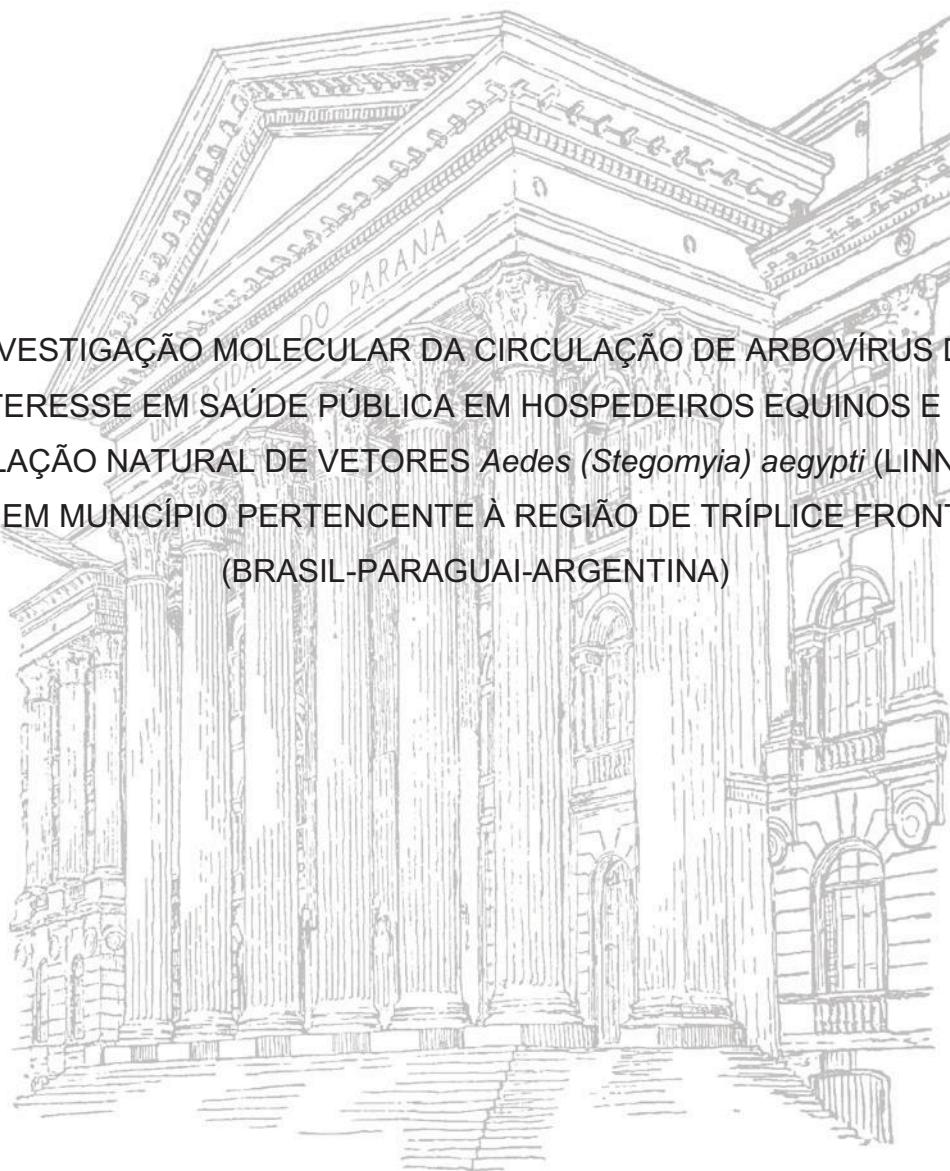


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CARNEIRO DA ROCHA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA CIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA EM HOSPEDEIROS EQUINOS E EM POPULAÇÃO NATURAL DE VETORES *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM MUNICÍPIO PERTENCENTE À REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA (BRASIL-PARAGUAI-ARGENTINA)



CURITIBA

2018

TATIANA CARNEIRO DA ROCHA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DA CIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS DE
INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA EM HOSPEDEIROS EQUINOS E EM
POPULAÇÃO NATURAL DE VETORES *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS,
1762) EM MUNICÍPIO PERTENCENTE À REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA
(BRASIL-PARAGUAI-ARGENTINA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Carneiro
Coorientador: Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda

CURITIBA

2018

Rocha, Tatiana Carneiro da

Investigação molecular da circulação de arbovírus de interesse em saúde pública em hospedeiros equinos e em população natural de vetores *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em município pertencente à região de triplíce fronteira (Brasil-Paraguai-Argentina) / Tatiana Carneiro da Rocha – Curitiba, 2018.

128 f. : (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro

Coorientador: Professor Dr. Walfrido Kühn Svoboda

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui referências

1. Doenças infecciosas emergentes. 2. *Alphavirus*. 3. *Flavivirus*. 4. Dengue. 5. RT-PCR. I. Carneiro, Eliane. II. Svoboda, Walfrido Kühn. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.9185




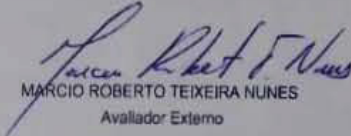
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

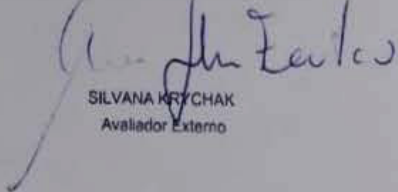
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TATIANA CARNEIRO DA ROCHA** intitulada: **INVESTIGAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA EM HOSPEDEIROS EQUINOS E EM POPULAÇÃO NATURAL DE VETORES *Aedes (Stegomyia) aegypti* (LINNAEUS, 1762) EM MUNICÍPIO PERTENCENTE À REGIÃO DE TRÍPLICE FRONTEIRA (BRASIL-PARAGUAI-ARGENTINA)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

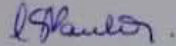
Curitiba, 17 de Agosto de 2018.


ELIANE CARNEIRO GOMES
Presidente da Banca Examinadora


MARCIO ROBERTO TEIXEIRA NUNES
Avaliador Externo


SILVANA KSYCHAK
Avaliador Externo


YANNA DANTAS RATTMANN
Avaliador Externo


CRISTIANE DA SILVA PAULA DE OLIVEIRA
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho durante toda esta jornada.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Eliane Carneiro e Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda, pelo incentivo, orientações, sugestões e apoio.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Navarro-Silva, responsável pelo Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Chironomidae e Culicidae (LAMFIC²) da Universidade Federal do Paraná, pelo acolhimento, por permitir a execução da parte experimental deste trabalho e por todas suas valiosas contribuições ao longo desses anos.

A todos os companheiros e amigos do LAMFIC² da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Vinicius Richardi, Thalita Vieira, Camila Santos, Emily Nentwig, Mariana Perez e Alessandro Cordeiro pela valiosa troca de experiências e também pelos divertidos momentos que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira, a Dra. Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira, ao Prof. Alexander Welker Biondo e ao Prof. Ivan Roque de Barros Filho do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná pela parceria e contribuição com amostras de equinos.

A equipe do Centro de Controle de Zoonoses de Foz do Iguaçu-PR, especialmente ao MSc. André de Souza Leandro e ao André Brito pela parceria, incentivo e contribuição com amostras de vetores.

Ao MSc. Robson Michael Delai e ao Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira de Foz do Iguaçu-PR pela colaboração, parceria e troca de experiências e ao GT-Itaipu Saúde (Parque Tecnológico Itaipu - Brasil) pela colaboração, incentivo e financiamento.

A Dra. Livia Carício Martins do Instituto Evandro Chagas pela concessão dos controles positivos.

A todos os professores e amigos queridos do Laboratório de Saúde Pública e Ambiental da Universidade Federal do Paraná, especialmente a Beatriz Böger e a Renata Szpack pela troca de experiências, palavras de incentivo e apoio.

A bolsa de estudos concedida pela CAPES.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, aos coordenadores e demais professores.

Ao meu esposo Maycon pelo incentivo, apoio, companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis.

A minha irmã Fernanda e aos meus pais Lelia e Carlos pelo apoio incondicional, palavras de incentivo e companheirismo.

Aos amigos e familiares que me incentivaram.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos.”

(Marcel Proust)

RESUMO

Os arbovírus são vírus que são transmitidos entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por meio de vetores artrópodes hematófagos. Os artrópodes hematófagos são caracterizados como vetores e reservatórios de arbovírus, enquanto que os hospedeiros vertebrados são, na sua maioria, denominados hospedeiros de amplificação e dispersão. Os seres humanos podem atuar tanto como hospedeiros de amplificação e dispersão de arbovírus como hospedeiros acidentais. Nas últimas décadas, os arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* têm se tornado importantes problemas de saúde pública por serem responsáveis por causar surtos e epidemias na população humana e por apresentarem potencial zoonótico. Ações de vigilância ativa tanto em animais vertebrados, que são considerados “sentinelas” naturais, quanto em vetores podem contribuir para a detecção precoce da circulação de arbovírus, permitindo que ações preventivas por parte das autoridades de saúde pública sejam tomadas. O objetivo deste trabalho foi investigar a circulação de arbovírus de interesse em saúde pública (*Alphavirus* e *Flavivirus*) em hospedeiros equinos e em população natural de vetores *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) no município de Foz do Iguaçu-PR, pertencente à região de Tríplice Fronteira (Brasil-Paraguai-Argentina). Para isto, amostras de soro de 117 equinos e 75 pools de fêmeas de *Aedes aegypti* (n=428 mosquitos) foram submetidos a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase gênero específica. As amostras positivas na etapa de *screening* tiveram outros dois genes sequenciados integral ou parcialmente para a realização de análises filogenéticas. Todas as amostras de equinos se mostraram negativas para a presença de *Alphavirus* e *Flavivirus*. Foram encontrados dois pools (2,67%) positivos para *Flavivirus*. O *Flavivirus* foi identificado como vírus Dengue sorotipo 1, genótipo V nos dois casos. Pelas análises filogenéticas dos genes NS5, CprM e Envelope foi possível observar que as cepas isoladas neste estudo estão mais proximamente relacionadas com cepas que circulam no Brasil do que com cepas paraguaias ou argentinas. Além disso, observou-se a ocorrência de duas linhagens do vírus Dengue sorotipo 1 genótipo V no município de Foz do Iguaçu-PR, das três linhagens circulantes no país e no estado do Paraná. As cepas isoladas no presente estudo apresentaram pouca ou nenhuma diferença nucleotídica para os genes analisados. Um dos pools positivos apresentou duas substituições aminoacídicas não sinônimas com alteração de caráter bioquímico do aminoácido envolvido (uma no gene NS5 e uma no gene CprM). Outro pool positivo apresentou duas substituições aminoacídicas não sinônimas sem alteração de caráter bioquímico do aminoácido no gene CprM. Os valores de taxa de mudanças evolutivas encontrados para os genes Envelope e NS5 foram bastante parecidos e próximos a valores descritos na literatura. O município de Foz do Iguaçu-PR é considerado área de risco para a emergência e/ou reemergência de arbovírus, tornando a região vulnerável para a introdução de novos arbovírus e/ou novas linhagens. Sendo assim, informações sobre a ocorrência natural desses vírus são de fundamental importância para os serviços de saúde pública, além de terem o potencial de reduzir os impactos negativos sobre as principais atividades econômicas desta região de fronteira.

Palavras-chave: Doenças infecciosas emergentes. *Alphavirus*. *Flavivirus*. Dengue. RT-PCR.

ABSTRACT

Arboviruses are viruses that are transmitted between susceptible vertebrate hosts by hematophagous arthropod vectors. Hematophagous arthropods are characterized as arbovirus vectors and reservoirs, while vertebrate hosts are mostly referred to as arbovirus amplification and dispersion hosts. Humans may act as both arbovirus amplification and dispersion hosts as incidental hosts. In the last decades, arboviruses belonging to the *Alphavirus* and *Flavivirus* genera have become important public health concern because they are responsible for causing outbreaks and epidemics in human population and because they present zoonotic potential. Active surveillance actions in both vertebrate animals, that are considered natural "sentinels", and vectors can contribute to the early detection of the arbovirus circulation. This information may contribute to the preventive actions by public health authorities. The objective of the present study was to investigate the circulation of arboviruses of public health interest (*Alphavirus* and *Flavivirus*) in equine hosts and in a natural population of *Aedes (Stegomyia)aegypti* (Linnaeus, 1762) vectors in the city of Foz do Iguaçu-PR, belonging to a Triple Frontier region (Brazil-Paraguay-Argentina). Equine serum samples (n=117) and 75 pools of *Aedes aegypti* females (n=428 mosquitoes) were submitted to reverse transcription reaction followed by the specific genomic polymerase chain reaction genus-specific. The positive samples in the screening phase had two other genes sequenced integrally or partially for phylogenetic analysis. All equine samples were negative for the presence of *Alphavirus* and *Flavivirus*. Two pools (2.67%) were positive for *Flavivirus*. The *Flavivirus* was identified as Dengue virus serotype 1, genotype V in both samples. The phylogenetic analyzes of the NS5, CprM and Envelope genes showed that the strains isolated in this study are more closely related to strains circulating in Brazil than to Paraguayan or Argentine strains. In addition, two lineages of Dengue virus serotype 1 genotype V were observed in Foz do Iguaçu-PR, from the three lineages circulating in Brazil and in the state of Paraná. The strains isolated in the present study showed little or no nucleotide difference for the genes analyzed. One of the positive pools had two non-synonymous amino acid substitutions with biochemical alteration of the involved amino acid (one in the NS5 gene and one in the CprM gene). The other positive pool had two non-synonymous amino acid substitutions with no biochemical alteration of the amino acid in the CprM gene. The values of the evolutionary changes rate observed for the Envelope and NS5 genes were very similar and close to values described in the literature. The city of Foz do Iguaçu-PR is considered a high-risk area for the emergence and/or reemergence of arboviruses, making the region vulnerable to the introduction of new arboviruses and/or new strains. Thus, information on the natural occurrence of these viruses have fundamental importance to the public health services, as well as having the potential to reduce the negative impacts on the main economic activities of this Triple Border region.

Keywords: Emerging infectious diseases. *Alphavirus*. *Flavivirus*. Dengue. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS <i>Alphavirus</i>	29
FIGURA 2	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS <i>Flavivirus</i>	35
FIGURA 3	– CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA.....	40
FIGURA 4	– LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, BRASIL	53
FIGURA 5	– ARMADILHA ADULTRAP® UTILIZADA PARA CAPTURA DAS FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i>	55
FIGURA 6	– BASE TERRITORIAL DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, DIVISÃO EM ESTRATOS E ÁREAS	56
FIGURA 7	– BASE TERRITORIAL DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, DISTRIBUIÇÃO DAS 3.476 ARMADILHAS ADULTRAP® PELO MUNICÍPIO	57
FIGURA 8	– CAPTURADOR MANUAL DE CASTRO	58
FIGURA 9	– VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-15) DE POOLS DE <i>Aedes aegypti</i> PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR.....	72
FIGURA 10	– VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (47-61) DE POOLS DE <i>Aedes aegypti</i> PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR.....	72
FIGURA 11	– IDENTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR ONDE ESTAVAM LOCALIZADAS AS ARMADILHAS QUE CAPTURARAM FÊMEAS DE <i>Aedes aegypti</i> POSITIVAS PARA PRESENÇA DO GENOMA DE <i>Flavivirus</i> NO ANO DE 2016	73
FIGURA 12	– FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016	75

FIGURA 13 – FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016	76
FIGURA 14 – FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	77
FIGURA 15 – FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA CONCATENADA DOS GENES NS5, CprM E ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	78
FIGURA 16 – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE NS5, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V.....	83
FIGURA 17 – INDICAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE NS5, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V.....	84
FIGURA 18 – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE CprM, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V.....	86
FIGURA 19 – INDICAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE CprM, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V.....	87
FIGURA 20 – PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE ENVELOPE, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V.....	89
FIGURA 21 – INDICAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE ENVELOPE, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– SEQUÊNCIAS DOS PARES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA ETAPA DE <i>SCREENING</i> DA PRESENÇA DO GENOMA DE <i>Alphavirus</i> E <i>Flavivirus</i> NAS AMOSTRAS DE EQUINOS E VETORES OBTIDAS EM FOZ DO IGUAÇU-PR.....	60
TABELA 2	– INFORMAÇÕES DOS <i>POOLS</i> DE <i>Aedes aegypti</i> POSITIVOS PARA A PRESENÇA DO GENOMA DE <i>Flavivirus</i> OBTIDOS EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	72
TABELA 3	– NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO <i>GENBANK</i> REFERENTES AOS GENES NS5, CprM E ENVELOPE OBTIDAS DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	74
TABELA 4	– DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	82
TABELA 5	– DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	85
TABELA 6	– DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	89
TABELA 7	– TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	92
TABELA 8	– TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	93
TABELA 9	– TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACMR	– Ancestral Comum Mais Recente
AIC	– <i>Akaike Information Criterion</i>
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Arbovírus	– <i>Arthropod-borne virus</i>
BEAST	– <i>Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees</i>
BEAUti	– <i>Bayesian Evolutionary Analysis Utility</i>
BLAST	– <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCZ	– Centro de Controle de Zoonoses
cDNA	– Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CprM	– Junção do Capsídeo Pré-Membrana
CTAI	– Comitê Técnico Assessor de Imunizações
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	– Desoxinucleotídeo Trifosfato
DTT	– Ditioneitol
EUA	– Estados Unidos da América
FA	– Febre Amarela
HCl	– Ácido clorídrico
HPD	– <i>Highest Posterior Density</i>
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	– <i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
kb	– quilobase
KCl	– Cloreto de potássio
km ²	– quilômetro quadrado
LAMFIC ²	– Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
m	– metro
M	– Membrana
μ	– micro
mA	– miliAmpère
MCC	– <i>Maximum Clade Credibility</i>
MCMC	– <i>Markov Chain Monte Carlo</i>
MEGA	– <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio

min	– minuto
mL	– mililitro
mm	– milímetro
mM	– milimolar
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	– nanograma
nm	– nanômetro
nº	– número
NS	– Proteína não estrutural
NS1	– Proteína não estrutural 1
NS5	– Proteína não estrutural 5
OMS	– Organização Mundial de Saúde
OPAS	– Organização Pan-Americana de Saúde
PAHO	– <i>Pan American Health Organization</i>
pb	– Pares de base
PBS	– <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
pH	– Potencial hidrogeniônico
pmol	– picomol
PNH	– Primatas Não Humanos
PR	– Paraná
®	– Marca registrada
RNA	– Ácido Ribonucleico
rpm	– Rotações por minuto
RT-PCR	– Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
s	– segundo
SE	– Semana Epidemiológica
SUS	– Sistema Único de Saúde
™	– <i>Trade mark</i>
Tris	– Hidroximetil aminometano
U	– Unidades
UV	– Ultravioleta
V	– volts

v.	– Versão
VCHIK	– Vírus <i>Chikungunya</i>
VDEN	– Vírus <i>Dengue</i>
VDEN-1	– Vírus <i>Dengue</i> sorotipo 1
VDEN-2	– Vírus <i>Dengue</i> sorotipo 2
VDEN-3	– Vírus <i>Dengue</i> sorotipo 3
VDEN-4	– Vírus <i>Dengue</i> sorotipo 4
VEEL	– Vírus da <i>Encefalite Equina do Leste</i>
VEE	– Vírus da <i>Encefalite Equina do Oeste</i>
VEEV	– Vírus da <i>Encefalite Equina Venezuelana</i>
VFA	– Vírus da <i>Febre Amarela</i>
VFNO	– Vírus da <i>Febre do Nilo Ocidental</i>
VMAY	– Vírus <i>Mayaro</i>
VZIK	– Vírus <i>Zika</i>
WHO	– <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	ARBOVIRUS	18
2.2	DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES.	20
2.3	VIGILÂNCIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM ANIMAIS SENTINELA.	22
2.4	VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA	24
2.5	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	26
2.6	<i>Alphavirus</i>	28
2.6.1	Principais <i>Alphavirus</i> circulantes no Brasil	29
2.6.1.1	Vírus <i>Chikungunya</i>	29
2.6.1.2	Vírus <i>Mayaro</i>	31
2.6.1.3	Vírus da <i>Encefalite Equina do Leste</i>	32
2.6.1.4	Vírus da <i>Encefalite Equina do Oeste</i>	33
2.6.1.5	Vírus da <i>Encefalite Equina Venezuelana</i>	34
2.7	<i>Flavivirus</i>	35
2.7.1	Principais <i>Flavivirus</i> circulantes no Brasil.....	36
2.7.1.1	Vírus <i>Dengue</i>	36
2.7.1.2	Vírus da <i>Febre Amarela</i>	39
2.7.1.3	Vírus <i>Zika</i>	41
2.7.1.4	Vírus da <i>Febre do Nilo Ocidental</i>	43
2.7.1.5	Vírus da <i>Encefalite Saint Louis</i>	45
2.7.1.6	Vírus <i>Rocio</i>	45
2.8	MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR.....	46
3	JUSTIFICATIVA	49
4	OBJETIVOS	51
4.1	OBJETIVO GERAL.....	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5	METODOLOGIA	52
5.1	LOCAL DE ESTUDO	52
5.2	AMOSTRAS DE SORO DE EQUINOS	53
5.3	AMOSTRAS DE VETORES	54
5.4	ANÁLISES LABORATORIAIS	58

