, Hepatocyte Growth Factor, Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2), and MMP-9 During Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 2017;215(1):42–51.
104. Heringer M, Souza TMA, Lima M da RQ, Nunes PCG, Faria NR da C, de Bruycker-Nogueira F, et al. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: Case characterization following its introduction in an endemic region. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–9.
105. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991,8,00, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing. 1991;88(August):7276–80.
106. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J Immunol*. 2014 Aug;193(4):1864–72.
107. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2018; Acesso em 25 de novembro de 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>.
108. ICTV. International Committee of Taxonomy Viruses. 2018. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_onli.
109. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*. 1978;40:531-544.
110. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *J Infect Dis*. 2004;189(8):1411–8.
111. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS, Icrobiol JCLINM. Competing Pressures for Hr Investment.Pdf. 2005;43(10):4977–83.
112. Jones, M; Davidson, A; Hibbert, L; Gruenwald, P; Schlaak, J; Ball, S; Foster, GR; Jacobs M. Dengue Virus Inhibits Alpha Interferon Signaling by Reducing STAT2 Expression. *J Virol*. 2005;5414–5420.
113. Khan J, Ghaffar A, Khan SA. The changing epidemiological pattern of Dengue in Swat, Khyber Pakhtunkhwa. *PLoS One*. 2018;13(4):1–14.
114. Khetarpal N, Khanna I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *J Immunol Res*. 2016;2016(3).
115. Khromykh a a, Sedlak PL, Westaway EG. trans-Complementation analysis of the flavivirus Kunjin ns5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. *J Virol*. 1999;73(11):9247–55.
116. Kim S-E, Lee PW, Pokorski JK. Biologically Triggered Delivery of EGF from Polymer Fiber Patches. *ACS Macro Lett*. 2017;6(6):593–7.

117. Kimura, R, & Hotta S. Studies on Dengue Fever (VI). On the Inoculation of Dengue Virus into Mice (in Japanese). *Nippom Igaku*,. 1944;3379:629–633.
118. King, AD; Nisalak, A; Kalayanrooj, S; Myint, KS; Pattanapanyasat, K; Nimmannitya, S; Innis B. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Heal*. 1999;30(4):718-28.
119. Klungthong C, Putnak R, Mammen MP, Li T, Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*. 2008;154(1–2):175–81.
120. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*. 2004;329(1):168–79.
121. Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006;138(1–2):123–30.
122. Koraka P, Burghoorn-Maas CP, Falconar A, Setiati TE, Djamiatun K, Groen J, et al. Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4154–9.
123. Kouri, G., Mas, P., Guzman, M. G., Soler, M., Goyenechea, A., and Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: Rapid diagnosis of the etiologic agent. *Bull Pan Am Heal Organ*. 1983;17(2):126–132.
124. Kumar R. Evaluation of diagnostic tests. *Clin Epidemiol Glob Heal*. 2016;4(2):76–9.
125. Kuno G, Gomez I GD. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;36:153-159.
126. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, et al. T-cell Responses to Dengue Virus in Humans. *Trop Med Health*. 2011;39:S45–51.
127. Lalle E, Colavita F, Iannetta M, Teklè SG, Carletti F, Scorzolini L, et al. Prolonged detection of dengue virus RNA in the semen of a man returning from Thailand to Italy, January 2018. *Eurosurveillance*. 2018;23(18):2–4.
128. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G-J, Vorndamt AV. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(3):545–51.
129. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997 Sep;78 (Pt 9):2279–84.
130. Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular Evolution and Epidemiology of Dengue-3 Viruses. *Lanciotti 1994.pdf*. 2018;3(1994).
131. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight

- junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol.* 2006;87(12):3623–30.
132. Lega J, Brown HE, Barrera R. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) abundance model improved with relative humidity and precipitation-driven egg hatching. *J Med Entomol.* 2017;54(5):1375–84.
 133. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Chacon IVDE, Ramos C, et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6):4738–47.
 134. Leung D, Schroder K, White H, Fang NX, Stoermer MJ, Abbenante G, et al. Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors. *J Biol Chem.* 2001;276(49):45762–71.
 135. Lima M da RQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of Dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):1–8.
 136. Lima M da RQ. Antígeno NS1 dos Vírus Dengue: desempenho de testes disponíveis comercialmente e aplicações alternativas para o diagnóstico precoce das infecções por dengue. Tese Doutorado. 2014;
 137. Lindenbach BD, Prágai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F RC. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J Virol.* 2007;81(17):8905-18.
 138. Lindenbach, BD & Rice C. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23-61.
 139. Lizarraga KJ, Nayer A. Dengue-associated kidney disease. *J Nephropathol.* 2014;3(2):57–62.
 140. Loroño-Pino MA, Cropp CB, Farfán JA, Vorndam A V, Rodríguez-Angulo EM, Rosado-Paredes EP, et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hygiene.* 1999;61(5):725–30.
 141. Lozach, PY; Burleigh, L; Staropoli, I; Navarro-Sanchez, E; Harriague, J; Virelizier, JL; Rey, FA; Despres, P; Arenzana-Seisdedos, F; Amara A. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J Biol Chem.* 2005;280:23698-23708.
 142. Lupi O, Carneiro CG. Lupi et al, Manifestações mucocutâneas da dengue. *82(4):291–305.*
 143. MacKenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology.* 1998;245(2):203–15.
 144. Malavige G, Ogg G. Pathogenesis of severe dengue infection. *Ceylon Med J [Internet].* 2012;57(3):97. Available from: <https://cmj.sljol.info/article/10.4038/cmj.v57i3.4701/>
 145. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J.* 2004;80(948):588–601.
 146. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection.

Immunology. 2017;151(3):261–9.

147. Maroun SLC, Marliere RCC, Barcellus RC, Barbosa CN, Ramos JRM, Moreira MEL. Case report: vertical dengue infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;0(0):556–9
148. Martins VDCA, De Bastos MS, Ramasawmy R, De Figueiredo RP, Gimaque JBL, Braga WSM, et al. Clinical and virological descriptive study in the 2011 outbreak of dengue in the Amazonas, Brazil. *PLoS One*. 2014;9(6).
149. Mason PW, Zugel MU, Semproni AR, Fournier MJ, Mason TL. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *J Gen Virol*. 1990;71(9):2107–14.
150. Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Viol J*. 2012;9(1):64.
151. Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa E V., Filippis AMB, Schatzmayr HG, et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Brazilian J Med Biol Res*. 2002;35(8):869–72.
152. Miagostovich MP, Dos Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, Da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):307–13.
153. Miagostovich MP, Nogueira RMR, Dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*. 1999;14(3):183–9.
154. Miller N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther*. 2010 Feb;12(1):31–8.
155. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med*. 2015;7(304):1–10.
156. Mongkolsapaya J, Wanwisa, D; Xu, X-N; Vasanawathana, S; Anghawornchaikul, N.T; Chairunsri, A; Sawasdivorn, O; Duangchinda IT, 1, T, ao Dong, Rowland-Jones S, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9(7):921–7.
157. Montenegro D, Lacerda HR, Lira TM, Correia De Oliveira DS, Fonseca De Lima AA, Bezerra Guimarães MJ, et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):9–13.
158. Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2107–10.
159. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13–22.
160. Muller DA, Depelseñaire ACI, Young PR. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl 2):S89–95.

161. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(24):14333–8.
162. Nascimento LB do, Oliveira P dos S, Magalhães D de P, França DD da S, Magalhães ALÁ, Silva JB, et al. Caracterização dos casos suspeitos de dengue internados na capital do estado de Goiás em 2013: período de grande epidemia. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2015;24(3):475–84.
163. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Vaughn DW. Serotype-Specific Dengue Virus Circulation and Dengue Disease in Bangkok , Thailand From 1973 To 1999. *J Trop Med.* 2003;68(2):191–202.
164. Nogueira MB, Stella V, Bordignon J, Batista WC, De Borba L, Da Silva LHP, et al. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(5):483–8.
165. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. Vol. 83, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1988. p. 219–25.
166. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SMO, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: Co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect.* 1993;111(1):163–70.
167. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Dos Santos FB, De Araújo ESM, De Filippis AMB, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(3):297–304.
168. Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos HB, Barbosa D, Medeiros DA, Pereira C, et al. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(11):2010–1.
169. Nunes PCG, de Filippis AMB, Lima MQ da R, Faria NR da C, de Bruycker-Nogueira F, Santos JB, et al. 30 years of dengue fatal cases in Brazil: A laboratorial-based investigation of 1047 cases. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1–13.
170. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother Off J Japan Soc Chemother.* 2007 Jun;13(3):125–33.
171. Oliveira ECL De, Pontes ERJC, Cunha RV Da, Fróes IB, Nascimento D Do. Hematological abnormalities in patients with dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):682–5.
172. Oliveira R de MAB, Araújo FM de C, Cavalcanti LP de G. Aspectos entomológicos e epidemiológicos das epidemias de dengue em Fortaleza, Ceará, 2001-2012*. *Epidemiol e Serviços Saúde.* 2018;27(1):1–10.
173. Oliveira RA dos S, Cordeiro MT, Moura PMMF de, Baptista Filho PNB, Braganeto U de M, Marques ET de A, et al. Serum cytokine/chemokine profiles in patients with dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (FHD) by using protein array. *J Clin Virol.* 2017;89:39–45.
174. Oliveira, M.F; Araújo, J.M.G; Ferreira OC., Lima, D.F; Santos, D.B; Barreto, F.

- G; Schatzmayr, H; Nogueira A.t; Ribeiro RM. Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(3):575–6.
175. Osanai CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto De Dengue Em Boa Vista, Roraima. *Nota Previa. Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983;25(1):53–4.
 176. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira ACM, Nuovo GJ, Pinhão ÂT, Mota EM, et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Investig.* 2009;89(10):1140–51.
 177. PAHO (Pan American Health Organization). Reported Cases of Dengue Fever in the Americas. 2018.
 178. Panakitsuwan S, Yoshihara N, Hashimoto N, Miyamura K, Chotpitayasunondh T. Early diagnosis of vertical HIV infection in infants by rapid detection of immune complex-dissociated HIV p24 antigen. *AIDS Patient Care STDS.* 1997 Dec;11(6):429–33.
 179. Paranaivitane SA, Gomes L, Kamaladasa A, Adikari TN, Wickramasinghe N, Jeewandara C, et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1):1–7.
 180. Patro ARK, Mohanty S, Prusty BK, Singh DK, Gaikwad S, Saswat T, et al. Cytokine signature associated with disease severity in dengue. *Viruses.* 2019;11(1):1–12.
 181. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S30-8.
 182. Phuong HL, Thai KTD, Nga TTT, Giao PT, Hung LQ, Binh TQ, et al. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;63(4):372–8.
 183. Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity.* 2007 Sep;27(3):370–83.
 184. Pinheiro F, Nelson M. Re-Emergence of Dengue and Emergence of Dengue Haemorrhagic Fever in the Americas. *Dengue Bull.* 1997;21:16–24.
 185. Pinheiro, F. P. & Chuit R. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. *Infect Med.* 1998;15:244-251.
 186. Pinheiro, FP; Corber S. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *WHO Stat quartely.* 1997;50:161–9.
 187. Pinheiro, FP; Corber S. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever and its emergence in the Americas. *WHO Stat quartely.* 1997;50:161–9.
 188. Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, et al. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2010 Feb;65(2):107–18.
 189. Quirine A, Clapham HE, Lambrechts L, Duong V, Buchy P, Althouse BM, et al. Contributions from the silent majority dominate dengue virus transmission. 2018;82–6.
 190. Ramalho ILC, Araújo FM de C, Cavalcanti LP de G, Braga DNM, Perdigão