5.4.1	Preparação das amostras de soro de equinos	58
5.4.2	Preparação das amostras de vetores.....	58
5.4.3	Extração do RNA viral	59
5.4.4	<i>Primers</i> utilizados para amplificação do genoma de <i>Alphavirus</i> e <i>Flavivirus</i>	60
5.4.5	Protocolos de RT-PCR utilizados	61
5.4.5.1	Protocolo de RT-PCR utilizado para amplificação de genoma de arbovírus do gênero <i>Alphavirus</i>	61
5.4.5.2	Protocolo de RT-PCR utilizado para amplificação de genoma de arbovírus do gênero <i>Flavivirus</i>	62
5.4.6	Análise do produto da PCR	62
5.4.7	Purificação do produto de PCR	63
5.4.8	Sequenciamento genético	63
5.4.9	Obtenção das sequências consenso.....	64
5.4.10	Seleção dos genes de interesse para análise filogenética	64
5.4.10.1	Protocolo de RT-PCR para amplificação do gene CprM	65
5.4.10.2	Protocolo de RT-PCR para amplificação do gene Envelope	65
5.4.10.3	Análise do produto da PCR	66
5.4.10.4	Purificação do produto de PCR	66
5.4.10.5	Sequenciamento genético	67
5.4.10.6	Obtenção das sequências consenso.....	67
5.5	ANÁLISE FILOGENÉTICA	67
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE 1 – BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS GENÉTICAS DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 UTILIZADAS PARA ELABORAÇÃO DAS ANÁLISES FILOGENÉTICAS	126
	ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	128

1 INTRODUÇÃO

A palavra arbovírus advém da expressão inglesa *arthropod-borne virus* criada em 1942 para descrever um grupo de vírus que se disseminava em artrópodes e era transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Alguns anos depois, o termo arbovírus foi adotado oficialmente para designar esses vírus que estão envolvidos em ciclos nos quais a transmissão biológica ocorre principalmente entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por meio de vetores artrópodes hematófagos, mas também pela transmissão transovariana¹ ou venérea² nos artrópodes (WHO, 1985).

Os artrópodes hematófagos, além de transmissores, também podem ser considerados reservatórios de arbovírus, uma vez que a partir do momento em que se tornam infectados permanecem assim durante toda a sua vida. Desta forma, esses artrópodes poderão transmitir o vírus através da sua saliva quando forem se alimentar novamente do sangue de outro hospedeiro vertebrado suscetível. Os hospedeiros vertebrados dos arbovírus são considerados, na sua maioria, hospedeiros de amplificação e dispersão desses vírus (HERVÉ et al., 1986; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; RÁCZ, 2005).

Em geral, os arbovírus são RNA vírus, com exceção do vírus da *Peste Suína Africana* cujo genoma é constituído por DNA, que possuem a capacidade de se multiplicar tanto em células de artrópodes quanto em células de hospedeiros vertebrados, fazendo com que se perpetuassem na natureza (RÁCZ, 2005; WEAVER, 2006; COFFEY et al., 2013).

As arboviroses, doenças causadas pelos arbovírus, são, em quase sua totalidade, zoonoses mantidas em ambiente silvestre. No entanto, algumas arboviroses têm surgido também sob forma epidêmica em alguns centros urbanos (AZEVEDO et al., 2007).

Os seres humanos podem atuar como hospedeiros de amplificação e dispersão de alguns dos principais arbovírus, como ocorre nos casos das infecções pelos vírus *Dengue* (VDEN), vírus *Zika* (VZIK) e vírus *Chikungunya* (VCHIK). Entretanto, os seres humanos também podem atuar como hospedeiros incidentais (*dead-end hosts*) de outros arbovírus. Nestes casos, as infecções ocorrem

¹ Ocorre quando o patógeno é transmitido da fêmea do mosquito infectada para sua prole.

² Ocorre quando machos infectados verticalmente transmitem o vírus para a fêmea por fluidos seminais contaminados.

acidentalmente quando o homem entra em contato com os hospedeiros vertebrados e vetores que participam do ciclo silvestre (GOULD et al., 2017).

As infecções causadas por arbovírus em humanos apresentam manifestações clínicas que podem variar desde quadros febris, acompanhados ou não de exantema, até formas graves, que são caracterizadas por manifestações hemorrágicas e/ou alterações neurológicas (FIGUEIREDO; FONSECA, 2002; WEAVER; BARRET, 2004; GO; BALASURIYA; LEE, 2014). Além disso, essas doenças não são imunopreveníveis, com exceção da Febre Amarela (FA). Mais recentemente, a vacina contra Dengue (Dengvaxia®) foi adotada pelo estado do Paraná nos 30 municípios que possuem maior risco para a ocorrência da doença no estado (PARANÁ, 2016).

Os arbovírus formam um grupo composto por 545 espécies, das quais pelo menos 150 são patogênicas para seres humanos e/ou animais, e estão divididos em sete famílias: *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Asfaviridae* (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; ICTV, 2017).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARBOVÍRUS

Nas últimas décadas alguns arbovírus têm se tornado importantes problemas de Saúde Pública por apresentarem potencial zoonótico e por serem responsáveis por causar surtos e epidemias na população humana (FIGUEIREDO, 2007; WEAVER, 2013).

Os arbovírus apresentam distribuição global, prevalecendo em regiões tropicais e subtropicais onde a grande maioria das epidemias ocorrem. Isto se deve ao fato de estas regiões possuírem condições climáticas favoráveis à proliferação de vetores e por possuírem grande diversidade de animais que podem atuar como hospedeiros de amplificação e dispersão de arbovírus (WHO, 1985; WEAVER; REISEN, 2010; LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Alterações ambientais produzidas pelas ações humanas, como a construção de hidrelétricas e estradas, o excessivo desmatamento, a urbanização não planejada e desastres ambientais podem resultar na adaptação de arbovírus a novos hospedeiros e vetores, fazendo com que se desenvolvam em novos ciclos de manutenção, o que pode estar relacionado à emergência e reemergência desses vírus (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2001; FIGUEIREDO, 2007; BATISTA et al., 2012).

Além disso, a possibilidade de alguns arbovírus percorrerem longas distâncias carreados por aves silvestres infectadas (aves migratórias) e a facilidade do deslocamento de pessoas e cargas vivas ao redor do mundo podem estar contribuindo para a propagação desses vírus (VASCONCELOS et al., 2001; GUBLER, 2002; FIGUEIREDO, 2007; BATISTA et al., 2012).

As arboviroses podem ocorrer de forma esporádica, endêmica ou epidêmica na população, sendo caracterizadas predominantemente por manifestações clínicas autolimitadas com quadros febris agudos indiferenciados, associados ou não a exantemas e artralgias. Em alguns casos, no entanto, pode haver manifestações hemorrágicas, encefalite ou meningite asséptica podendo evoluir à óbito, além de alterações neurológicas como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia (FONSECA; FIGUEIREDO, 2005; FIGUEIREDO, 2007; GO; BALASURIYA; LEE, 2014; RABAAN et al., 2017).

Em termos de Saúde Pública, as arboviroses mais importantes são aquelas que possuem a capacidade de circular essencialmente em ambientes urbanos e que possuem potencial epidêmico. Nestes casos, um grande número de indivíduos é infectado, resultando em uma maior ocorrência de manifestações clínicas severas ou letais (WEAVER, 2013).

Evidências evolutivas demonstram que os arbovírus mais frequentemente associados a epidemias urbanas, como os VDEN, VZIK e VCHIK, emergiram a partir de focos enzoóticos, sendo transmitidos a humanos em zonas de emergência, de onde se disseminaram para centros urbanos e localizações geográficas distintas (WEAVER; REISEN, 2010; WEAVER, 2013).

A emergência e reemergência de arbovírus são fenômenos associados à evolução e adaptação dos vírus aos hospedeiros e vetores. Estudos sobre os mecanismos de emergência e evolução viral demonstram que o aumento do espectro de hospedeiros e da eficiência de replicação pode ocorrer devido a mutações pontuais no genoma viral. Desta forma, a virulência também pode variar entre os diferentes linhagens, genótipos e sorotipos de arbovírus (COFFEY et al., 2013; WEAVER, 2013; LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Surtos causados por certos arbovírus, que até então eram restritos a determinadas regiões do planeta, vêm sendo descritos em novas localidades, como é o caso da emergência de infecções causadas pelos VZIK e VCHIK no Brasil, pelo vírus da *Febre do Nilo Ocidental* (VFNO) e vírus da *Febre do Usutu* na América do Norte e Europa. Além disso, há a reemergência de outros arbovírus em locais onde no passado houve casos ou epidemias, como é o caso do VCHIK na Ásia e do vírus da *Febre Amarela* (VFA) no Brasil (LEPARC-GOFFART et al., 2014; BRASIL, 2018).

A ocorrência de cerca de 213 arbovírus já foi descrita para o Brasil, sendo que 20% destes estavam associados a doenças em humanos. Aproximadamente 95% dos casos humanos notificados estão relacionados com os arbovírus pertencentes às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Peribunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*) (KARABATSOS, 1985; VASCONCELOS et al., 1992; FIGUEIREDO, 2007).

A família *Togaviridae* compreende dois gêneros e 32 espécies de vírus. O gênero *Alphavirus* é o mais representativo, abrangendo 31 espécies. Atualmente, os principais representantes deste gênero são: VCHIK, vírus *Mayaro* (VMAY), vírus da *Encefalite Equina do Leste* (VEEL), vírus da *Encefalite Equina do Oeste* (VEEO) e

vírus da *Encefalite Equina Venezuelana* (VEEV). A família *Flaviviridae* possui 60 exemplares, dos quais 53 pertencem ao gênero *Flavivirus*. Atualmente no Brasil já foram encontrados mais de 10 *Flavivirus*: VDEN sorotipos 1 – 4, VFA, VZIK, VFNO, vírus da *encefalite Saint Louis*, vírus *Rocio*, vírus *Bussuquara*, vírus *Cacipacoré*, vírus *Iguape* e vírus *Ilhéus* (ICTV, 2017).

A família *Peribunyaviridae* contempla o gênero *Orthobunyavirus* que engloba os arbovírus de maior interesse em Saúde Pública, pois são aqueles que acometem tanto animais silvestres quanto seres humanos, o principal exemplar deste gênero é o vírus *Oropouche*. No entanto, os principais vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* possuem uma distribuição mais restrita a região Amazônica.

O Brasil possui grande parte do seu território recoberto por áreas tropicais e regiões florestais, proporcionando condições climáticas e ecológicas que favorecem a ocorrência e manutenção dos ciclos dos arbovírus.

2.2 DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES

As doenças infecciosas emergentes podem ser definidas como infecções que têm surgido recentemente em uma população. Elas podem ocorrer pela introdução do agente etiológico em novas espécies ou como uma variante de uma infecção humana existente, seguida pelo seu estabelecimento e rápida disseminação dentro de uma nova população hospedeira. Sua ocorrência também é provocada pelo reconhecimento do caráter não-detectável de uma infecção que já estava presente na população (MORSE, 1995).

A maioria dos patógenos causadores de doenças em seres humanos possuem caráter zoonótico, com isso, as zoonoses têm representado uma proporção significativa de eventos de doenças infecciosas emergentes nas últimas décadas (KADING et al., 2013).

Uma zoonose é uma doença animal que pode ser transmitida aos seres humanos, e vice versa, em condições naturais. Estima-se que quase metade dos 1.700 patógenos conhecidos que afetam os seres humanos sejam zoonóticos (JONES et al., 2008). Taylor e colaboradores (2001) demonstraram que os patógenos zoonóticos têm duas vezes mais probabilidade de estarem associados a doenças emergentes em seres humanos do que patógenos não-zoonóticos.

Entre as principais doenças infecciosas emergentes de caráter zoonótico encontram-se as arboviroses, doença de Chagas, raiva, leishmaniose, leptospirose e malária.

O surgimento das doenças infecciosas emergentes tem sido associado a grande biodiversidade existente nas florestas tropicais e a presença cada vez frequente de seres humanos no ambiente silvestre. As principais causas de alterações ambientais introduzidas pelo homem estão relacionadas ao excessivo desmatamento, a exploração do subsolo, a colonização humana, a urbanização não planejada, a expansão agrícola e ecoturismo (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; VASCONCELOS et al., 2001; BATISTA et al., 2012). Essa situação representa um elevado risco de transmissão de agentes patogênicos entre os animais e o homem, levando ao surgimento de novas doenças, uma vez que o surgimento de doenças infecciosas emergentes está relacionado a mudanças na ecologia do hospedeiro, do patógeno ou de ambos (WOLFE et al., 1998; FIGUEIREDO, 2016).

O alto potencial de intercâmbio multidirecional de agentes patogênicos que ocorre devido a expansão da população humana nos *habitats* silvestres gera, portanto, desafios para a conservação da biodiversidade e saúde global.

No Brasil, a Lei nº 8.080, de 19 de setembro 1990, que regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS), define a vigilância epidemiológica como sendo:

O conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos (BRASIL, 1990, p. 3).

Em vista disso, uma das políticas públicas desenvolvida visando o aprimoramento do controle e a prevenção de doenças foi a Portaria nº 782, de 15 de março de 2017, que define a relação das epizootias, designada como casos de doença ou morte de animal ou de grupo de animais que possa apresentar riscos à Saúde Pública – de notificação compulsória e suas diretrizes para notificação em todo o território nacional. Entre as doenças ou agravos em animais de notificação compulsória estão casos de infecção pelos VFA, VFNO, VMAY e vírus das encefalites equinas.

As notificações de epizootias em animais devem ser realizadas pelos serviços de Saúde Pública a fim de contribuir para o avanço da vigilância epidemiológica das zoonoses de interesse envolvidas nestes eventos (SOUZA, 2011).

Esse tipo de ação de vigilância possibilita o reconhecimento precoce da circulação de agentes patogênicos que apresentam potencial zoonótico, permitindo, conseqüentemente, a elaboração de respostas mais rápidas e adequadas a possíveis surtos. Essas ações têm a finalidade de complementar os planos de vigilância da saúde humana já existentes, visando a diminuição de morbidade e mortalidade nas populações humana e animal (GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008).

2.3 VIGILÂNCIA DE DOENÇAS INFECCIOSAS EM ANIMAIS SENTINELA

A atual imprevisibilidade do surgimento de patógenos humanos demanda que a primeira linha de defesa seja uma vigilância eficaz, que identifique e monitore populações ou locais de alto risco, incluindo a criação de sistemas "sentinelas" (SMOLINSK et al., 2003).

Sistemas de vigilância sentinela envolvem uma forma de vigilância na qual as atividades são focadas em subpopulações específicas de animais para aumentar a detecção de doenças e/ou melhorar a relação custo-benefício da vigilância (MCCLUSKEY, 2003). O objetivo da vigilância sentinela é a obtenção de informações oportunas preditivas de risco para a população humana (GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008).

Os animais vertebrados podem desempenhar um importante papel nas ações de vigilância epidemiológica de doenças infecciosas emergentes, uma vez que estes animais são capazes de atuar como "sentinelas" naturais, funcionando como verdadeiros indicadores da circulação de agentes patogênicos humanos em uma determinada localidade. O fato de os animais serem mais sensíveis a determinados patógenos justifica sua utilização como uma ferramenta para a detecção precoce da possibilidade de ocorrência de doenças em seres humanos (SVOBODA, 2007; GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008; KARESH et al., 2012; KADING et al., 2013).

Desta forma, as ações de vigilância em animais considerados "sentinelas" desempenham papel de grande importância nas estratégias de controle de doenças infecciosas, pois permitem que ações preventivas por parte das autoridades de Saúde Pública sejam tomadas, levando à diminuição de número de casos de infecções em

humanos, reduzindo conseqüentemente, os custos com medicamentos e internações (GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008). Além disso, essas ações também podem contribuir para a diminuição do impacto negativo dessas doenças sobre atividades econômicas, como o comércio e turismo.

Kading e colaboradores (2013) afirmam que parcerias firmadas entre organizações de conservação de animais silvestres e de Saúde Pública têm o potencial de causar um poderoso impacto na previsão e prevenção do surgimento de doenças humanas por meio do monitoramento da transmissão de patógenos na natureza.

No entanto, apesar do potencial aparente da utilização de animais sentinelas para informar riscos à população humana, estes ainda são subutilizados, particularmente no contexto da vigilância de doenças infecciosas. A maior parte da vigilância de patógenos em animais silvestres tem sido de forma “reativa” a surtos de doenças ao invés de ser proativa. Esforços limitados têm sido dedicados a ações de vigilância que tenham a finalidade de interromper a transmissão de patógenos zoonóticos antes do acometimento da população humana (CHILDS; GORDON, 2009).

A Saúde Pública brasileira atualmente enfrenta um grande desafio, pois a maioria das ações de vigilância de arboviroses ocorrem de forma passiva, na qual a circulação de determinados agentes patogênicos é identificada por meio do adoecimento e morte de animais e/ou seres humanos. Ainda que alguns estudos de vigilância ativa sejam realizados, estes possuem algumas limitações, pois avaliam principalmente a distribuição de animais soropositivos, detectando apenas a presença de anticorpos, determinando a exposição prévia ou não dos animais aos patógenos.

No Brasil tem se observado a reemergência da FA e de outras arboviroses em regiões onde já houve casos ou epidemias. Além disso, outros arbovírus emergiram em diferentes regiões do país, como o VZIK e o VCHIK, causando um enorme impacto para a Saúde Pública. Devido a possibilidade de contato entre seres humanos e animais que possam estar atuando como hospedeiros de diversos agentes etiológicos, a investigação da presença de diferentes arbovírus nestes animais é fundamental para a emissão de alertas com o objetivo de prevenir a ocorrência de infecção humana (SVOBODA, 2007, FERGUSON et al., 2014).

Portanto, se faz necessária uma intensificação e aprimoramento das ações de vigilância de arbovírus, detectando precocemente a circulação de diferentes agentes patogênicos, antes mesmo de acometerem a população humana (SVOBODA, 2007).

Uma alternativa é a execução de ações de monitoramento ativo (vigilância ativa) utilizando metodologias de biologia molecular que permitam a detecção em tempo oportuno da presença de diferentes arbovírus em animais que possam estar atuando como hospedeiros, minimizando os impactos causados por estas doenças.

Fatores como o aumento do comércio e viagens globais, o crescimento da população humana e as ações antrópicas no meio ambiente alteram a interface entre humanos e animais silvestres, tornando a vigilância dessas espécies fundamental para a proteção da saúde humana (KARESH et al., 2012; KADING et al., 2013).

Dada a importância dos animais, principalmente mamíferos, como hospedeiros de agentes patogênicos humanos fica claro que a vigilância nestes animais se torna essencial para a compreensão e gerenciamento de ameaças de doenças emergentes como as arboviroses (KUIKEN et al., 2005; WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005; KARESH et al., 2012).

2.4 VIGILÂNCIA ENTOMOLÓGICA

Os insetos integram a classe de animais mais difundida no planeta, com mais de um milhão de espécies descritas e que ocupam praticamente todos os tipos de ambientes, sejam naturais ou antropizados. A ciência que estuda os insetos sob os aspectos de utilidade ou nocividade é chamada de entomologia aplicada (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

A família Culicidae pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, infraordem Culicomorpha, que é dividida em duas subfamílias: Anophelinae e Culicinae. Possui 3.490 espécies descritas, distribuídas em 44 gêneros e 145 subgêneros (HARBACH, 2007).

Muitas espécies de Culicidae apresentam relevância em Saúde Pública devido ao hábito hematofágico das fêmeas que, associado à antropofilia de algumas espécies, pode favorecer a veiculação e expansão de patógenos em determinadas situações (FORATTINI, 2002).

Devido à grande importância epidemiológica dos culicídeos, torna-se fundamental a elaboração de atividades específicas que auxiliem as ações de combate e controle das doenças por eles transmitidas e que possibilitem a sistematização de informações técnicas (GOMES, 2002).

Estudos que vislumbrem o conhecimento acerca da distribuição das espécies de culicídeos em determinado território, bem como a dinâmica ecológica estabelecida entre estes e o ambiente antrópico, configuram-se como um foco importante da Vigilância Entomológica. Os estudos que envolvem os insetos de importância médica oportunizam a compreensão de diversos aspectos relevantes, como a sua biodiversidade, distribuição geográfica, comportamento, entre outras características que podem contribuir nas tentativas de controle das suas populações, a fim de reduzir o risco da transmissão de patógenos (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

Atualmente, no contexto da Vigilância Ambiental em Saúde, a Vigilância Entomológica pode ser entendida como:

A contínua observação e avaliação de informações originadas das características biológicas e ecológicas dos vetores, nos níveis das interações com hospedeiros humanos e animais reservatórios, sob a influência de fatores ambientais, que proporcionem o conhecimento para a detecção de qualquer mudança no perfil de transmissão de doenças (GOMES, 2002, p. 84).

Desta forma, a ecologia de vetores é o pilar central da Vigilância Entomológica (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

Dentre as atribuições da Vigilância Entomológica destacam-se a identificação de espécies ocorrentes em determinada localidade, a densidade populacional e dispersão – que fornecem dados sobre a abundância e disseminação da população de vetores no espaço urbano, caracterização de situações ambientais e climáticas que favoreçam a proliferação de vetores e disseminação de patógenos, detecção de espécies alóctones³ e identificação de indicadores e fatores de risco epidemiológico atribuídos aos vetores para que se possa interferir previamente bloqueando os surtos possíveis (GOMES, 2002).

As ações de Vigilância Entomológica podem ser voltadas para um grupo de espécies, situação em que amostras representativas da fauna são coletadas com a mesma técnica, na mesma ocasião amostral, otimizando recursos e oferecendo informações importantes para a vigilância (MOORE et al., 1993; KENT; LACER; MEISCH, 2003) ou voltadas para uma única espécie de importância conhecida, como *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

³ Espécies alóctones: espécies encontradas em determinada área onde não existiam originalmente.

As ações direcionadas ao controle de mosquitos no Brasil se configuram em grandes campanhas de Saúde Pública que buscam minimizar a ocorrência da transmissão de agentes etiológicos, incluindo os arbovírus. Alguns desses agentes já são amplamente estudados e combatidos, como é o caso do VDEN, VFA, malária e filariose brancaftiana, e outros que emergiram mais recentemente, como é o caso dos VCHIK e VZIK (MARCONDES; XIMESES, 2016).

A Vigilância Entomológica, por sua vez, pode estar aliada à detecção de vírus nos vetores, possibilitando a indicação da presença de novos vírus e/ou sorotipos e linhagens virais circulantes em determinada região. Esse conjunto de informações pode contribuir para minimizar os danos à população suscetível em questão, possibilitando a elaboração de uma base histórica de dados, que colabora na identificação de riscos de situações epidêmicas.

O conhecimento da diversidade de espécies de culicídeos e sua frequência de infecção por arbovírus em regiões onde as epidemias são frequentes são importantes na previsão das arboviroses que podem circular em humanos ou se disseminar após sua introdução. Essas observações evidenciam a necessidade de aprofundar a compreensão sobre o ciclo epidemiológico e a evolução molecular desses vírus, bem como para melhorar as medidas de Vigilância Entomológica (PEREIRA SERRA et al., 2016).

2.5 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Durante a duplicação do material genético pode haver a incorporação de um nucleotídeo não complementar à cadeia nucleotídica pelas enzimas DNA ou RNA polimerase, além disso, também podem ocorrer modificações químicas de nucleotídeos devido à exposição a fatores ambientais como a luz ultravioleta (UV) ou substâncias químicas. Estas mudanças podem afetar a síntese da cadeia complementar, resultando, conseqüentemente, na incorporação de nucleotídeos não complementares aos nucleotídeos originais ou deleção de nucleotídeos. Quando essas modificações conseguem escapar dos mecanismos de reparação celular, a informação genética pode ser alterada, resultando em uma mutação pontual (LEMEY; SALEMI; VANDAMME, 2009).

O código genético é degenerado, evoluindo de forma que uma mutação pontual na terceira posição do códon raramente resulte na alteração do aminoácido

formado, essas mutações são denominadas substituições sinônimas ou silenciosas. Porém, alterações que ocorram na primeira posição do códon resultarão, na maioria das vezes, na alteração do aminoácido formado. Enquanto que as mutações que ocorrem na segunda posição do códon sempre resultarão na alteração do aminoácido, sendo chamadas de substituições não-sinônimas ou não-silenciosas (LEMEY; SALEMI; VANDAMME, 2009).

A evolução é considerada uma mudança das características genéticas em uma dada população ao longo do tempo. Esse fenômeno ocorre nos diferentes organismos, como nos agentes patogênicos, seus vetores e hospedeiros e a sua compreensão pode contribuir na elucidação de muitos aspectos envolvendo doenças de grande importância para a Saúde Pública. Altas taxas de mutação e recombinação gênica são observadas nos vírus, especialmente nos RNA vírus, pelo fato de estes organismos se multiplicarem muito rapidamente (DAVIES; DAVIES, 2010; BHULLAR et al., 2012).

No passado, a trajetória percorrida por doenças infecciosas era traçada pelos resultados obtidos por meio da realização de testes sorológicos. Com o passar do tempo, a popularização de técnicas de biologia molecular e sequenciamento genético proporcionou um acúmulo de informações em bancos de dados referentes as sequências genéticas de diversos organismos, contribuindo para um melhor entendimento da evolução de diversas enfermidades (BROCCHIERI, 2001).

A epidemiologia é a ciência que avalia de forma quantitativa a distribuição dos fenômenos de saúde ou doença, seus fatores condicionantes e determinantes nas populações (LESER, 1985). Permite, ainda, a avaliação da eficácia das intervenções realizadas no âmbito da Saúde Pública (SOUNIS, 1985). Dependendo do seu enfoque, os estudos epidemiológicos também podem proporcionar a detecção de mudanças nos fatores que interferem na distribuição de determinadas enfermidades, como as zoonoses, com a finalidade de recomendar e adotar as ações de prevenção e controle adequadas (THRUSFELD, 2004).

A biologia molecular fornece técnicas altamente sensíveis e específicas, capazes de detectar e analisar a informação presente no genoma de patógenos, hospedeiros e vetores. Algumas das técnicas de biologia molecular mais usadas em epidemiologia são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento genético (CALDART et al., 2016).

Desta forma, a epidemiologia molecular compreende estudos sobre a composição genética de indivíduos de uma determinada população e a sua relação com agravos à saúde, ou seja, estudos acerca da evolução molecular de determinado patógeno e/ou gene inserido em um contexto epidemiológico (FORATTINI, 2004).

Os estudos de epidemiologia molecular utilizam hipóteses filogenéticas para inferir como ocorreram as infecções na população, as razões e a maneira como se disseminaram (ÉTIENNE; MILLOT; CERQUEIRA, 2003). Análises filogenéticas são uma etapa fundamental da análise exploratória de sequências nucleotídicas e/ou de proteínas que permitem a elucidação do caminho evolutivo e epidemiológico de agentes patogênicos e/ou de seus vetores e hospedeiros (FELSENSTEIN, 1978).

Esses estudos permitem identificar novos agentes patogênicos, suas fontes de infecção e rotas de transmissão, suas relações biológicas (filogenéticas) e identificação de genes responsáveis pela virulência (LEVIN; LIPSITCH; BONHOEFFER, 1999). Além disso, estudos de epidemiologia molecular permitem avaliar a relação entre a presença de determinados polimorfismos e a suscetibilidade ou resistência do hospedeiro e têm se tornado críticos para a compreensão de padrões epidêmicos de disseminação viral (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2014).

A análise filogenética também é capaz de destacar o papel desempenhado pelo intercâmbio intensivo entre países fronteiriços, particularmente devido ao turismo e comércio (BARRERO; MISTCHENKO, 2008).

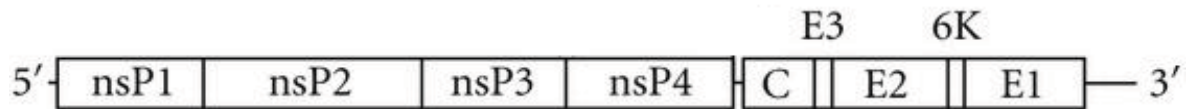
2.6 *Alphavirus*

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros: *Rubivirus* e *Alphavirus*. O gênero *Alphavirus* engloba 31 espécies virais, e destas, 16 têm sido associadas à infecções em humanos e em outros vertebrados, principalmente equinos, primatas não humanos (PNH) e aves (KARABATSOS, 1985; ICTV, 2017). Os *Alphavirus* possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida.

Estes vírus são esféricos, medem entre 60 e 70 nanômetros (nm) de diâmetro, envelopados, com nucleocapsídeo icosaédrico. Seu genoma é constituído por RNA linear de fita simples de 11.8 quilobases (kb), polaridade positiva e composto por nove genes que codificam cinco proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) e quatro

proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) (KUHN, 2007), como demonstrado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS *Alphavirus*



FONTE: Adaptado de Leung, Ng, Chu (2011).

Entre os *Alphavirus* encontram-se muitas espécies de importância médica como VCHIK, VMAY, VEEL, VEEV e o vírus *Sindbis*, reconhecido como protótipo do gênero, mas que não circula no continente Americano.

2.6.1 Principais *Alphavirus* circulantes no Brasil

2.6.1.1 Vírus *Chikungunya*

A febre por *Chikungunya* é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* os principais vetores.

A infecção pelo VCHIK provoca febre alta, dor de cabeça, dores articulares e dores musculares. O período médio de incubação da doença é de três e sete dias (variando de um a doze dias). Não existe tratamento específico nem vacina disponível para prevenir a infecção por esse vírus. A doença pode se manifestar clinicamente de três formas: aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda os sintomas aparecem de forma brusca e compreendem febre alta, cefaleia, mialgia e artralgia (predominantemente nas extremidades e nas grandes articulações). Também é frequente a ocorrência de exantema maculopapular. Os sintomas costumam persistir por sete a dez dias, mas a dor nas articulações pode durar meses ou anos e, em certos casos, converter-se em uma dor crônica incapacitante para algumas pessoas (BRASIL, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), desde o ano de 2004 o vírus já foi identificado em 19 países. Naquele ano, um surto na costa do Quênia propagou o vírus para Comores, Ilhas Reunião e outras ilhas do oceano Índico, chegando, em 2006, à Índia, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Cingapura, Malásia e Indonésia. Nesse período, foram registrados aproximadamente 1,9 milhão de casos –

a maioria na Índia. Em 2007, o vírus foi identificado na Itália. Em 2010, há relatos de casos na Índia, Indonésia, Mianmar, Tailândia, Ilhas Maldivas, Ilhas Reunião e Taiwan – todos com transmissão sustentada. França e Estados Unidos também registraram casos em 2010, mas sem transmissão autóctone. No final de 2013, foi registrada transmissão autóctone em vários países do Caribe (Anguila, Aruba, Dominica, Guadalupe, Guiana Francesa, Ilhas Virgens Britânicas, Martinica, República Dominicana, São Bartolomeu, São Cristóvão e Nevis, Santa Lúcia e São Martinho). A população do continente Americano é considerada vulnerável pelo fato de o vírus nunca ter circulado antes nessa região, portanto as pessoas não têm imunidade ao vírus e, além disso, ambos os mosquitos capazes de transmitir a doença estão presentes em praticamente todas as áreas do continente (BRASIL, 2014).

Em 2014, entre as Semanas Epidemiológicas (SE) 37 e 53, foram notificados 3.655 casos autóctones suspeitos de febre por Chikungunya em oito municípios, pertencentes aos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e ao Distrito Federal. Também foram registrados casos importados, confirmados por laboratório, nos seguintes estados: Amazonas, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo. Em 2015, até a SE 52, foram notificados 20.661 casos autóctones suspeitos de febre por Chikungunya. Destes, 7.823 foram confirmados e três óbitos foram registrados, sendo dois no estado da Bahia e um em Sergipe (BRASIL, 2016).

No ano de 2016 foram registrados 277.882 casos prováveis de febre por Chikungunya enquanto que no ano de 2017 foram registrados 185.854 casos prováveis (SE 1 – SE 52). Em 2018, até a SE 10 (31/12/2017 a 10/03/2018), foram registrados 14.261 casos prováveis da doença. Destes, 8.475 casos (59,4%) e um óbito foram confirmados, mas existem ainda 13 óbitos em investigação (BRASIL, 2018).

Atualmente circulam no Brasil dois genótipos do VCHIK, um africano que foi introduzido pelo município de Feira de Santana na Bahia, e outro asiático introduzido no estado do Amapá Pernambuco. No entanto observa-se a predominância do genótipo africano (NUNES et al., 2015).

2.6.1.2 Vírus *Mayaro*

O VMAY foi isolado pela primeira vez em humanos em Trinidad e Tobago no ano de 1954 (ANDERSON et al., 1957). No mesmo país, em 1957, o vírus foi detectado também em mosquitos *Mansonia venezuelensis* (AITKEN et al., 1960).

Este vírus já foi isolado a partir de amostras de animais silvestres e mosquitos e há relatos de doença febril aguda com sorologia positiva em humanos em outros países da América, como Panamá, Guatemala, Costa Rica, Venezuela, Peru, Guiana Francesa, Equador, Bolívia, Paraguai e Brasil (PINHEIRO et al., 1981; TALARMIN et al., 1998; TORRES et al., 2004; COIMBRA et al., 2007; FORSHEY et al., 2010; MOURÃO et al., 2012; MUÑOZ; NAVARRO, 2012).

O primeiro relato de epidemia causada pelo VMAY no Brasil foi no ano de 1955 no estado do Pará, onde posteriormente ocorreram outras epidemias. Casos também foram descritos no estado de Goiás em 1987, e no Tocantins em 1991 (VASCONCELOS et al., 2001; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014). Casos importados da doença foram registrados no estado de São Paulo no ano 2000 (COIMBRA et al., 2007).

A presença de anticorpos contra o VMAY foi descrita em mamíferos, nos anos de 2009 a 2011, na região do Pantanal no Mato Grosso do Sul e em residentes de municípios do estado Pará que fazem divisa com o Mato Grosso, região afetada pela construção da rodovia Cuiabá-Santarém (NUNES et al., 2009; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015). No estado do Mato Grosso, o vírus foi detectado em humanos no ano de 2012 (ZUCHI et al., 2014). Além disso, a circulação do VMAY também foi detectada em primatas de vida livre no estado do Mato Grosso do Sul em 2013 (BATISTA et al., 2013).

No Brasil, este vírus é endêmico nas regiões Norte e Centro-Oeste, principalmente na região Amazônica, com índices de soroprevalência variando de 2 a 40,9% (CAUSEY; MAROJA; AZEVEDO, 1958; COIMBRA et al., 2007; MOURÃO et al., 2012).

Estudos sugerem que a soroprevalência apresenta índices maiores em moradores de áreas rurais e/ou silvestres (TALARMIN et al., 1998; ABAD-FRANCH et al., 2012; MUÑOZ; NAVARRO, 2012). No entanto, casos de doença febril causadas pelo vírus também têm sido relatados em residentes de áreas urbanas de Manaus (ABAD-FRANCH et al., 2012; MOURÃO et al., 2012).

O VMAY circula em um ciclo zoonótico que ocorre em ambiente silvestre entre hospedeiros vertebrados como aves e mamíferos, entre eles, tamanduás, preguiças, cutias, marsupiais e roedores, com infecções humanas acidentais (DE THOISY et al., 2003; LAVERGNE et al., 2006). O mosquito *Haemagogus janthinomys* é o principal vetor em ciclos silvestres, porém há evidências de que mosquitos pertencentes aos gêneros *Psorophora*, *Mansonia*, *Coquilletidia* e *Sabethes* e outras espécies do gênero *Haemagogus* também possam atuar como vetores (AITKEN et al., 1960; GALINDO et al., 1966; ABAD-FRANCH et al., 2012).

Um ciclo urbano envolvendo humanos e mosquitos de hábitos antropofílicos como mosquitos dos gêneros *Aedes* spp. e/ou *Culex* spp. também tem sido proposto (ABAD-FRANCH et al., 2012; MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014).

A circulação do vírus tem sido relatada em várias espécies de mamíferos, evidenciando a capacidade de dispersão do vírus em diversas espécies de hospedeiros (NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014). Além disso, as aves silvestres migratórias desempenham um importante papel na dispersão do VMAY, uma vez que são capazes de percorrer longas distâncias em um curto período de tempo (VASCONCELOS; TRAVASSOS DA ROSA; PINHEIRO, 1998).

2.6.1.3 Vírus da *Encefalite Equina do Leste*

O VEEL é mantido na natureza em ciclos silvestres envolvendo o mosquito *Culiseta melanura* e aves como hospedeiros primários. Espécies de *Aedes*, *Culex* e *Coquilletidea perturbans* são vetores secundários e, devido aos seus hábitos de hematofagia promíscua, ampliam a gama de hospedeiros infectados (ARRIGO; ADAMS; WEAVER, 2010; ESTEP et al., 2013; CFSPH, 2015).

O VEEL foi isolado em 1933 a partir de equinos nos Estados Unidos (BROECK; MERRILL, 1933). Em 1938, foi descrito o primeiro surto em crianças com aproximadamente 30 óbitos, que foi seguido por diversas epidemias no país (WEBSTER; WRIGHT, 1938).

O vírus circula atualmente desde o Canadá até o norte da Argentina. No Brasil, foi isolado em equinos nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e Minas Gerais e em aves na Amazônia (WIGG, 1977; BRAULT et al., 1999; FIGUEIREDO, 2007; WEAVER et al., 2012; CAMPOS et al., 2013).