- ACB, Santos FB Dos, et al. Dengue 4 in Ceará, Brazil: characterisation of epidemiological and laboratorial aspects and causes of death during the first epidemic in the state. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(11):e180320.
191. Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, et al. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. *PLoS One*. 2012;7(12):1–10.
 192. Remy MM. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflamm allergy drug targets*. 2014;13:26274.
 193. Rice, CM; Lenches, EM; Eddy, SR; Shin, SJ; Sheets, RL; Strauss J. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science (80-)*. 1985;229: 726-733.
 194. Rice, JA; Isakova, L; Zelckovich, R; Frid E. Capitation and integrated health care systems. *J Heal Adm Educ*. 1996;14(2):205-37.
 195. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:315-41.
 196. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479–93.
 197. Rigau-Perez JG, Ayala-Lopez A, Garcia-Rivera EJ, Hudson SM, Vorndam V, Reiter P, et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Oct;67(4):355–62.
 198. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam A V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet (London, England)*. 1998 Sep;352(9132):971–7.
 199. Rocco IM, Barbosa ML, Kanomata EH. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40(3):151–4.
 200. Rodenhuis-Zybert IA, Van Der Schaar HM, Da Silva Voorham JM, Van Der Ende-Metselaar H, Lei HY, Wilschut J, et al. Immature dengue virus: A veiled pathogen? *PLoS Pathog*. 2010;6(1).
 201. Rosen L. Chain Reaction in the Liver and Lymphoid Organs But Not in the. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(5):720–4.
 202. Rothman AL. Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532–43.
 203. Rothman AL. Preface. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;338(1).
 204. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in aedes aegypti mosquito competence for zika virus transmission. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(4):625–32.
 205. Sabin A. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952;1:30–50.
 206. Salles TS, Da Encarnação Sá-Guimarães T, De Alvarenga ESL, Guimarães-Ribeiro V, De Meneses MDF, De Castro-Salles PF, et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–12.

207. San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(1):128–35.
208. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. Vol. 81, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1986. p. 245–6.
209. Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schmitz H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J Clin Virol.* 2004;31(3):179–84.
210. Sekaran SD, Soe HJ. Issues in contemporary and potential future molecular diagnostics for dengue. *Expert Rev Mol Diagn [Internet].* 2017;17(3):217–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14737159.2017.1275963>
211. SES/PE. Perfil Socioeconômico , Demográfico e Epidemiológico de Pernambuco. 2013.
212. SES/PE. Perfil Socioeconômico, Demográfico e Epidemiológico: Pernambuco 2016. 2016.
213. Shamim MN, S.Z.G. Dengue fever associated with acute scrotal oedema: Two case reports. *J Pak Med Assoc.* 2011;61(6):601–3.
214. Sharma A, Bruce KL, Chen B, Gyoneva S, Behrens SH, Bommarius AS, et al. Contributions of the prion protein sequence, strain, and environment to the species barrier. *J Biol Chem.* 2016;291(3):1277–88.
215. Siler, J; Hal, M; Hitchens A. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philipp J Sci.* 1926;29:1-302.
216. Silva AM da. Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.; 2013.
217. Simmons, JS; St John, JH; Reynolds F. Experimental studies of dengue. *Philipp J Sci.* 1931;44: 1-247.
218. SINAN: acesso em 20 de dezembro de 2018. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>.
219. Solorzano VEF. Estudo dos mediadores inflamatórios e de coagulação na epidemia 2013 pelo DENV-4. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. 2014.
220. Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):261–76.
221. Srikiatkachorn, A; Green S. Markers of dengue disease severity. *Current topics in microbiology and immunology.* 2010;338:67–82.
222. St. John AL, Abraham SN, Gubler DJ. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(6):420–6.
223. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.*

1992;122(2):281–8.