Testes sorológicos indicaram a ocorrência de anticorpos contra o vírus em equinos nos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e na região do Pantanal no Mato Grosso do Sul (IVERSSON et al., 1993; RITCHARTZ, 1994; FERNÁNDEZ et al., 2000; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010; MELO et al., 2012). Também no estado de São Paulo, o vírus foi isolado a partir de equinos e roedores e a circulação do vírus foi detectada em aves residentes e migratórias (VASCONCELOS; TRAVASSOS DA ROSA; PINHEIRO, 1998). Surtos em equinos foram relatados em Pernambuco, Ceará e Paraíba e no Pará (SILVA et al., 2011; CAMPOS et al., 2013).

2.6.1.4 Vírus da *Encefalite Equina do Oeste*

O primeiro *Alphavirus* isolado foi o VEEO no ano de 1930, nos Estados Unidos, a partir de amostras de equinos (MEYER; HARING; HOWITT, 1931). O primeiro caso humano de infecção por este vírus foi registrado em uma criança com encefalite descrito em 1938 (HOWITT, 1938).

O ciclo de transmissão deste vírus envolve aves domésticas e silvestres, que são hospedeiros e amplificadores do vírus, enquanto que os vetores são mosquitos *Culex tarsalis*. No entanto, outros mosquitos como *Culiseta melanura* e diferentes espécies de *Aedes* também podem estar envolvidos no ciclo de transmissão (WANG et al., 2012; GO; BALASURIYA; LEE, 2014), transmitindo o vírus VEEO a humanos e equinos, que são hospedeiros incidentais.

Índice de mortalidade das infecções causadas por estes vírus em humanos varia entre 3 e 7% (ZACKS; PAESSLER, 2010).

O VEEO está disseminado em países como Estados Unidos e Canadá. No México, este vírus foi descrito como causador de epizootias em equinos e de epidemias em humanos (GRIFFIN, 2007; FLORES, 2012).

Na América do Sul, epizootias causadas por este vírus já foram descritas na Argentina, Equador, Uruguai e Brasil, no entanto, inquéritos sorológicos realizados demonstraram uma baixa prevalência da ocorrência da infecção em humanos (PFEFFER; DOBLER, 2010; ZACKS; PAESSLER, 2010).

No Brasil, a circulação do VEEO foi relatada em 1960 em humanos e equinos no Rio de Janeiro. Evidências da circulação do vírus também já foram descritas em equinos de diversas cidades do Paraná, na região da Nhecolândia no Pantanal do Mato Grosso do Sul, no Mato Grosso, em espécies de aves na Amazônia

(VASCONCELOS et al., 1991, IVERSSON et al., 1993; RICHARTZ, 1994; VASCONCELOS; TRAVASSOS DA ROSA; PINHEIRO, 1998; PAUVOLID-CORRÊA, 2008; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010; MELO et al., 2012).

2.6.1.5 Vírus da *Encefalite Equina Venezuelana*

O VEEV é mantido em ciclos enzoóticos envolvendo roedores como hospedeiros e mosquitos do gênero *Culex* como vetores (GO; BALASURIYA; LEE, 2014). A maioria das epidemias e epizootias ocorre esporadicamente quando o vírus é transmitido a humanos e equinos por vetores secundários competentes que possuem hábitos peridomésticos e agrícolas.

O homem é considerado hospedeiro incidental deste vírus, apresentando um índice de mortalidade $\leq 1\%$ (ZACKS; PAESSLER, 2010).

Desde o ano de 1920, o VEEV é conhecido por infectar humanos e equinos na América Latina (VELASQUEZ, 1939; CASALS; CURNEN; THOMAS, 1943). Os primeiros casos descritos ocorreram em 1936 na Colômbia e na Venezuela e, desde então, surtos ocorreram periodicamente até o ano de 1973 (BECK; WYCKOFF, 1938; VELASQUEZ, 1939; WEAVER et al., 1996).

Esse vírus é endêmico na Colômbia e Venezuela, onde em 1995 foi descrita uma das maiores epidemias da história com mais de 100 mil casos e aproximadamente 300 óbitos (WEAVER et al., 1996).

No fim da década de 1960, o VEEV causou epizootias em equinos e epidemias em países como Colômbia, Venezuela, Peru, Trinidad e Tobago, Equador e em países da América Central, se dispersando pelo México até o Texas (KUBES; RÍOS, 1939; LORD, 1974; WEAVER et al., 1996).

Nesta mesma época, o VEEV foi isolado em mosquitos e roedores no Peru e a ocorrência da infecção em humanos e equinos em outras regiões do país também foi demonstrada (MADALENGOITIA; FLORES; CASALS, 1973; SCHERER et al., 1975; SCHERER et al., 1979).

No Brasil, em 1982, o vírus foi isolado na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo em mosquitos *Culex* e em morcegos *Carollia perspicillata* (CALISHER et al., 1982). Na Amazônia, o vírus foi isolado a partir de amostras de PNH e mosquitos *Anopheles ninbus* (VASCONCELOS et al., 1991). Há evidências também da circulação do vírus em equinos nos estados do Paraná e São Paulo (RICHARTZ,

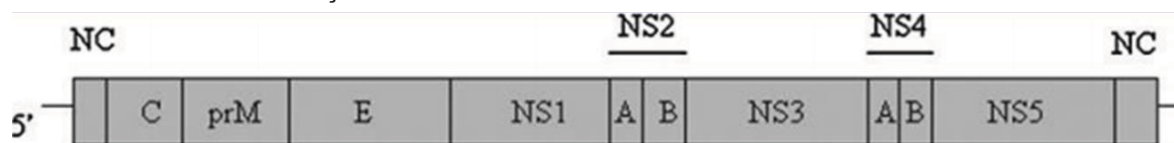
1994; VASCONCELOS; TRAVASSOS DA ROSA; PINHEIRO,1998; PFEFFER; DOBLER, 2010) e em equinos na região do Pantanal no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MELO et al., 2012; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013).

2.7 *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* é formada por quatro gêneros: *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Flavivirus* (ICTV, 2017). No entanto, os arbovírus desta família estão presentes apenas no gênero *Flavivirus*, que compreende 53 espécies, sendo que cerca de 40 são capazes de causar infecções em humanos e animais, incluindo alguns arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil.

Os arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são esféricos, envelopados, medem cerca de 40-60 nm de diâmetro, possuem um nucleocapsídeo icosaédrico e genoma constituído de RNA fita simples, polaridade positiva com cerca de 11 kb (RIDPATH; FLORES, 2012; COFFEY et al., 2013). O genoma contém dez genes que são traduzidos a partir do RNA genômico em uma poliproteína, que é clivada por proteases em três proteínas estruturais: a proteína de capsídeo (C), de membrana (M) e glicoproteína de envelope (E), e sete não-estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (RIDPATH; FLORES, 2012), demonstrado na FIGURA 2.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS *Flavivirus*



FONTE: Adaptado de Johnson et al. (2010).

O gênero *Flavivirus* abrange muitas espécies de importância para a Saúde Pública no Brasil e no mundo, como o VDEN (sorotipos 1 – 4), VZIK, VFNO, vírus da encefalite *Saint Louis*, *Rocio*, *Ilheus*, *Cacipacoré* e o VFA, que é o protótipo do gênero.

2.7.1 Principais *Flavivirus* circulantes no Brasil

2.7.1.1 Vírus *Dengue*

A Dengue é uma das arboviroses mais importantes do mundo, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais. O VDEN possui quatro sorotipos geneticamente distintos, que se subdividem em genótipos e linhagens.

Qualquer sorotipo viral é capaz de originar um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem variar desde casos assintomáticos ou manifestações febris autolimitadas até doenças hemorrágicas severas. A gravidade da doença está condicionada a fatores de risco como a estirpe viral, a idade e a ocorrência de infecção secundária por outro sorotipo no hospedeiro (BÄCK; LUNDKVIST, 2013). A infecção secundária por outro sorotipo é uma consequência da circulação dos diferentes sorotipos virais em uma mesma região. Durante a reinfeção por sorotipos distintos pode ocorrer a exacerbação da resposta imunológica do hospedeiro, levando ao desenvolvimento de complicações hemorrágicas que podem evoluir à óbito.

As primeiras evidências da circulação do VDEN ocorreram no final do século XVIII, com epidemias em Jacarta, Indonésia, Cairo e Egito em 1779 e na Filadélfia e Pensilvânia em 1780 (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Naquela ocasião o crescimento urbano e a globalização colaboraram com a expansão geográfica global do vírus e com o aumento da incidência de casos da doença.

O Brasil está localizado em uma região hiperendêmica, com os quatro sorotipos virais circulantes. Os relatos mais antigos de casos de Dengue foram descritos entre 1845 a 1853, em surtos ocorridos nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco (GUBLER, 1997; BARRETO; TEXEIRA, 2008; DICK et al., 2012). Porém, somente na década de 1980 foi possível obter a confirmação clínica e laboratorial do VDEN, durante uma epidemia ocorrida no estado de Roraima, caracterizando a primeira epidemia no país com os sorotipos 1 (VDEN-1) e 4 (VDEN-4). Estima-se que aproximadamente sete mil casos foram notificados (OSANAI et al., 1983).

Em 1986, o VDEN-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, sendo considerado, até aquele momento, o único sorotipo circulante no estado. Entre 1990 e 1991 o sorotipo 2 (VDEN-2) também foi introduzido no Rio de Janeiro e se disseminou para outros estados do Brasil (NOGUEIRA et al., 1990; NOGUEIRA et al., 1993). Com o

aparecimento de um novo sorotipo, aumentou o número de casos de Febre Hemorrágica por Dengue e de Síndrome do Choque da Dengue (NOGUEIRA et al., 2000).

Durante a década de 1990 somente os sorotipos 1 e 2 circulavam pelo país (GONÇALVES NETO; REBÊLO, 2004), até que em 1998, no estado de São Paulo, foi isolado pela primeira vez o sorotipo 3 (VDEN-3) a partir de um caso importado (ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001). Dois anos mais tarde, durante uma nova epidemia de Dengue no Rio de Janeiro, constatou-se a presença do VDEN-3, a partir de um caso autóctone (NOGUEIRA et al., 2001). No ano de 2010 houve a reemergência do sorotipo 4 pelo estado de Roraima, após 29 anos sem ser identificado.

Os quatro sorotipos do VDEN dividem-se em genótipos de acordo com variações em regiões conservadas do genoma e com sua distribuição geográfica. Algumas cepas, pertencentes a determinados sorotipos, genótipos e linhagens podem ser mais virulentas (WEAVER; VASILAKIS, 2009). A infecção por um dos sorotipos confere imunidade de longa duração sorotipo-específica. No entanto, a proteção cruzada entre sorotipos é transiente, durando até seis meses (MESSINA et al., 2014).

O VDEN é mantido na natureza por dois ciclos de transmissão. O ciclo silvestre que ocorre na África e Malásia, envolvendo PNH como hospedeiros e espécies de *Aedes luteocephalus*, *Aedes furcifer* e *Aedes niveus* como vetores. Em áreas rurais da África, existe uma zona de emergência onde a população que entra em contato com cepas silvestres do vírus pode carregá-lo até áreas urbanas. Em contrapartida, o ciclo urbano, que ocorre principalmente no continente Americano, envolve os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* como vetores e seres humanos como hospedeiros amplificadores (WEAVER; REISEN, 2010; VASILAKIS et al., 2011).

No Brasil, foram registrados 1.452.489 casos de Dengue no ano de 2013, no ano de 2014 foram 589.107 casos, em 2015 foram 1.688.688 e no ano seguinte, 1.500.535 de casos foram registrados (BRASIL, 2017a). Em 2017, entre a SE 1 e a SE 52, foram registrados 251.711 casos e em 2018, até a SE 10 (31/12/2017 a 10/03/2018), foram registrados 51.930 casos prováveis de Dengue (BRASIL, 2018).

Em dezembro de 2015, o uso da vacina contra Dengue, Dengvaxia®, foi aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para indivíduos que possuam entre nove e 45 anos de idade e que residam em áreas endêmicas. No entanto, o Ministério da Saúde por meio do Comitê Técnico Assessor de Imunizações (CTAI) ainda não recomendou a adoção desta vacina no calendário nacional de imunizações (BRASIL, 2016; ANVISA, 2017).

Esta vacina é recombinante tetravalente (contra os quatro sorotipos do vírus), e administrada em três doses (0/6/12 meses). Em estudos realizados, a eficácia da vacina variou entre 56 e 60%, após um ano, e foi superior contra os sorotipos 3 e 4 do que para os sorotipos 1 e 2. Em indivíduos previamente expostos ao vírus, a eficácia foi de 78,2%, enquanto em indivíduos não expostos ao vírus foi de apenas de 38,1% (WHO, 2016).

Até o momento, a vacina foi adotada apenas pelo estado do Paraná, que possui autonomia legal para esta decisão. A Secretaria Estadual de Saúde do Estado, por sua vez, recomendou a utilização da vacina em apenas 30 municípios paranaenses que possuem maior risco para ocorrência da doença e que vêm enfrentando sérias epidemias. Em 28 desses municípios, a população alvo a ser vacinada abrange indivíduos entre 15 e 27 anos de idade, faixa etária que concentra 30% do total de casos de Dengue no estado. Nos municípios de Paranaguá e Assaí, o público-alvo da campanha são indivíduos de nove a 44 anos, pois os dois municípios enfrentaram as piores epidemias do Paraná em 2015/2016. Esses municípios registraram mais de 8 mil casos de Dengue por 100 mil habitantes. Os 30 municípios escolhidos são considerados endêmicos e concentram cerca de 80% dos casos registrados no estado, 83% dos casos graves e 82% das mortes por Dengue (PARANÁ, 2016).

Após a concessão do registro sanitário, para fins de monitoramento da vacina e seguimento dos indivíduos incluídos nos estudos clínicos, foram conduzidos ensaios adicionais para avaliação da relação benefício-risco em cada subpopulação de indivíduos (soropositivos e soronegativos). Os resultados obtidos demonstram que após cinco anos da administração da vacina permanece positivo o benefício da vacinação em indivíduos previamente soropositivos. No entanto, para indivíduos previamente soronegativos, 30 meses após a primeira dose da vacina ocorre um aumento do risco de exacerbação da doença, com aumento de casos de Dengue severa e hospitalização, ficando este risco acima daquele para indivíduos soronegativos que não receberam a vacina, embora os dados ainda não sejam conclusivos (ANVISA, 2017).

O desenvolvimento de qualquer vacina para prevenção da Dengue significa um grande avanço para o controle desta doença. No entanto, os resultados dos estudos que estão em andamento são imprescindíveis para definições da utilização da vacina no Brasil, destacando-se as avaliações de custo-efetividade. Esses

resultados serão capazes de fornecer maiores subsídios para o planejamento de recursos financeiros e fundamentar sob firme base técnico-científica a decisão político institucional de inclusão ou não inclusão de uma vacina contra Dengue no Calendário Nacional de Vacinação (BRASIL, 2016).

2.7.1.2 Vírus da *Febre Amarela*

No Brasil, a FA surgiu no final do século XVII e durante o período colonial ocorreram diversas epidemias (TEIXEIRA, 2001).

A epidemia que ocorreu no século XIX no Rio de Janeiro foi relacionada à chegada de um navio negreiro que atracou em 1849. Um fator que foi decisivo para o desenvolvimento da epidemia foi a instalação do vetor *Aedes aegypti* na cidade (FIOCRUZ, 2008).

Posteriormente, o estado de São Paulo foi atingido por uma epidemia de FA, principalmente a cidade de Santos, que era considerada porta de entrada de imigrantes, que traziam a doença que depois se alastrava (TEIXEIRA, 2001).

Várias teorias surgiram para explicar a transmissão da doença. Acreditava-se que se tratava de uma doença contagiosa, no entanto, havia a possibilidade de que fosse uma doença transmissível ou infecciosa que necessitava de um vetor que a transportasse de uma pessoa doente para outra sã (BENCHIMOL, 1994).

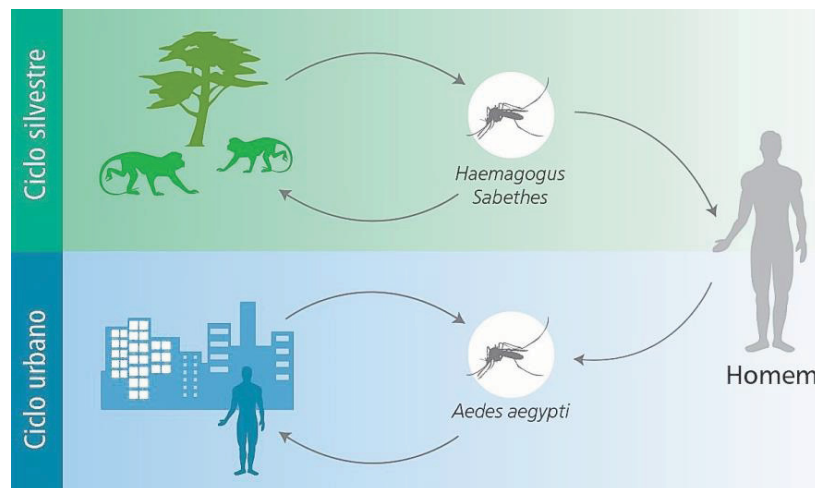
Em 1881, Carlos Finlay apontou o mosquito *Aedes aegypti* como um possível vetor, mas foi Walter Reed quem comprovou, em 1901, que a transmissão da FA ocorria por intermédio de um vetor. A FA passou então a ser estudada sob a ótica da microbiologia e várias hipóteses foram levantadas acerca do micro-organismo causador da doença. Em 1927, médicos da Fundação Rockefeller, trabalhando com primatas, descobriram que o agente causador da doença era um vírus e após esta descoberta os pesquisadores passaram a investir na produção de uma vacina (BRASIL, 2004).

Após causar notáveis surtos urbanos, o vírus demonstrou rápida adaptação ao ambiente silvestre, estabelecendo um ciclo da doença envolvendo PNH e mosquitos do gênero *Haemagogus*. O ciclo silvestre da FA foi reportado pela primeira vez no Brasil em 1936, com base nos surtos ocorridos no estado do Espírito Santo e também na Bolívia (SOPER, 1936).

A partir do ano de 1950, a FA tornou-se uma zoonose com notável mobilidade, circulando em diversas regiões do país (FIGUEIREDO, 2000). Mas foi na década de 1970 que o mosquito *Aedes aegypti*, vetor da FA urbana, voltou a infestar a América do Sul. Esta mudança somada à crescente migração humana dentro e fora de zonas endêmicas, aumentou consideravelmente o risco de reurbanização da doença na região (MONATH, 2008).

Portanto, a reurbanização do vírus pode ter sido causada principalmente pela migração de pessoas infectadas para cidades infestadas com o vetor urbano da doença, o mosquito *Aedes aegypti* (FIGUEIREDO, 2007), como demonstrado na FIGURA 3.

FIGURA 3 - CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA



FONTE: Brasil (2005).

Nas últimas décadas, a FA tem sido registrada além dos limites da área considerada endêmica (região Amazônica). Ao mesmo tempo, observou-se um padrão sazonal de ocorrência de casos humanos. Casos humanos e epizootias em PNH foram recentemente registrados em uma ampla área do território nacional. Inicialmente, entre 2014 e 2015, a transmissão se deu na região Norte, com posterior expansão no sentido leste e sul do país, onde afetou prioritariamente a região Centro-Oeste entre os anos de 2015 e 2016. Mais recentemente, entre 2016 e 2017, foi registrado o surto mais expressivo no Brasil, que afetou principalmente os estados da região Sudeste, quando foram registrados 779 casos humanos e 262 óbitos, além de 1.659 epizootias (BRASIL, 2018a).

No período de monitoramento de 01 de julho de 2017 até 30 de junho de 2018, foram notificadas ao Ministério da Saúde 7.412 epizootias em PNH, sendo 752

confirmadas laboratorialmente. No mesmo período foram notificados 6.589 casos humanos suspeitos de FA, dos quais 1.266 foram confirmados e 415 evoluíram para o óbito (letalidade de aproximadamente 32,8%) (BRASIL, 2018b).

A doença geralmente se manifesta após um período de incubação de três a sete dias. Os casos brandos da doença são caracterizados por uma doença febril, já os casos mais graves apresentam uma doença aguda incluindo sintomas como febre, calafrios, mialgia, fraqueza, náuseas, vômitos e icterícia. Estas manifestações clínicas, muitas vezes, são seguidas por hemorragia do sistema digestório e falência renal e hepática. Entre os pacientes que apresentam icterícia é observada uma taxa de letalidade de 20 – 25% (FONSECA; FIGUEIREDO, 2005).

2.7.1.3 Vírus Zika

O VZIK foi isolado pela primeira vez a partir do soro de um PNH do gênero *Rhesus* durante ações de vigilância sentinela de FA na Floresta Zika na Uganda (África) em 1947. Posteriormente, o vírus foi isolado a partir de *pool* de mosquitos *Aedes africanus* na mesma floresta no ano de 1948. A infecção humana foi relatada pela primeira vez entre os anos de 1947 e 1948 a partir da detecção de anticorpos neutralizantes em soro de residentes da África Ocidental (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; SMITHBURN, 1952).

Posteriormente, o vírus causou infecções esporádicas em seres humanos em diferentes países, principalmente nos continentes Africano e Asiático. Em 2007 foi relatado o primeiro surto da doença fora destes continentes, na região da Micronésia. Apesar de cerca de 70% da população da Ilha de Yap ter sido infectada, nenhuma hospitalização ou morte foi registrada na região devido à infecção causada pelo vírus (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009).

Casos de infecções foram relatadas no Camboja em 2010, nas Filipinas em 2012 e na Tailândia em 2012 e 2014 (HEANG et al., 2012; ALERA et al., 2015; BUATHONG et al., 2015). Na Polinésia Francesa, em 2013, foi a primeira vez que a infecção pelo vírus foi associada a doenças graves, mas nenhuma morte foi registrada. Este surto ocorreu concomitantemente a um surto do VDEN sorotipos 1 e 3 (CAO-LORMEAU et al., 2014; IOOS et al., 2014; OEHLER et al., 2014), o que pode ter contribuído para o agravamento dos quadros clínicos dos indivíduos infectados.

A partir do ano de 2013 começaram a surgir também casos de infecções importadas em outras regiões do mundo: Alemanha, Canadá, Estados Unidos, Austrália, Japão, Itália e Noruega (KWONG; DRUCE; LEDER, 2013; FONSECA et al., 2014; KUTSUNA et al., 2014; WÆHRE et al., 2014; SUMMERS; ACOSTA; ACOSTA, 2015; ZAMMARCHI et al., 2015). Em 2014 foi relatada a transmissão autóctone do vírus da Ilha de Páscoa (Chile) (TOGNARELLI et al., 2016) sendo o primeiro relato de transmissão autóctone no continente americano.

A partir do ano de 2015 foi confirmada a transmissão autóctone do vírus no território brasileiro no município de Natal, no estado do Rio Grande do Norte (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016) que posteriormente se dispersou por todas as unidades federativas do país.

As informações mais recentes sobre os casos de infecção pelo vírus demonstram a capacidade extraordinária que este vírus tem de se dispersar rapidamente para áreas não-endêmicas em todo o mundo (HAMEL et al., 2016).

O vírus é transmitido principalmente por mosquitos, mas outras formas de transmissão, como a transmissão por transfusão sanguínea, provável transmissão sexual e perinatal estão sendo estudadas.

Dada a propagação rápida a nível mundial e a epidemia ocorrida na América Latina e no Caribe, a infecção causada pelo VZIK é agora considerada como uma doença infecciosa emergente (HAMEL et al., 2016), pois tem surgido em locais nunca antes relatados. Em 1º de fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou emergência pública global devido à ameaça causada pelo vírus (WHO, 2016a).

Os sintomas associados com a infecção causada pelo VZIK são variáveis. A infecção é assintomática em até 80% dos casos e quando os sintomas ocorrem são normalmente brandos e não-específicos. Estes incluem leve febre, conjuntivite, *rash* maculopapular, mialgia e dor de cabeça (HAYES, 2009). No entanto, no surto vivenciado no Brasil um potencial *link* entre a infecção causada pelo VZIK e um aumento da ocorrência de alguns efeitos neurológicos graves, tais como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia foi identificado (RABAAN et al., 2017). Não há vacinas, terapias ou medicamentos preventivos disponíveis no momento (MALONE et al., 2016).

Relatos de altas taxas de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré associadas à infecção pelo VZIK na Polinésia Francesa e no Brasil têm levantado

preocupações de que o vírus que circula nessas regiões é uma ameaça emergente à Saúde Pública. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) prevê que o VZIK continuará a se espalhar e, eventualmente, chegar a todos os países e territórios no continente Americano que tenham a presença de mosquitos do gênero *Aedes* (MALONE et al., 2016).

Os mosquitos, principalmente aqueles pertencentes ao gênero *Aedes*, se alimentam do sangue de diversas espécies de animais e também de seres humanos, o que pode contribuir para aumentar a taxa de transmissão do vírus, bem como a ocorrência de infecções simultâneas e a recombinação e rearranjo do material genético de cepas do vírus (KUNO; CHANG, 2005).

As incertezas sobre a transmissão do VZIK ainda são enormes. O grau em que os seres humanos e outros animais podem amplificar e transmitir o vírus para os vetores é pouco compreendida. A gama de insetos vetores observados no passado pode não ser preditiva para o vírus que circula atualmente. Além disso, a infectividade da estirpe que circula, os níveis de viremia, a duração e o risco de persistência do vírus ainda não são totalmente compreendidos (MALONE et al., 2016).

Uma grande preocupação, portanto, ainda é a falta de compreensão acerca dos vetores competentes para a transmissão do vírus, o que dificulta o controle, a vigilância e a elaboração de programas de intervenção (VOROU, 2016). Sendo assim, há uma necessidade urgente de se identificar os vetores potenciais do vírus em áreas vulneráveis, a fim de facilitar o controle de surtos da doença (HAMEL et al., 2016).

No Brasil foram registrados 216.207 casos prováveis de febre pelo VZIK em 2016, e em 2017 foram registrados 17.594 casos. Até a SE 10 de 2018, foram registrados 1.174 casos prováveis de febre pelo vírus, destes, 197 e um óbito no estado da Paraíba foram confirmados. Em relação à infecção em gestantes, foram registrados 202 casos prováveis, sendo 24 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial até a SE 10 de 2018 (BRASIL, 2018).

2.7.1.4 Vírus da *Febre do Nilo Ocidental*

O vírus foi isolado pela primeira vez no distrito de West Nile, na Uganda, no ano de 1937. Em 1957, houve a primeira indicação, a partir de casos de encefalite registrados em Israel, de que esse vírus seria capaz de causar danos ao sistema nervoso central (KOMAR, 2003; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004).

O VFNO é um vírus originário do Velho Mundo que foi introduzido nas Américas há pouco mais de uma década.

O vírus foi isolado de carcaças de pássaros nos Estados Unidos em 1999 e análises genéticas do vírus encontrado indicaram que o vírus era oriundo do Oriente Médio. Esse vírus se adaptou a diferentes vetores e hospedeiros presentes nos Estados Unidos, se espalhando rapidamente pelo país (KOMAR, 2003; FIGUEIREDO, 2007). No ano de 2002 ocorreu o ápice do surto, com mais de 4.000 casos de encefalite e 284 óbitos registrados. Na mesma ocasião, foram registrados também 15.000 casos de encefalite em equinos e mais de 16.000 pássaros foram encontrados mortos (KOMAR, 2003; CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004).

Em poucos anos, o vírus se dispersou por quase toda a extensão da América do Norte se movimentando em direção ao sul. No ano de 2001, o vírus foi detectado nas Ilhas Cayman, em 2002 na ilha de Guadalupe e no México, nos anos de 2003 e 2004 em El Salvador e Cuba, em 2005 na Colômbia e em 2006 na Argentina (MARLENEE et al., 2004; MATTAR et al., 2005; FARFÁN-ALE et al., 2006; MORALES et al., 2006; PUPO et al., 2006).

O vírus é mantido em ciclos silvestres incluindo mosquitos e hospedeiros vertebrados. Nos Estados Unidos, os principais vetores são mosquitos do gênero *Culex* (FIGUEIREDO, 2007). As aves silvestres são os principais hospedeiros do VFNO, muitas delas são aves migratórias, possível razão pela qual o vírus se disseminou tão rapidamente pela América (FIGUEIREDO, 2007). Mamíferos, incluindo humanos e equinos são considerados hospedeiros incidentais desse vírus (CASTILLO-OLIVARES; WOOD, 2004, FIGUEIREDO, 2007).

No Brasil, em 2011, foi relatada a primeira evidência sorológica do VFNO em equinos na região do Pantanal Mato-Grossense, e, como nenhum dos equinos analisados possuía histórico de viagens para fora do Pantanal, foi confirmada a infecção autóctone (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011).

O vírus também foi detectado em aves no estado do Mato Grosso do Sul e em equinos no estado da Paraíba (MELANDRI et al., 2012; SILVA et al., 2013). Em 2014 foi confirmado o primeiro caso de VFNO em humanos no Brasil, um trabalhador de área rural no estado do Piauí que apresentou sintomas clínicos de encefalite aguda (VIEIRA et al., 2015).

Dentro desse contexto, existe a hipótese da ocorrência de possíveis surtos do VFNO no Brasil, uma vez que existem aves já conhecidas como hospedeiras do vírus

nas áreas urbanas do país, além da ocorrência de aves migratórias provenientes do hemisfério Norte e da ampla dispersão de mosquitos do gênero *Culex*.

2.7.1.5 Vírus da *Encefalite Saint Louis*

O vírus da *encefalite Saint Louis* é amplamente difundido entre os países da América, tanto em países de clima tropical como naqueles de clima temperado. As infecções causadas por este vírus em seres humanos são caracterizadas por uma doença aguda que varia desde uma síndrome febril a encefalites que apresentam altas taxas de letalidade.

Até o ano de 2005 haviam sido identificados apenas três casos da encefalite no Brasil, porém no ano de 2006 foram confirmados casos de infecção pelo vírus da *encefalite Saint Louis* durante um surto de Dengue que ocorreu no estado de São Paulo (MONDINI et al., 2007).

Infecções pelo vírus também foram detectadas em PNH e equinos no estado do Paraná (SVOBODA et al., 2014) e em equinos na região do Pantanal no estado do Mato Grosso do Sul (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2010) e em Minas Gerais (ROSA et al., 2013). Casos de infecções em humanos foram registrados no Mato Grosso durante um surto de Dengue, onde o vírus foi isolado também de mosquitos do gênero *Culex* spp. (HEINEN et al., 2015).

Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Culex* que possuem hábitos ornitófilos e primatófilos (LOPES et al., 1979; IVERSSON, 1994; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

2.7.1.6 Vírus *Rocio*

O vírus *Rocio* é caracterizado principalmente pela sua capacidade de causar casos de encefalite com altas taxas de mortalidade em humanos. No ano de 1975 foi observada uma epidemia incomum de encefalite em um bairro periférico do município de Iguape, região do Vale do Ribeira, denominado Rocio (IVERSSON et al., 1983). Esta epidemia apresentou picos justamente nos meses de temperaturas mais elevadas e maior índice de pluviosidade, característica típica dos arbovírus.

A epidemia apresentou taxa de mortalidade de 10%, e cerca de 43% das pessoas infectadas apresentaram sequelas neurológicas graves como: falta de

coordenação motora, distúrbios de equilíbrio, distúrbios de memória, perturbações na acuidade visual, cegueira e surdez. As pessoas mais atingidas foram aquelas que tiveram contato com o ambiente silvestre e, conseqüentemente, contato com os hospedeiros do vírus e exposição aos vetores (IVERSSON; TIRIBA, 1997).

Os vetores ainda não são completamente conhecidos, mas acredita-se que os mosquitos que apresentam hábitos domésticos, como os mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora*, tenham influência na transmissão do vírus. Os hospedeiros vertebrados também não são totalmente definidos, mas sabe-se que as aves desempenham um importante papel no ciclo da doença (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

Acredita-se que este vírus ainda circula pelo país e o seu reaparecimento e a conseqüente ocorrência de surtos de encefalites representam uma ameaça permanente (FIGUEIREDO, 2007).

2.8 MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR

O município de Foz do Iguaçu (estado do Paraná, Brasil) é internacionalmente conhecido pelas Cataratas do Iguaçu localizadas no Parque Nacional do Iguaçu (uma das últimas reservas de Mata Atlântica nativa que existem no estado do Paraná) e também pela Usina Hidrelétrica de Itaipu (a maior hidrelétrica do mundo em produção de energia), sendo o terceiro destino mais procurado por turistas estrangeiros no Brasil (BRASIL, 2017b).

O município pertence a uma região de Tríplice Fronteira juntamente com os municípios de Ciudad del Este no Paraguai e Puerto Iguazú na Argentina, constituindo uma única área urbana com mais de 700 mil habitantes (IBGE, 2011).

Os três municípios possuem características socioeconômicas e culturais bastante distintas, mas se fundem em um único espaço urbano de grande importância comercial e intenso fluxo de pessoas e mercadorias (AQUINO JR., 2014).

No estado do Paraná, no período de agosto de 2015 a julho de 2016, foram confirmados 56.351 casos de Dengue, 73 de Chikungunya e 335 de Zika. No município de Foz do Iguaçu foram confirmados 6.537 casos de Dengue, dois de Chikungunya e dois de Zika. A incidência de casos de Dengue no estado foi de 472,17 casos por 100.000 habitantes, considerada situação de epidemia pelo Ministério da

Saúde. No município de Foz do Iguaçu a incidência foi de 2.576,78 por 100.000 habitantes e o município foi responsável por cerca de 12% do total de casos confirmados da doença no estado (PARANÁ, 2017).

No período entre agosto de 2016 a julho de 2017 foram confirmados no estado 870 casos de Dengue, 73 de Chikungunya e cinco de Zika, e 29 casos de Dengue, quatro de Chikungunya e nenhum de Zika em Foz do Iguaçu. Neste período a incidência de casos de Dengue no município foi de 12,3, representando pouco mais de 3% do total de casos de Dengue do estado (PARANÁ, 2017a).

Já no período compreendido entre agosto de 2017 a 24 de julho de 2018, foram confirmados 985 casos de Dengue no estado do Paraná, 60 de Chikungunya e de nenhum Zika, destes, 136 casos de Dengue e dois de Chikungunya foram registrados em Foz do Iguaçu. Neste período a incidência foi de 45,5 no município, representando aproximadamente 14% do total de casos confirmados no estado (PARANÁ, 2018).

O município de Foz do Iguaçu encontra-se na lista dos 30 municípios do estado do Paraná que receberam a vacina contra a Dengue.

Nos outros países pertencentes a Tríplice Fronteira, de acordo com dados da Organização Pan Americana de Saúde (2016; 2018), foram registrados no ano de 2015, 4.774 casos de Dengue na Argentina e 42 casos importados de Chikungunya. No Paraguai, no mesmo ano, foram registrados, 68.652 casos de Dengue (taxa de incidência: 976,14) e 3.418 casos de Chikungunya.

Em 2016, foram registrados na Argentina 79.455 casos de Dengue e 3.394 de Chikungunya. No Paraguai, foram registrados 70.215 casos de Dengue (taxa de incidência: 1.044,09) e 881 casos de Chikungunya (PAHO, 2017; 2018).

No ano seguinte, os números de casos de Dengue diminuíram significativamente nos dois países, sendo registrados 557 casos de Dengue na Argentina e nenhum de Chikungunya. No Paraguai, 1.832 casos de Dengue e 739 de Chikungunya foram registrados (PAHO, 2017a; 2018).

Informações mais atualizadas referentes ao ano de 2018, indicam o registro de 1.752 casos de Dengue na Argentina, enquanto que no Paraguai foram registrados 24,649 casos da doença, indicando um novo aumento do número de casos em ambos os países (PAHO, 2018).

Com relação aos casos de Zika, no período compreendido entre os anos de 2015 e 2018, foram registrados 539 casos de Zika na Argentina e 715 casos no Paraguai (PAHO, 2018a).

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas algumas espécies de arbovírus, principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Alphavirus*, *Flavivirus* e *Orthobunyavirus*, têm se tornado importantes problemas de Saúde Pública por causarem surtos e epidemias em seres humanos e por apresentarem potencial zoonótico. No entanto, os arbovírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* possuem uma distribuição mais restrita à região Amazônica, e, desta forma, não foram abordados no presente estudo.

A facilidade do deslocamento de pessoas ao redor do mundo e as condições climáticas favoráveis à proliferação de vetores associadas à diversidade de animais que podem atuar como hospedeiros de amplificação e dispersão desses vírus, em países tropicais como o Brasil, contribuem para a propagação dos arbovírus.

A detecção de arbovírus ou de novas espécies demandam a utilização de ferramentas laboratoriais eficazes e viáveis que permitam a rápida confirmação de casos de infecção durante ações de vigilância ativa. Apesar da importância dos inquéritos sorológicos em animais que possam atuar como sentinelas para a Saúde Pública, esses testes podem apresentar algumas desvantagens como a ocorrência de reações cruzadas e baixa sensibilidade.

Os métodos de biologia molecular como a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia mediada pela polimerase (RT-PCR), por exemplo, associam a alta sensibilidade do ensaio à velocidade e facilidade de execução, vantagens que são importantes tanto em programas de vigilância quanto no diagnóstico clínico dessas infecções. Além disso, esta metodologia permite a detecção do genoma viral, não dependendo da produção de anticorpos.

A detecção precoce e específica da circulação de arbovírus na natureza (em hospedeiros e vetores) é fundamental para a adoção de medidas preventivas eficazes, contribuindo para a elaboração de respostas mais rápidas e adequadas a possíveis surtos, possibilitando o bloqueio da disseminação de doenças nas populações humana e animal, diminuindo, conseqüentemente, a morbidade e mortalidade em ambas as populações.

Dentro desse contexto, a execução de estudos de epidemiologia molecular de arbovírus, análises filogenéticas e outras análises evolutivas podem ser usadas como ferramentas para a Saúde Pública contra esses patógenos. As informações fornecidas por esses estudos permitem uma melhor compreensão da evolução dos vírus, sendo

importantes para o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos, elaboração de drogas antivirais e vacinas, além de oferecerem oportunidades valiosas para melhorar a vigilância e a resposta as epidemias causadas por esses vírus.

O município de Foz do Iguaçu (estado do Paraná, Brasil) é um município mundialmente conhecido por suas atrações turísticas e pertence a uma região de Tríplice Fronteira. De acordo com o Ministério da Saúde, locais que sejam reconhecidos por seu potencial turístico ou que pertençam a regiões de fronteira são considerados áreas de risco para introdução de arbovírus e/ou novos sorotipos ou linhagens. Desta forma, o município de Foz do Iguaçu é considerado um local altamente estratégico para a investigação da circulação desses vírus.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a circulação de arbovírus de interesse em Saúde Pública em hospedeiros equinos e em população natural de vetores *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) no município de Foz do Iguaçu-PR.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contribuir com a vigilância ativa das arboviroses de interesse em Saúde Pública no município de Foz do Iguaçu-PR, pertencente a uma região de Tríplice Fronteira;
- Detectar o genoma de arbovírus (gênero *Alphavirus* e *Flavivirus*) em amostras de hospedeiros e vetores;
- Fornecer informações sobre as cepas de arbovírus de importância médica circulantes no município de Foz do Iguaçu-PR;
- Estudar o relacionamento genético/evolucionário das cepas de vírus encontradas e cepas de vírus circulantes em outras regiões do Brasil e do mundo.