224. Sutherland MR, Simon AY, Serrano K, Schubert P, Acker JP, Pryzdial ELG. Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units. *Transfusion*. 2016;56(5):1129–37.
225. SVS/MS S de V em saúde. MDS-. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016 [Internet]. Casos de dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2016. 2017. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue/situacao-epidemiologica-dados>
226. SVS/MS S de V em saúde. MDS-. Portal da Saúde [Internet]. Informações de Saúde. Doenças e agravos de notificação - De 2007 em diante (SINAN). 2018 [cited 2018 Dec 15]. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>
227. SVS/MS S de V em SM da S. Dengue diagnóstico e manejo clínico. Adulto e criança. [Internet]. Vol. 3 edição, SVS/MS, Secretaria de Vigilância em Saúde; Ministério da Saúde. 2016. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/web_dengue_crian_25_01.pdf
228. SVS/MS S de V em SM da S. Doenças infecciosas e parasitárias. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2010;33(4):286–286. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651991000400018&lng=pt&tlng=pt
229. SVS/MS S de V em SM da saúde. Situação Epidemiológica/Dados [Internet]. Boletim epidemiológico. 2018. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue/situacao-epidemiologica-dados>
230. Techapichetvanich T, Wanitphakdeedecha R, lamphonrat T, Phothonng W, Eimpunth S, Jane Hidajat I, et al. The effects of recombinant human epidermal growth factor containing ointment on wound healing and post inflammatory hyperpigmentation prevention after fractional ablative skin resurfacing: A split-face randomized controlled study. *J Cosmet Dermatol*. 2018 Oct;17(5):756–61.
231. Teixeira MG, Costa MDCN, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Rev Lit Arts Am*. 2009;25(1):S7–18.
232. Temporão, J.G; Penna, G. O; Carmo, E.H;Coelho, G.E;Azevedo, R.S.S;Nunes, M.R.T; Vasconcelos PF c. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *J Zoo Wildl Med*. 2009;40(1):152–9.
233. ten Bosch QA, Clapham HE, Lambrechts L, Duong V, Buchy P, Althouse BM, et al. Contributions from the silent majority dominate dengue virus transmission. *PLoS Pathog*. 2018 May;14(5):e1006965.
234. Tesh. a Method for the Isolation and Identification Cell Cultures * of Using. *Cultures*. 1979;28(6):1053–9.
235. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(1):16–32.
236. Tittarelli E, Mistchenko AS, Barrero PR. Dengue virus 1 in buenos aires from 1999 to 2010: Towards local spread. *PLoS One*. 2014;9(10).

237. Toledo J, George L, Martinez E, Lazaro A, Han WW, Coelho GE, et al. Relevance of Non-communicable Comorbidities for the Development of the Severe Forms of Dengue: A Systematic Literature Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–18.
238. Tomlinson S, Malmstrom R, Watowich S. New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors. *Infect Disord - Drug Targets*. 2009;9(3):327–43.
239. Trent DW, Lanciotti RS, Gubler DJ. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol [Internet]*. 1997;78(9):2279–84.
240. Troisi CL, Hollinger FB. Detection of antibodies to hepatitis C virus in seronegative patients using an immune complex dissociation assay. *J Viral Hepat*. 1997;4(6):383–6.
241. Tukasan C, Furlan NB, Estofolete CF, Nogueira ML, da Silva NS. Evaluation of the importance of fever with respect to dengue prognosis according to the 2009 WHO classification: A retrospective study. *BMC Infect Dis [Internet]*. 2017;17(1):6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-2128-4>
242. Tumieto GL. Vigilância Laboratorial da Dengue no Rio Grande do Sul, no período de 2007 a 2013 . 2014.
243. Tumieto GL. Vigilância Laboratorial da Dengue no Rio Grande do Sul, no período de 2007 a 2013 . 2014.
244. Twiddy SS, Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol*. 2003;84(2):429–40.
245. Viana DV, Ignotti E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Rev Bras Epidemiol*. 2013;16(2):240–56.
246. Villabona-Arenas CJ, de Zanotto PMA. Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. *PLoS One*. 2013;8(5).
247. Voraphani N, Theamboonlers A, Khongphatthanayothin A, Srisai C, Poovorawan Y. Increased level of hepatocyte growth factor in children with dengue virus infection. *Ann Trop Paediatr*. 2010;30(3):213–8.
248. Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(4):1–9.
249. Walimbe AM, Lotankar M, Cecilia D, Cherian SS. Global phylogeography of Dengue type 1 and 2 viruses reveals the role of India. *Infect Genet Evol*. 2014;22:30–9.
250. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ WS. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227–3234.
251. Watterson D, Modhiran N, Young PR. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. *Antiviral Res [Internet]*. 2016;130:7–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.02.014>
252. Weaver SC and VN. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infect Genet Evol*. 2013;2009(4):523–40.

253. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol.* 2001 Jul;64(3):312–9.
254. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, et al. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):365–75.
255. Werneck GL, Macias AE, Mascarenas C, Coudeville L, Morley D, Recamier V, et al. Comorbidities increase in-hospital mortality in dengue patients in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(8):1–5.
256. WHO. New edition 2009. *Dengue Guidel* [Internet]. 2009;409(3):160. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
257. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG FS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000;6:816-820.
258. Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang Y Di, Hao W, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2872–8.
259. Ying H-Z, Chen Q, Zhang W-Y, Zhang H-H, Ma Y, Zhang S-Z, et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Mol Med Rep.* 2017 Dec;16(6):7879–89.
260. Yoshimura, T.; Leonard EJ. Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). In: Westwick, J.; Lindley, I.J.D.; Kunkel SL, editor. *Chemotactic Cytokines.* 305th ed. Springer, Boston, MA; 1991.
261. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1053–7.
262. Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik L V. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 2010;6(10).
263. Zeidler JD, Fernandes-Siqueira LO, Barbosa GM, Da Poian AT. Non-canonical roles of dengue virus non-structural proteins. *Viruses.* 2017;9(3).
264. Zhang X-A, Guo C-T, Lu Q-B, Hu J-G, Cui N, Yang Z-D, et al. The platelet derived growth factor-B polymorphism is associated with risk of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Chinese individuals. *Oncotarget.* 2016 May;7(22):33340–9.
265. Zhao L, Huang X, Hong W, Qiu S, Wang J, Yu L, et al. Slow resolution of inflammation in severe adult dengue patients. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):1–9.

9. ANEXOS

9.1: Ficha de acompanhamento clínico

248 FORMULÁRIO DE PESQUISA: "POLIMORFISMO DO GENE MBL2 COMO MARCADOR PROGNÓSTICO NO DENGUE"

Nº: 248 Data: 25/06/2010 Nº prontuário: [redacted] amb-1 enf-2 emerg-3 idade 44 a m Sexo: m-1

Nome: [redacted] Endereço: [redacted] Fones: [redacted]

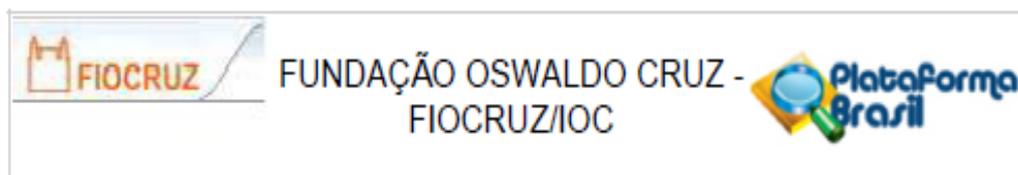
Histó: 1º de dengue: sim-1 Outd: não-2 Nº de casos pert e domiciliares: [redacted] Doenças crônicas: HAS-1 DM-2 Outros-3