5 METODOLOGIA

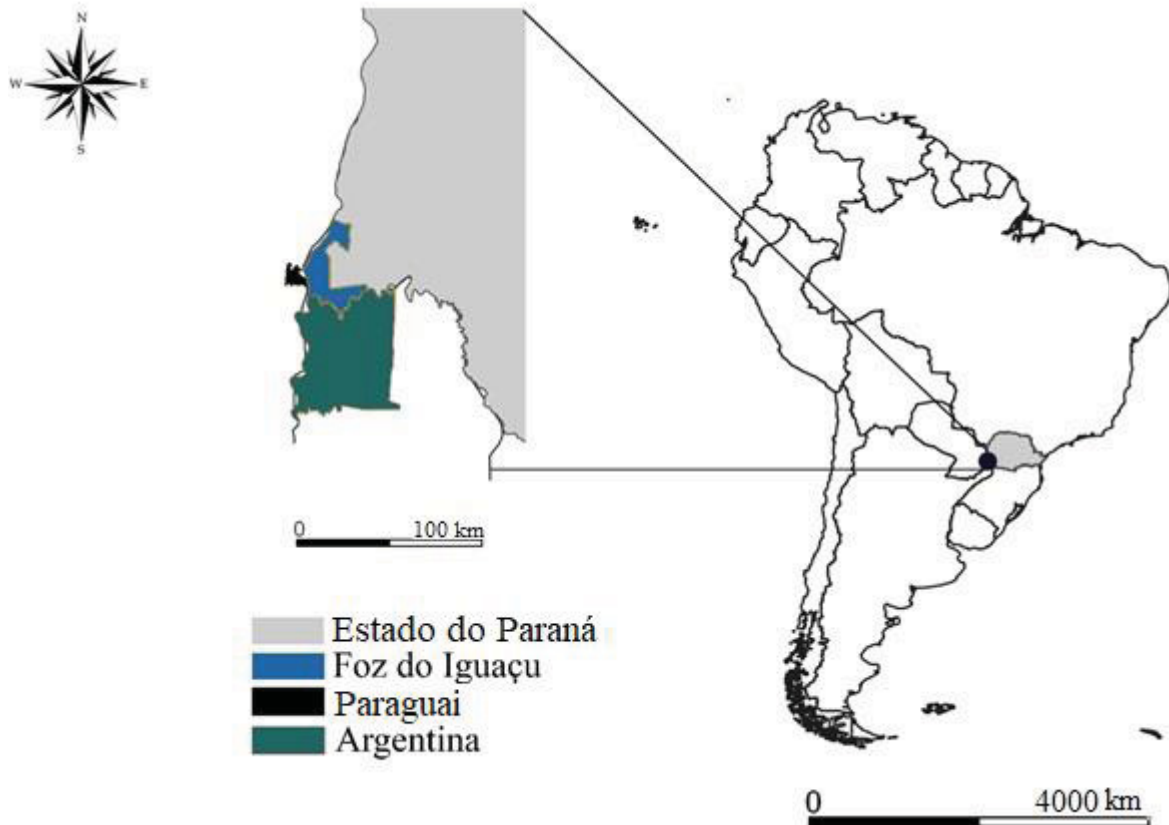
5.1 LOCAL DE ESTUDO

O município de Foz do Iguaçu está localizado geograficamente a 25° 32' 52"S e 54° 35' 17"O, na região oeste do estado do Paraná, possui uma área de 617,701 km² de extensão e está situado a 164 m de altitude. A população estimada no município para o ano de 2018 foi de 258.823 habitantes.

O clima de Foz do Iguaçu é subtropical úmido mesotérmico e a temperatura média anual é de 20,4 °C. O município tem uma das maiores amplitudes térmicas anuais do estado, cerca de 14 °C de diferença média entre o inverno e o verão. As chuvas costumam ser bem distribuídas durante o ano, com uma pequena redução no inverno, e a precipitação anual é de aproximadamente 1.900 milímetros (mm) (FOZ DO IGUAÇU, Prefeitura Municipal, 2017).

Foz do Iguaçu faz limite com o município de Itaipulândia ao norte, com o município de Puerto Iguazu (Argentina) ao sul, com os municípios de Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu e Medianeira à leste e com o município de Ciudad del Este (Paraguai) à oeste. Na região sudoeste do município, os Rios Iguaçu e Paraná se unem formando a Tríplice Fronteira entre Brasil, Argentina e Paraguai. A população estimada para o ano de 2018 dos municípios que fazem limite com Foz do Iguaçu é de 487.597 habitantes. A localização geográfica do município de Foz do Iguaçu está demonstrada na FIGURA 4.

FIGURA 4: LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, BRASIL



FONTE: O autor (2018).

5.2 AMOSTRAS DE SORO DE EQUINOS

O município de Foz do Iguaçu-PR foi incluído em um projeto de extensão intitulado 'CartHorses', que consiste em atividades educacionais para a prevenção e controle de doenças zoonóticas. Este projeto está sendo desenvolvido por pesquisadores do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná. O objetivo desse projeto é monitorar o *status* da saúde animal, principalmente em cavalos de carroceiros, uma vez que esses animais podem atuar como sentinelas e disseminadores urbanos de agentes infecciosos.

Amostras de sangue foram coletadas de 117 equinos inseridos no projeto 'CartHorses' nos anos de 2015 e 2016 por venopunção da jugular externa, utilizando-se agulhas 40 x 12 mm. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos estéreis de 10 mL sem anticoagulante para retração do coágulo. Em seguida, foram centrifugadas a 1.500 x g por cinco minutos e as amostras de soro obtidas foram transportadas em nitrogênio líquido até o laboratório, onde foram mantidas em freezer

-70 °C. Uma alíquota do soro obtido das amostras coletadas para o levantamento do perfil sanitário desses animais foi utilizada para a investigação de arbovírus

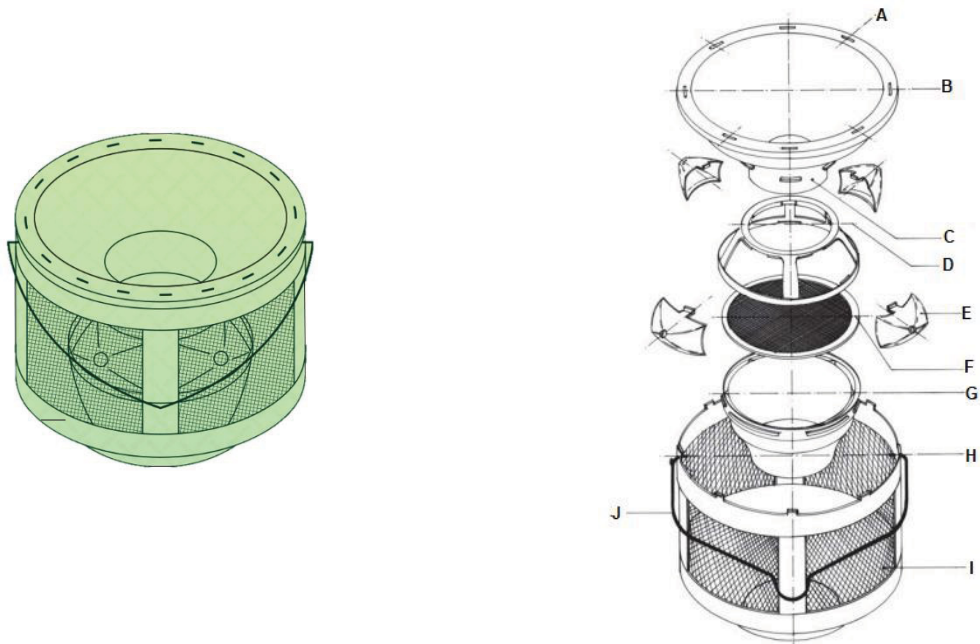
As alíquotas foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL, armazenadas e transportadas em botijão de nitrogênio até o Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (LAMFIC²) da Universidade Federal do Paraná, onde ficaram armazenadas em ultrafreezer (-70 °C) até o seu processamento que ocorreu em 30 dias.

De todos os equinos analisados (n=117), 46,1% (n=54) eram machos, 53,9% (n=63) eram fêmeas, e 56,4% (n=66) eram utilizados como ferramenta de trabalho por catadores de materiais recicláveis. Além de conviverem com seus proprietários, 76% (n=89) dos equinos utilizados no presente estudo conviviam também com outros animais, como segue: 90% (n=80) com cães, 57,3% (n=51) com aves, 42,7% (n=38) com gatos, 21,3% (n=19) com suínos, 16,8% (n=15) com bovinos e 6,7% (n=6) com caprinos ou ovinos. Destaca-se a ocorrência de óbito de aves no local onde viviam os equinos ou em locais próximos, observada por 19,3% (n=11) dos proprietários.

Todas as coletas foram realizadas por pessoal habilitado e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, nº de protocolo: 046/2016 (ANEXO 1).

5.3 AMOSTRAS DE VETORES

Os mosquitos utilizados foram coletados pela equipe do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Foz do Iguaçu-PR, nos anos de 2008, 2011, 2015 e 2016, utilizando a armadilha Adultrap® descrita por Donatti e Gomes (2007), FIGURA 5.

FIGURA 5: ARMADILHA ADULTRAP® UTILIZADA PARA CAPTURA DAS FÊMEAS DE *Aedes aegypti*

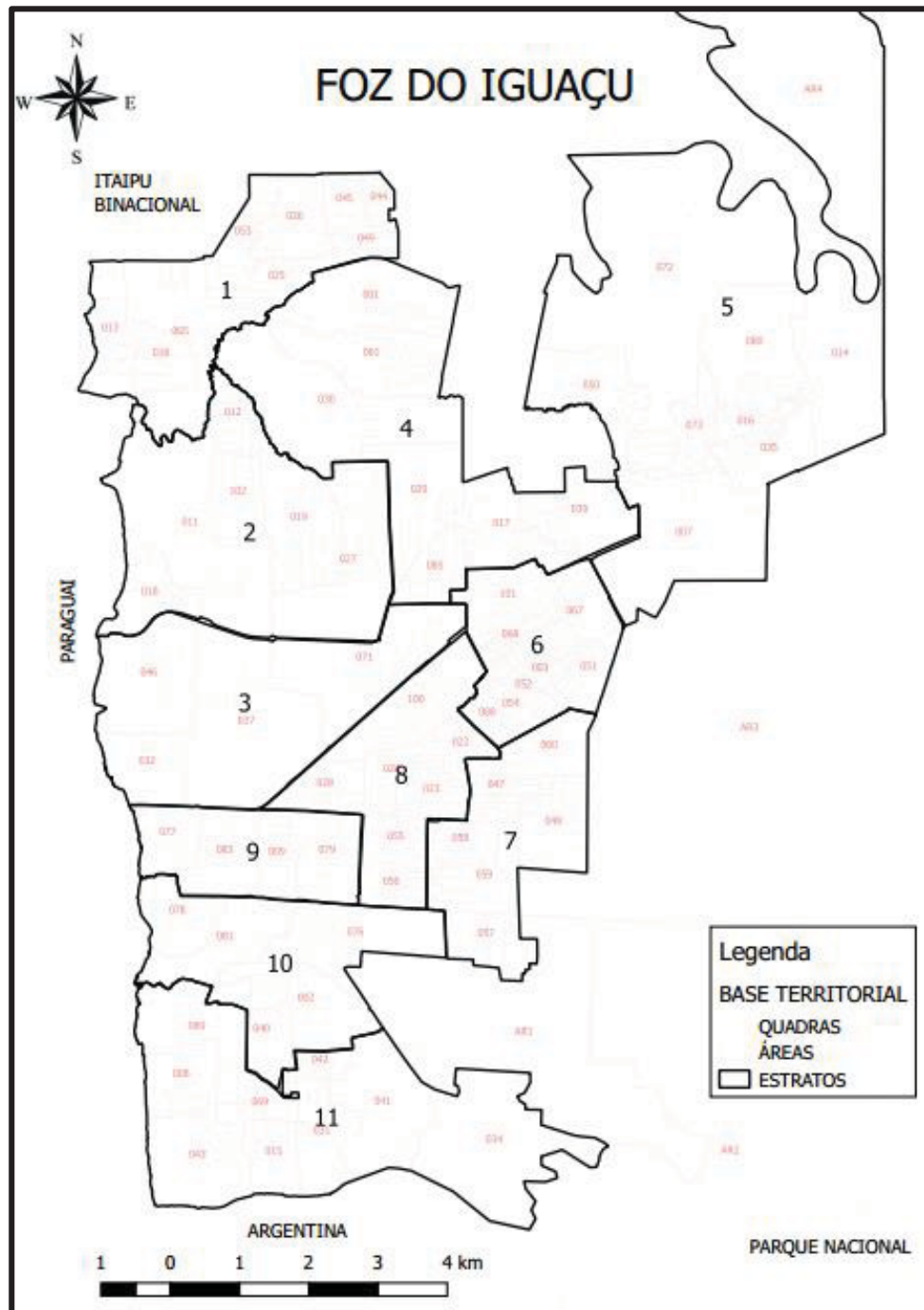
LEGENDA: Peças que compõe a armadilha Adultrap®: A: pontos de fixação, B: peça convexa superior, C: borda da peça convexa, D: peça para fixação dos cones, E: cones transparentes, F: tela, G: cuba para água, H: peça telada, I: tela, J: alça.

FONTE: Adaptado de Donatti; Gomes (2007).

Esta armadilha possui uma forma cilíndrica, cor escura, formando três compartimentos, sendo um para isca, um para entrada da fêmea adulta do mosquito e outro para retê-la dentro da armadilha. A função da armadilha é capturar formas adultas de *Aedes aegypti* utilizando a água como isca atrativa. A forma arredondada e a cor escura são consideradas estímulos visuais, simulando um local tranquilo para repouso dos mosquitos adultos, da mesma forma que a presença da água representa a condição para oviposição (DONATTI; GOMES, 2007).

Para a instalação de armadilhas Adultrap®, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) dividiu o município em 11 estratos, cada um contendo 10.000 imóveis em média, e cada estrato, por sua vez, foi subdividido em áreas que contém, em média, 1.000 imóveis cada, demonstrado na FIGURA 6.

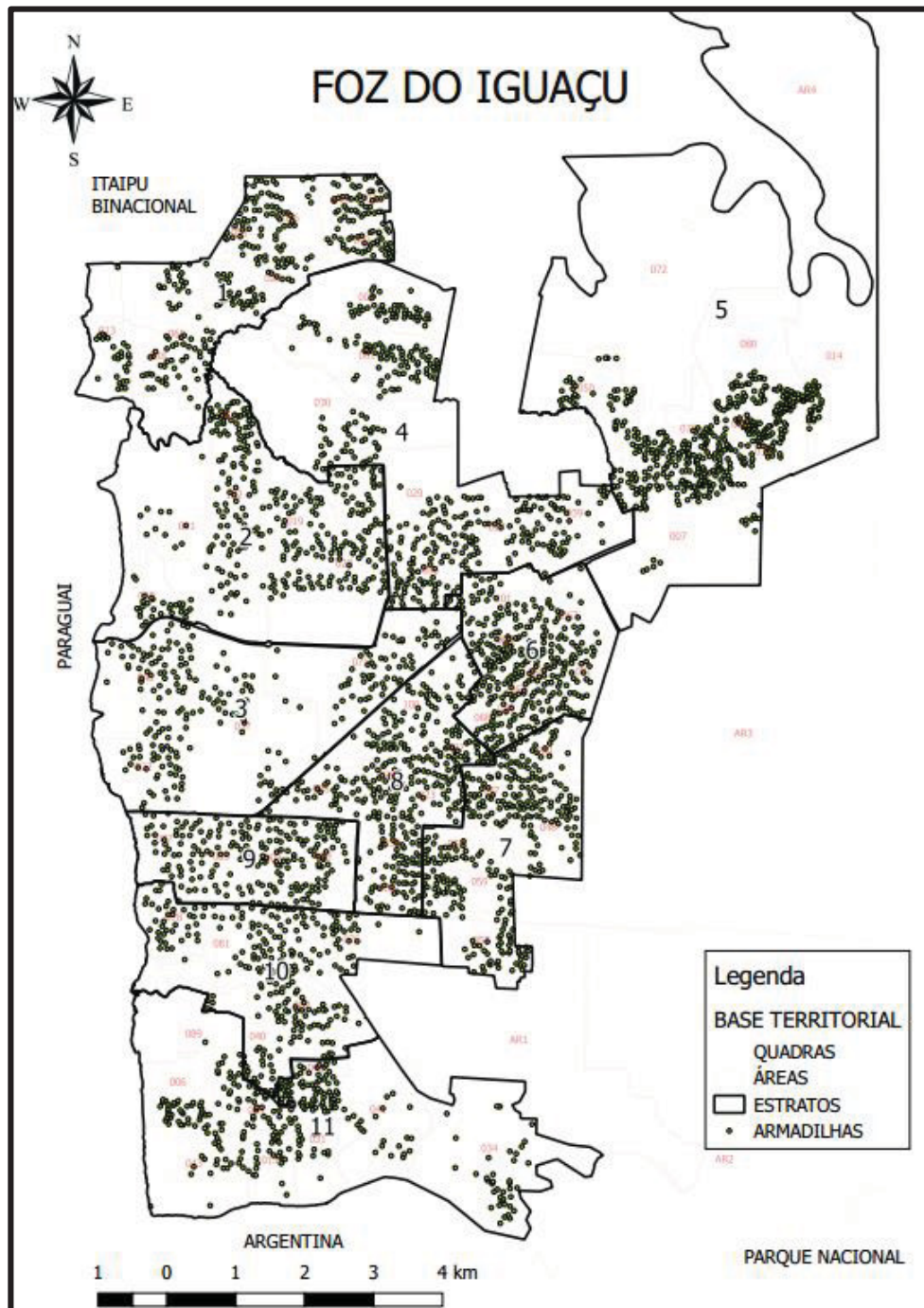
FIGURA 6: BASE TERRITORIAL DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, DIVISÃO EM ESTRATOS E ÁREAS



FONTE: Brito (2017).

Estão instaladas permanentemente no município 3.476 armadilhas no peridomicílio abrangendo todos os estratos, tendo em média uma armadilha por quarteirão, para captura de fêmeas adultas de *Aedes aegypti*, FIGURA 7.

FIGURA 7: BASE TERRITORIAL DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR, DISTRIBUIÇÃO DAS 3.476 ARMADILHAS PELO MUNICÍPIO



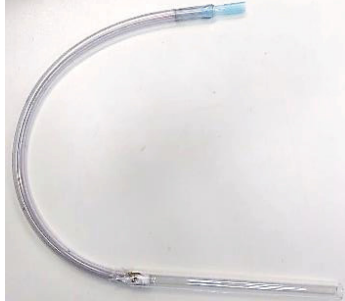
FONTE: Brito (2017).

As armadilhas foram instaladas de forma que a água da chuva entre na armadilha e funcione como atrativo para a fêmea depositar seus ovos.

Periodicamente as armadilhas eram inspecionadas pelos agentes de endemias e, durante este processo, os mosquitos foram retirados com o auxílio do capturador manual de Castro, FIGURA 8, e colocados em criotubos identificados com

as informações da localização da armadilha, a data da coleta e a quantidade de mosquitos.

FIGURA 8: CAPTURADOR MANUAL DE CASTRO



FONTE: A autora (2018).

Os criotubos contendo os mosquitos *Aedes aegypti* foram acondicionados em botijão de nitrogênio líquido e armazenados até o fim da coleta para então serem transportados ao LAMFIC² da Universidade Federal do Paraná, onde ficaram armazenados em ultrafreezer -70 °C até a triagem e processamento, que ocorreu em 30 dias.

5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

5.4.1 Preparação das amostras de soro de equinos

As 117 amostras de soro de equinos obtidas foram aliqüotadas e as informações referentes ao sexo, a sua utilização como ferramenta de trabalho por catadores de materiais recicláveis e a convivência destes equinos com outros animais foram tabuladas.

5.4.2 Preparação das amostras de vetores

Os mosquitos foram agrupados de acordo com a localização da armadilha (estrato e área) e a data da coleta. Em seguida, a presença apenas de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* foi confirmada pela presença de antenas não plumosas e aparelho bucal sugador, utilizando a chave taxonômica elaborada por Consoli e Oliveira (1994) com auxílio de microscópio estereoscópio por pessoal habilitado.

Foram obtidos 75 *pools*, contendo entre 1–12 fêmeas de *Aedes aegypti*, totalizando 428 mosquitos.

Cada *pool* foi triturado com 200 µL de tampão PBS 1x utilizando homogeneizador de plástico autoclavável e centrifugado por 30 minutos a 6.000 rpm e 0 °C para a sedimentação das carcaças dos mosquitos. O sobrenadante foi utilizado para a extração de RNA viral.

5.4.3 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral das alíquotas de soro de equinos foi realizada utilizando-se o QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, EUA) conforme as especificações do fabricante.

Em microtubos estéreis de 1,5 mL foram adicionados 560 µL de tampão de lise e 5,6 µL da substância carreadora de RNA, em seguida foram adicionados 140 µL de amostra (soro dos equinos). Os microtubos foram agitados em vortex por 15 segundos e centrifugados rapidamente (*spin*) e, em seguida, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 560 µL de etanol absoluto e os microtubos foram novamente agitados em vortex por 15 segundos e centrifugados rapidamente (*spin*). Após essa etapa, 630 µL da solução anterior foram adicionados nas colunas fornecidas pelo kit que foram centrifugadas a 8.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, as colunas foram acondicionadas em um novo tubo coletor e o passo anterior foi repetido. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 nas colunas que foram centrifugadas a 8.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Em seguida, 500 µL do tampão AW2 foram adicionados nas colunas que foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos. O filtrado foi descartado e as colunas foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto. Após esta etapa, foram adicionados 40 µL do tampão de eluição nas colunas que ficaram incubadas em temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida foram centrifugadas a 8.000 rpm por 1 minuto. Após o descarte do filtrado, o último passo foi repetido.

Após a extração, foi realizada a leitura da concentração do RNA viral recuperado de cada uma das amostras no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

O mesmo procedimento de extração foi realizado utilizando-se 140 µL dos sobrenadantes obtidos a partir da trituração e sedimentação das carcaças dos *pools* de *Aedes aegypti*.

Após esta etapa, as amostras extraídas foram testadas para a verificação da presença de arbovírus dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* por meio da reação de RT-PCR gênero específica.

5.4.4 Primers utilizados para amplificação do genoma de *Alphavirus* e *Flavivirus*

Para a amplificação do genoma dos arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* foram utilizados *primers* previamente descritos na literatura. Foi utilizado o par de *primers* descrito por Pfeffer e colaboradores (1997) para amplificar a região do genoma que codifica a proteína não estrutural 1 (NS1) dos *Alphavirus* e, para amplificação dos *Flavivirus*, foi utilizado o par de *primers* descrito por Maher-Sturgess e colaboradores (2008) que amplifica a região do genoma que codifica a proteína não estrutural 5 (NS5), TABELA 1.

TABELA 1: SEQUÊNCIAS DOS PARES DE PRIMERS UTILIZADOS NA ETAPA DE SCREENING DA PRESENÇA DO GENOMA DE *Alphavirus* E *Flavivirus* NAS AMOSTRAS DE EQUINOS E VETORES OBTIDAS EM FOZ DO IGUAÇU-PR

Gene alvo	Primer	Sequência	Tamanho do fragmento
NS1 (<i>Alphavirus</i>)	Sm2w (forward)	YAG AGC DTT TTC GCA YST RGC HW	432 pb
	Cm3w (reverse)	ACA TRA ANK GNG TNG TRT CRA. ANC CDA YCC	
NS5 (<i>Flavivirus</i>)	Flav 100F (forward)	AAY TCI ACI CAI GAR ATG TAY	Aprox. 800 pb
	Flav 200R (reverse)	CCI ARC CAC ATR WAC CA	

FONTE: Pfeffer et al. (1997); Maher-Sturgess et al. (2008).

LEGENDA: pb: pares de base

As amostras utilizadas neste estudo como controles positivos foram os vírus *Chikungunya* (gênero *Alphavirus*), *Dengue* sorotipo 1 e *Febre Amarela* (gênero *Flavivirus*) gentilmente cedidas pelo Instituto Evandro Chagas, Ananindeua-PA, Brasil.

5.4.5 Protocolos de RT-PCR utilizados

5.4.5.1 Protocolo de RT-PCR utilizado para amplificação do genoma de arbovírus do gênero *Alphavirus*

Para o estabelecimento do protocolo de RT-PCR a ser seguido para o processamento das amostras de soro de equinos e de *pools* de *Aedes aegypti*, o controle positivo do vírus *Chikungunya* foi testado utilizando modificações de protocolos descritos na literatura até que fosse possível a amplificação do fragmento de 432 pb utilizando 2.000 ng de RNA viral.

Sendo assim, o protocolo estabelecido foi o seguinte:

Para a realização da reação de transcrição reversa e obtenção cDNA, 2.000 ng de RNA extraído de cada amostra e 0,4 µL do *primer* Cm3w a 50 pmol/µL foram colocados em microtubos de 0,2 mL estéreis que foram levados ao termociclador por 5 min a 70 °C. Em seguida, os tubos foram retirados do termociclador e colocados em banho de gelo por 5 min. Foram adicionados 4 µL do tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM], 2 µL de dNTPs a 10 mM, 2 µL de DTT a 0,1 M e 200 U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV RT (Thermo Fisher Scientific, EUA), o volume foi completado para 20 µL com água Milli-Q autoclavada. As amostras retornaram para o termociclador a 42 °C por 90 min e a 70 °C por 15 min.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 3 µL do cDNA previamente obtido, 5 µL do tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 1 µL do *primer* Cm3w a 50 pmol/µL, 1 µL do *primer* Sm2w a 50 pmol/µL, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs a 10 mM e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, EUA), o volume foi completado para 50 µL com água Milli-Q autoclavada. Por fim, as amostras retornaram ao termociclador a 95 °C por 5 min e em seguida, 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 53 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, finalizando com uma última etapa a 72 °C por 10 min.

Um controle positivo e um controle negativo foram analisados juntamente com as amostras.

5.4.5.2 Protocolo de RT-PCR utilizado para amplificação do genoma de arbovírus do gênero *Flavivirus*

Para o estabelecimento do protocolo de RT-PCR a ser seguido no processamento das amostras de soro de equinos e de *pools* de *Aedes aegypti*, os controles positivos do VDEN-1 e VFA foram testados utilizando modificações de protocolos descritos na literatura até que fosse possível a amplificação do fragmento de cerca de 800 pb utilizando 2.000 ng de RNA viral.

Sendo assim, o protocolo estabelecido foi o seguinte:

Para a realização da reação de transcrição reversa e obtenção de cDNA, 2.000 ng do RNA extraído de cada amostra e 0,8 μL do *primer* Flav200R a 50 pmol/ μL foram colocados em microtubos de 0,2 mL estéreis que foram levados ao termociclador por 5 min a 70 °C. Em seguida, os tubos foram retirados do termociclador e colocados em banho de gelo por 5 min. Foram adicionados 4 μL do tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM], 2 μL de dNTPs a 10 mM, 2 μL de DTT a 0,1 M e 200 U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV RT (Thermo Fisher Scientific, EUA), o volume foi completado para 20 μL com água Milli-Q autoclavada. As amostras retornaram para o termociclador a 42 °C por 90 min e a 70 °C por 15 min.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 3 μL do cDNA previamente obtido, 5 μL do tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 1 μL do *primer* Flav200R a 25 pmol/ μL , 1 μL do *primer* Flav100F a 25 pmol/ μL , 3 μL de MgCl₂ (25 mM), 1 μL de dNTPs a 10 mM e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, EUA), o volume foi completado para 50 μL com água Milli-Q autoclavada. Por fim, as amostras retornaram ao termociclador a 95 °C por 5 min e em seguida, 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 53 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, finalizando com uma última etapa a 72 °C por 10 min.

Um controle positivo e um controle negativo foram analisados juntamente com as amostras.

5.4.6 Análise do produto da PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando aparato de eletroforese convencional e visualizados em transiluminador

com emissão de luz UV. Os produtos amplificados correram juntamente com um marcador de peso molecular de 100 pb, controle negativo e um controle positivo durante 60 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 70 V e 140 mA, respectivamente. As amostras analisadas que se mostraram positivas durante esta etapa foram purificadas e encaminhadas para a realização do sequenciamento genético.

5.4.7 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA) seguindo as especificações do fabricante, como segue:

Nas colunas fornecidas pelo kit foram adicionados 100 µL do Tampão PB e 20 µL dos produtos de PCR, em seguida foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 min. O filtrado foi descartado e 750 µL do Tampão PE foram adicionados nas colunas que foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 1 min. O filtrado foi descartado e as colunas foram acondicionadas em microtubos estéreis de 1,5 mL e foram centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 1 min. Em seguida, 25 µL do tampão de eluição EB foram adicionados nas colunas que foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Após esta etapa, as colunas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 min.

A leitura da concentração dos produtos de PCR purificados foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

5.4.8 Sequenciamento genético

Os produtos de PCR purificados (concentração: 20 – 25 ng/µL) foram encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para a realização do sequenciamento genético pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977) para identificação da espécie de arbovírus encontrada. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.4.9 Obtenção das sequências consenso

As sequências *forward* e *reverse* obtidas pelo sequenciamento foram editadas manualmente utilizando o software Bioedit v. 7 (HALL, 1999). Depois de editadas, estas sequências foram enviadas para o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) onde foi gerada a sequência consenso que foi comparada com outras sequências disponíveis no *Genbank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) por meio da ferramenta *nucleotide BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), a fim de identificar a espécie de arbovírus encontrada.

5.4.10 Seleção dos genes de interesse para análise filogenética

Após a confirmação da espécie de arbovírus detectada nas amostras foi realizado um levantamento na literatura a fim de verificar quais seriam os genes de interesse para a realização de análises filogenéticas para a espécie de vírus encontrada. Desta forma, foram selecionados os genes CprM (região da junção do gene do capsídeo com o gene pré-membrana) e do Envelope (GONÇALVEZ et al., 2002; LAILLE; ROCHE, 2004; CERDAS-QUESADA; RETANA-SALAZAR, 2007; KLUNGTHONG et al., 2008; WEAVER; VASILAKIS, 2009; BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012; BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2015; DRUMOND et al., 2016), além do gene que foi previamente amplificado na etapa anterior de *screening*.

O gene do capsídeo (C) é responsável por um aprimoramento da infecção, é o alvo da resposta de anticorpos, responsável pela entrada viral via interações proteína-proteína/membrana-proteína, montagem viral e estabilização da proteína do envelope (WANG; HE; ANDERSON, 1999; LINDENBACH; RICE, 2003; NEMESIO; VILLALAIN, 2014; SMITH et al., 2015; RODPOTHONG et al., 2016).

O gene pré membrana (prM) é responsável pelo encapsulamento do RNA, acondicionamento e liberação do genoma viral, crescimento viral, replicação e formação das partículas virais (AMBERG; RICE, 1999; CLYDE; BARRERA; HARRIS, 2008; VASILAKIS et al., 2011; SAMSA et al., 2012).

Já o gene do envelope (E), é responsável pela ligação celular, fusão, antigenicidade e infectividade (MODIS et al., 2004; VASILAKIS et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

5.4.10.1 Protocolo de RT-PCR para amplificação do gene CprM

Para a realização da Transcrição Reversa e obtenção de cDNA, 2.000 ng do RNA viral de cada amostra positiva e 0,8 μ L do *primer* D2 a 50 pmol/ μ L foram colocados em microtubos de 0,2 mL estéreis que foram levados ao termociclador por 5 min a 70 °C. Em seguida, os tubos foram retirados do termociclador e colocados em banho de gelo por 5 min. Foram adicionados 4 μ L do tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM], 2 μ L de dNTPs a 10 mM, 2 μ L de DTT a 0,1 M e 200 U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV RT (Thermo Fisher Scientific, EUA), o volume foi completado para 20 μ L com água Milli-Q autoclavada. As amostras retornaram para o termociclador a 42 °C por 60 min e a 95 °C por 10 min.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 3 μ L do cDNA previamente obtido, 5 μ L do tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 2 μ L do *primer* D1 a 25 pmol/ μ L, 2 μ L do *primer* D2 a 25 pmol/ μ L, 3 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de dNTPs a 10 mM e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, EUA), o volume foi completado para 50 μ L com água Milli-Q autoclavada. Por fim, as amostras retornaram ao termociclador a 95 °C por 5 min e em seguida, 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, finalizando com uma última etapa a 72 °C por 10 min.

Os *primers* utilizados foram descritos por Lanciotti e colaboradores (1992). Um controle positivo e um controle negativo foram analisados juntamente com as amostras.

5.4.10.2 Protocolo de RT-PCR para amplificação do gene Envelope

Para a realização da Transcrição Reversa e obtenção de cDNA, 2.000 ng do RNA viral extraído de cada amostra e 0,8 μ L do *primer* D1-2600-AS a 50 pmol/ μ L foram colocados em microtubos de 0,2 mL estéreis que foram levados ao termociclador por 5 min a 70 °C. Em seguida, os tubos foram retirados do termociclador e colocados em banho de gelo por 5 min. Foram adicionados 4 μ L do tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM], 2 μ L de dNTPs a 10 mM, 2 μ L de DTT a 0,1 M e 200 U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV RT (Thermo Fisher Scientific, EUA), o volume foi completado para 20 μ L com água Milli-

Q autoclavada. As amostras retornaram para o termociclador a 42 °C por 60 min e a 95 °C por 10 min.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 5 µL do cDNA previamente obtido, 5 µL do tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 2 µL do *primer* D1-820-S a 25 pmol/µL, 2 µL do *primer* D1-2600-AS a 25 pmol/µL, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs a 10 mM e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems, EUA), o volume foi completado para 50 µL com água Milli-Q autoclavada. Por fim, para a obtenção dos produtos, as amostras retornaram ao termociclador a 95 °C por 5 min e em seguida, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, finalizando com uma última etapa a 72 °C por 10 min.

Os *primers* utilizados foram descritos por Gonçalves e colaboradores (2002). Um controle positivo e um controle negativo foram analisados juntamente com as amostras.

5.4.10.3 Análise do produto da PCR

Os produtos obtidos da amplificação dos dois genes citados (CprM e Envelope) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando aparato de eletroforese convencional e visualizados em transiluminador com emissão de luz UV. Os produtos amplificados correram juntamente com um marcador de peso molecular de 100 pb, controle negativo e um controle positivo durante 60 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 70 V e 140 mA, respectivamente. O tamanho dos fragmentos esperados da amplificação dos genes CprM e Envelope eram 511 pb e 1485 pb, respectivamente.

5.4.10.4 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando-se o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA) seguindo as especificações do fabricante, conforme descrito anteriormente.

A leitura da concentração dos produtos de PCR purificados foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

5.4.10.5 Sequenciamento genético

Os produtos de PCR purificados referentes à amplificação dos genes CprM e do Envelope (concentração: 20 – 25 ng/μL) foram encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para a realização do sequenciamento genético pelo método de Sanger (SANGER et al., 1977) para confirmação da amplificação dos genes desejados e realização das análises filogenéticas. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o ABI 3730 DNA Analyser (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.4.10.6 Obtenção das sequências consenso

As sequências *forward* e *reverse* obtidas pelo sequenciamento do gene CprM e do gene Envelope foram editadas manualmente utilizando o software Bioedit v. 7 (HALL, 1999). Depois de editadas, estas sequências foram introduzidas no software MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) onde foi gerada a sequência consenso que foi comparada com outras sequências disponíveis no *Genbank* (NCBI) por meio da ferramenta *nucleotide* BLAST.

5.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a realização das análises filogenéticas foi criado um banco de dados contendo sequências dos genes de interesse e de genomas completos pertencentes a espécie de vírus identificada disponíveis no *Genbank*. Foram incluídas também sequências de diferentes genótipos do vírus, que foram utilizadas como grupo externo (APÊNDICE I). O banco de dados formado contém as informações referentes ao código de acesso no *Genbank* das sequências utilizadas, nome da cepa, país de origem e ano de isolamento.

Todas as sequências presentes no banco de dados, incluindo as sequências obtidas neste estudo, foram alinhadas separadamente de acordo com cada gene utilizando a ferramenta ClustalW implementada no pacote MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Após o alinhamento, as sequências foram cortadas a

fim de se recuperar apenas a região correspondente ao gene de interesse para realização das análises filogenéticas.

Para a seleção estatística do melhor modelo de substituição nucleotídica, os alinhamentos correspondentes a cada gene foram introduzidos no software Jmodeltest v. 2 (DARRIBA, et al., 2012), que compara os escores entre diferentes modelos de substituição de DNA ligados hierarquicamente, fazendo buscas e encontrando o modelo que melhor se enquadra para o conjunto de dados em questão (POSADA; CRANDAL, 1998), seguindo o *Akaike Information Criterion* (AIC).

Para avaliar se o sinal temporal das sequências utilizadas para a elaboração das análises filogenéticas é suficiente e identificar a possível presença de sequências cuja divergência genética e data de amostragem são incongruentes foi utilizado o programa TempEst, que utiliza uma abordagem de regressão interativa para explorar a associação entre divergência genética ao longo do tempo e datas de amostragem (RAMBAUT et al., 2016).

Os filogramas foram obtidos pelo método de inferência bayesiana utilizando-se o programa *Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees* (BEAST) v. 1.8 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Os arquivos de entrada para o programa BEAST foram criados com a interface gráfica BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) v. 1.6 (DRUMMOND et al., 2012) utilizando a data de isolamento de cada sequência utilizada como calibração, relógio molecular estrito e *coalescent constant size* como *Tree prior*.

As árvores foram amostradas a cada dez mil, resultando em um arquivo final com 10.000 árvores que foram resumidas, descartando os primeiros 10% das árvores amostradas (*burn-in*: 10%), em uma árvore de máxima credibilidade (*Maximum Clade Credibility* – MCC) usando o Programa TreeAnnotator v. 1.8 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2016). A árvore final foi visualizada no programa FigTree v. 1.4 (RAMBAUT, 2016).

A análise de *Marginal Likelihood Estimation* utilizando *Path sampling* e *Stepping-stone sampling* para a definição do melhor modelo de relógio molecular e *Tree prior* para cada gene foi realizada utilizando-se a interface gráfica BEAUti v. 1.6 (DRUMMOND et al., 2012), *number of phat steps*=100 e um milhão de cadeias. O arquivo foi rodado no programa BEAST v. 1.8 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007).