Obse: [redacted]

Sinal/Sintomas	Duração (dias/horas)	29 dia	31 dia	41 dia	51 dia	61 dia	71 dia	81 dia	91 dia	101 dia	111 dia
Febre: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9	2d	2	2	2	2	não	2				
Cefaléia: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	não	2				
Dor retroorbital: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	não	2				
Náusea/vômitos: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	não	2				
Diarréia: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	medica	2				
Dor abdominal: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9	5d	2	2	2	2		2				
Exames e testes:	Aguaço, paltárol + cdt + de leucócitos	E.F.	E.F.								
FC: 79		-	84	81	80	-	-				
FR: 19		-	21	18	20	-	-				
TC: 36°C		35,7°C	3,3°C	3,3°C	3,5°C	3,5°C	-				
P.A.: 11x60		90x60	100x60	90x90	130x10	130x90	-				
Dor abdominal: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	2	2				
Hidratação: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	2	2				
Consciente: <input checked="" type="checkbox"/> sim-1 não-2 NI-9		2	2	2	2	2	2				
Prova de laço: (+)1 (-)2											
L. hemorrágicas: petéquias-1 Dequimoses-2 Não-3											
Sangramentos: gástrico-1 nasal-2 enteral-3 meial-4		4	4								
Exames Complementares:		E.C.	E.C.								
Leucócitos totais 1070		7190	6330	5560	6910	-	-				
Plaquetas 21000		24000	23000	65000	109000	-	-				
Hematócrito 31,2		29,2	28,6	29,7	30,4	-	-				
Outros:											
LUSG abdome - Derrame cavitário: sim-1 não-2 NI-9											
RX de tórax - Derrame pleural: sim-1 não-2 NI-9											
Tratamento:		2	2	2	2	2					
Hidratação reparação-1 Hidratação manutenção-2											
TRG-3 Transfusão de Plaquetas-4 UTI-5											
Chetiva da MBL - 3ª DIA											
Serologia: (+)1 (-)2 Titulação: IgG IgM											
Sorotipo Vírus: DEN 1 DEN 2 DEN 3 DEN 4 T3 T4 T5H											
Diagnóstico: DC, DCV2, DH-3 Não Def-4 Não Caso-5											

DCCH -> DENGUE COM COMPLICAÇÕES DCV DCVA Hemograma/acompanhamento

9.2: Parecer Consubstanciado do conselho de ética.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo imunológico e genético durante a febre do dengue

Pesquisador: Claire Fernandes Kubelka

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13318113.7.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 495.688

Data da Relatoria: 16/12/2013

Apresentação do Projeto:

Os autores pretendem estudar mecanismos fisiopatológicos da dengue, mais especificadamente, fatores imunológicos e genéticos relevantes à regulação da resposta antiviral e à patogênese da doença. No objetivo primário é descrito que o estudo reúne duas vertentes. Entretanto, são identificáveis três grandes estudos que se complementam.

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

O primeiro estudo é de caso-controle, considerando casos pacientes com manifestações clínicas indicadoras de gravidade (manifestações neurológicas e/ou co-morbidades) e controles pacientes sem estes sintomas. Os voluntários serão recrutados de bancos de dados dos centros participantes da pesquisa (UFMS e UPE) semelhante ao realizado pelo centro do RJ. Pretende-se determinar o perfil de citocinas e o perfil genético a fim de identificar biomarcadores específicos de gravidade através da correlação entre polimorfismo no gene e regulação da proteína como marcador de gravidade.

O segundo estudo é longitudinal, avaliando voluntários jovens na fase aguda da doença. Amostras de voluntários na fase aguda da doença serão processadas imediatamente ou estocadas nas instituições participantes do estudo, a fim de comparar a resposta imunológica de fase aguda com