A partir da definição do melhor relógio molecular e *Tree prior* para cada gene, foram elaborados novos filogramas bayesiana utilizando-se o programa *Bayesian*

Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) v. 1.8 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007) com a interface gráfica BEAUti (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*) v. 1.6 (DRUMMOND et al., 2012). As árvores foram amostradas a cada dez mil, resultando em um arquivo final com 10.000 árvores que foram resumidas, descartando os primeiros 10% das árvores amostradas (*burn-in*: 10%), em uma árvore de máxima credibilidade (*Maximum Clade Credibility* – MCC) usando o Programa TreeAnnotator v. 1.8 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2016). A árvore final utilizando o melhor modelo e relógio molecular e *Tree prior* para cada gene foi visualizada no programa FigTree v. 1.4 (RAMBAUT, 2016).

Para cada gene também foi determinada a distância evolutiva entre as cepas que compõe os diferentes clados e agrupamentos que foram obtidos a partir dos filogramas elaborados na etapa anterior. Para isso, o número absoluto e a porcentagem de substituições nucleotídicas foram calculados utilizando o programa MEGA v. 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e estatisticamente apoiados por 1.000 réplicas de *bootstrap*.

A taxa de mudanças evolutivas (substituição de nucleotídeos/sítio/ano) e o tempo de divergência (estimativa da idade do ancestral comum mais recente - ACMR) foram estimados utilizando o algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), que utiliza inferências bayesianas, utilizando-se o programa BEAST v. 1.8 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Os arquivos de entrada para o programa BEAST foram criados com a interface gráfica BEAUti v. 1.6 (DRUMMOND et al., 2012), dez milhões de cadeias foram executadas e a convergência de parâmetros durante o MCMC foi inspecionada utilizando o Programa Tracer v. 1.6 (RAMBAUT et al., 2013), com as incertezas abordadas em intervalos de maior densidade de credibilidade (*Highest Posterior Density* – HPD) de 95% *a posteriori*.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das 117 amostras de soro de equinos utilizadas para a investigação da presença do genoma de arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, nenhuma das amostras analisadas apresentou bandas características que pudessem indicar a presença do genoma desses vírus na etapa de eletroforese em gel de agarose 1%, durante a fase de *screening*. Sendo assim, essas amostras foram consideradas negativas e, conseqüentemente, não foram encaminhadas para a realização de sequenciamento genético.

Sabe-se que o ciclo silvestre dos arbovírus é responsável pela manutenção desses vírus na natureza, trazendo riscos para a população humana que entra em contato com o os hospedeiros e vetores que participam destes ciclos. Desta forma, quanto mais as ações humanas avançam em direção ao *habitat* silvestre, mais expostos os seres humanos se tornam. Além disso, as alterações do ambiente natural podem resultar na adaptação dos arbovírus a novos hospedeiros e vetores, fazendo com que esses vírus desenvolvam novos ciclos de transmissão (VASCONCELOS et al., 1992; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997; BATISTA et al., 2012, LIANG; GAO; GOULD, 2015).

Evidências evolutivas demonstram que os arbovírus mais frequentemente associados a epidemias urbanas (VDEN, VCHIK, VZIK) emergiram a partir de focos enzoóticos, sendo transmitidos a humanos em zonas de emergência, de onde se disseminaram para centros urbanos e localizações geográficas distintas (WEAVER, 2013).

Ações de vigilância ativa em animais são capazes de fornecer um meio de reconhecimento precoce da circulação de agentes zoonóticos, prevenindo a ocorrência de doenças em seres humanos, proporcionando respostas mais adequadas a surtos, diminuindo, conseqüentemente, a morbidade e mortalidade nas populações humana e animal (GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008). Dada a importância dos animais, principalmente mamíferos, como hospedeiros de agentes patogênicos humanos, as ações de vigilância nestes animais se tornam essenciais para a compreensão e gerenciamento de ameaças de doenças emergentes (KUIKEN et al., 2005; WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005; KARESH et al., 2012).

Parcerias firmadas entre organizações de conservação da vida animal e de Saúde Pública têm o potencial de causar um forte impacto na previsão e prevenção

do surgimento de doenças humanas por meio do monitoramento da transmissão de patógenos na natureza. No entanto, há uma falta crítica tanto de conhecimento sobre a prevalência de infecções por arbovírus em populações animais quanto o potencial papel que estes animais desempenham na manutenção desses vírus (KADING et al., 2013).

O propósito da vigilância de doenças emergentes é identificar as mudanças na infecção e/ou estado de saúde das populações animal e humana, tornando essencial o fornecimento de evidências rigorosas da ausência da doença ou a determinação da prevalência do patógeno. Desta forma, para o entendimento das doenças zoonóticas ser bem sucedido, a falta de integração entre a medicina humana e veterinária precisa ser eliminada (HUKIĆ, et al., 2010).

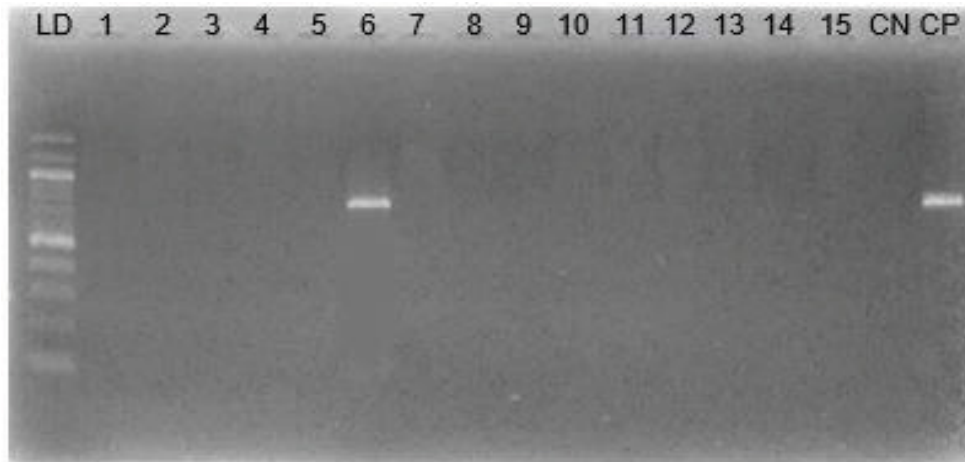
Os mamíferos, principalmente equinos e PNH, podem atuar como hospedeiros de diversos arbovírus, e, além disso, o fato de os hospedeiros de muitas arboviroses não serem ainda totalmente conhecidos ressaltam ainda mais a importância da elaboração de estudos que investiguem a circulação de arbovírus nesses animais.

Os animais utilizados no presente estudo podem atuar como hospedeiros e disseminadores urbanos de agentes infecciosos, como arbovírus. A maioria desses animais circulam pelo município, regressando ao ambiente rural no fim do dia, somando-se a isso, o fato de o município de Foz do Iguaçu pertencer a uma região de Tríplice Fronteira de importância turística e econômica, destacam a importância da execução de estudos de vigilância ativa de arbovírus nestes animais.

Com relação aos *pools* de mosquitos fêmeas de *Aedes aegypti*, dos 75 *pools* analisados (total de mosquitos: 428), nenhum apresentou bandas características da amplificação do gene que codifica a proteína não estrutural 1 (NS1) de *Alphavirus* na etapa de eletroforese em gel de agarose 1%, durante a fase de *screening*.

No entanto, dois *pools* (2,67%) apresentaram bandas características da amplificação do gene que codifica a proteína não estrutural 5 (NS5) de *Flavivirus*, como demonstrado nas FIGURAS 9 e 10. As informações referentes a estes *pools* estão descritas na TABELA 2.

FIGURA 9: VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-15) DE POOLS DE *Aedes aegypti* PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR

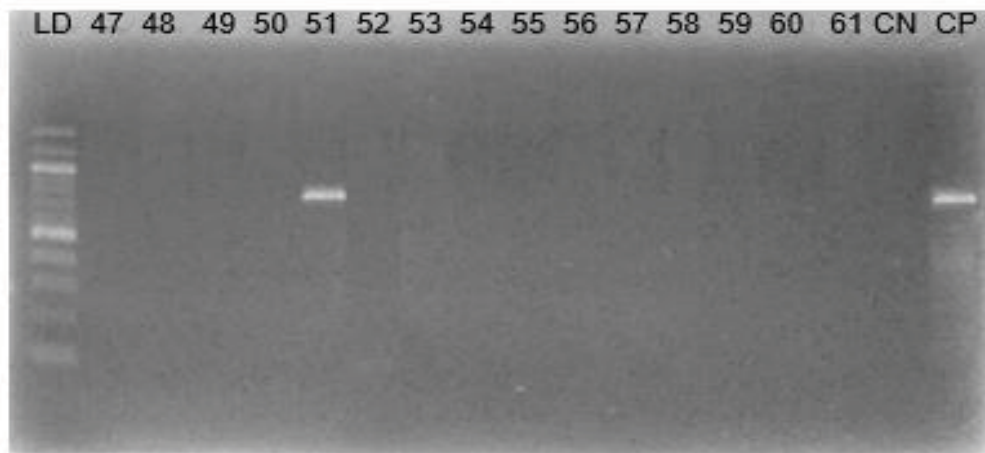


FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

NOTA: Amostra 6 positiva para *Flavivirus*

FIGURA 10: VISUALIZAÇÃO EM GEL DE AGAROSE 1% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (47-61) DE POOLS DE *Aedes aegypti* PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR



FONTE: O autor (2018).

LEGENDA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

NOTA: Amostra 51 positiva para *Flavivirus*

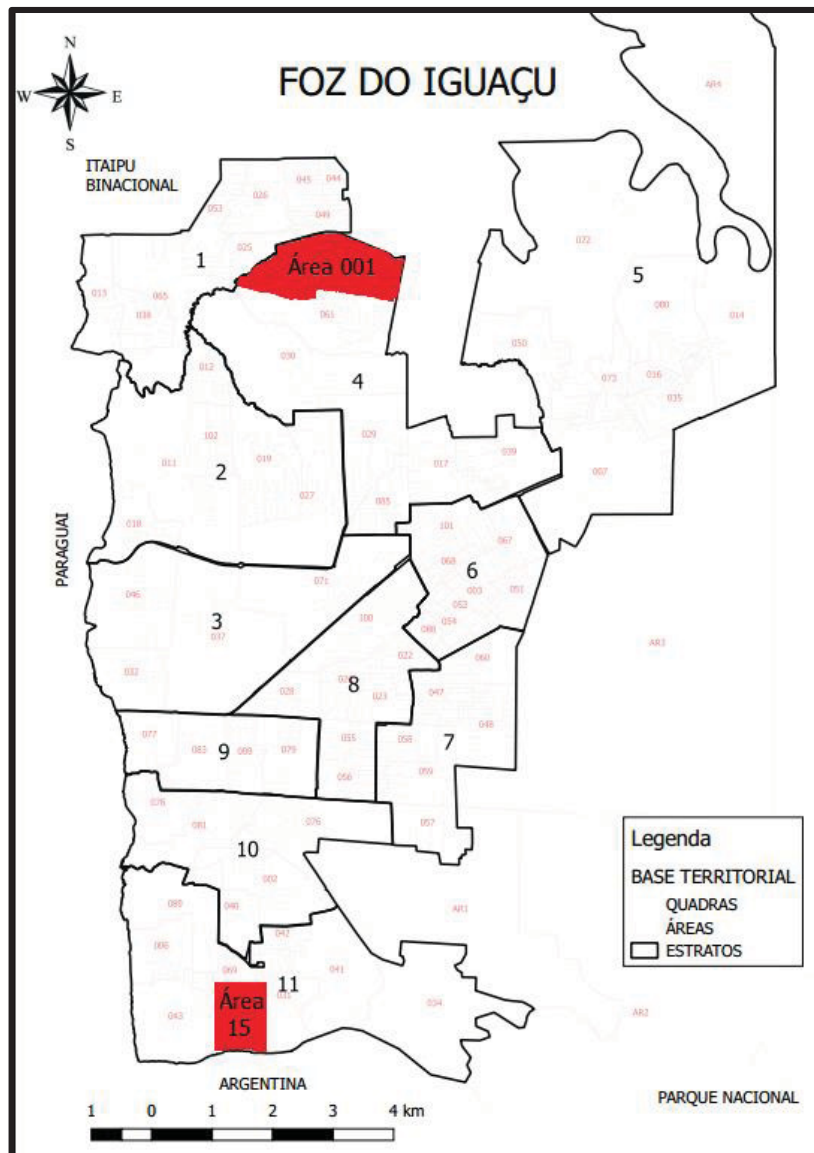
TABELA 2: INFORMAÇÕES DOS POOLS DE *Aedes aegypti* POSITIVOS PARA A PRESENÇA DO GENOMA DE *Flavivirus* OBTIDOS EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Nº da amostra	Estrato	Área	Número de mosquitos por pool	Data de coleta
06	04	001	11	11/02/2016
51	11	15	06	04/03/2016

FONTE: O autor (2018).

A localização dos estratos e das respectivas áreas de onde os *pools* nº 06 e 51 foram coletados estão identificadas na FIGURA 11. As duas áreas fazem parte de regiões do município que apresentam condições sociais e ambientais vulneráveis.

FIGURA 11: IDENTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR ONDE ESTAVAM LOCALIZADAS AS ARMADILHAS QUE CAPTURARAM FÊMEAS DE *Aedes aegypti* POSITIVAS PARA PRESENÇA DO GENOMA DE *Flavivirus* NO ANO DE 2016



FONTE: Adaptado de Brito (2017).

Os produtos de PCR provenientes dos *pools* que foram positivos para presença do genoma de *Flavivirus* foram purificados e enviados para sequenciamento genético do gene NS5. Após a edição das sequências *forward* e *reverse* e obtenção da sequência consenso, foi verificado por meio da ferramenta *nucleotide* BLAST no *Genbank*, que se tratava da presença do vírus Dengue sorotipo 1 nos dois casos.

Após a identificação da espécie de *Flavivirus*, os genes que codificam as proteínas CprM e Envelope das duas amostras positivas também foram amplificados, purificados e sequenciados para a execução das análises filogenéticas.

As sequências consenso obtidas pelo sequenciamento parcial do gene NS5, pelo sequenciamento do gene CprM e pelo sequenciamento parcial do gene Envelope foram depositadas no *Genbank*, os números de acesso encontram-se na TABELA 3.

TABELA 3: NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DEPOSITADAS NO *GENBANK* REFERENTES AOS GENES NS5, CPRM E ENVELOPE OBTIDAS DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

	Nº de acesso <i>Genbank</i>		
	Gene NS5	Gene CprM	Gene Envelope
Pool nº 06	MG783591	MG772819	MG798795
Pool nº 51	MG783592	MG783590	MG798796

FONTE: O autor (2018).

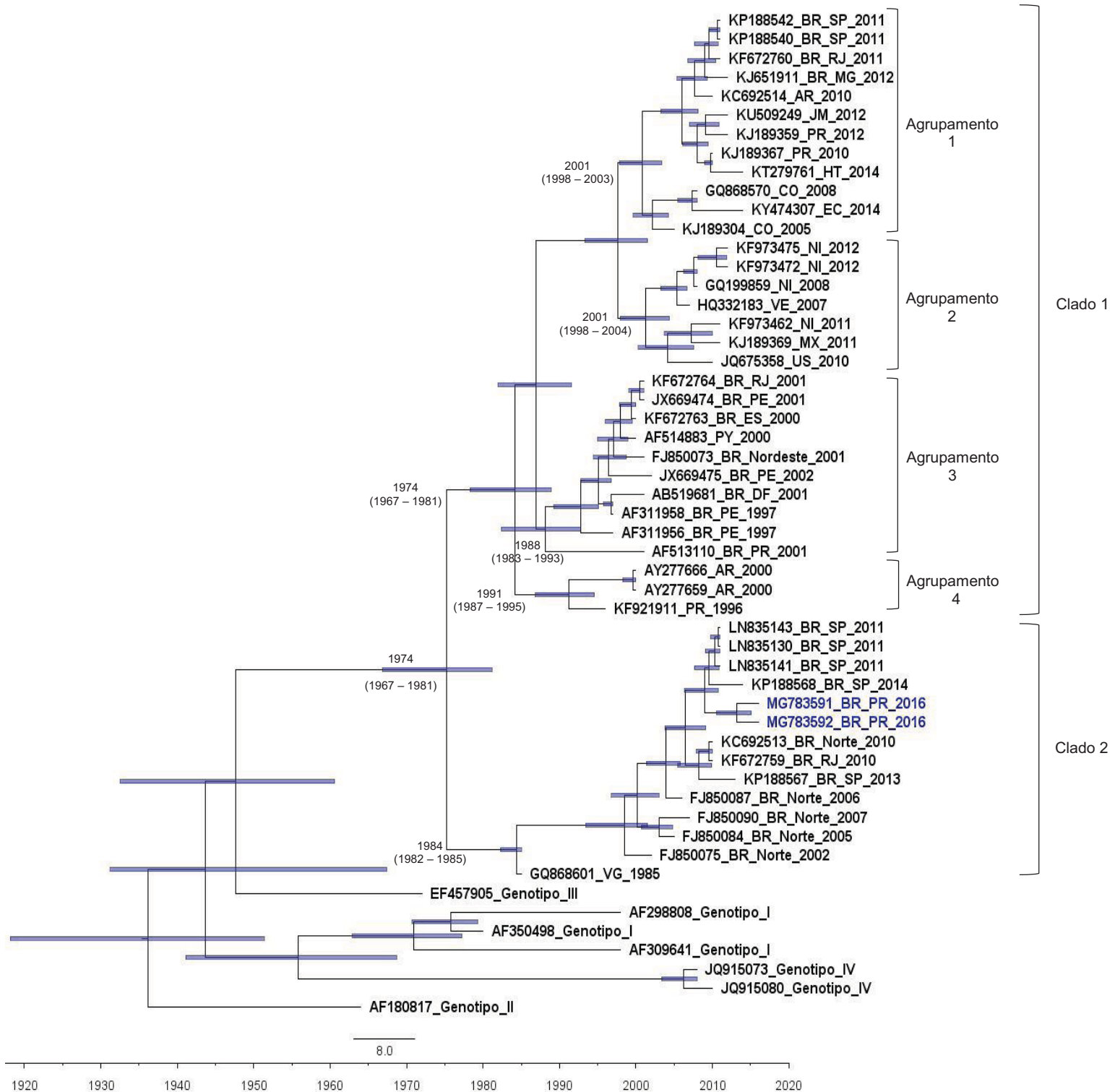
O sequenciamento do RNA do VDENVEN a partir de amostras de vetores ou de soro de seres humanos ou animais é considerado o primeiro passo para as análises epidemiológicas moleculares do vírus (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE et al., 2016).

Mais recentemente, os métodos filogenéticos bayesianos que utilizam software como o *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees* (BEAST) tornaram-se amplamente disponíveis (DRUMMOND et al., 2012). Os métodos bayesianos podem incorporar modelos evolutivos complexos, incluindo aqueles que descrevem a dinâmica populacional, a variação nas taxas de evolução molecular e a migração pelo espaço (RAMBAUT et al., 2016). Como tal, as árvores filogenéticas inferidas no BEAST podem fornecer informações valiosas sobre a data de origem das linhagens virais, conhecida como o ancestral comum mais recente (ACMR) (POLLETT et al., 2018).

As análises realizadas utilizando o programa TempEst resultaram em um valor de $r^2=1$ para os três genes analisados, indicando uma boa amostragem temporal das sequências utilizadas no presente estudo para a elaboração das análises filogenéticas.

Pelas análises filogenéticas realizadas foi possível observar a formação de agrupamentos muito semelhantes em todos os filogramas obtidos, como pode ser observado nas FIGURAS 12, 13, 14 e 15.

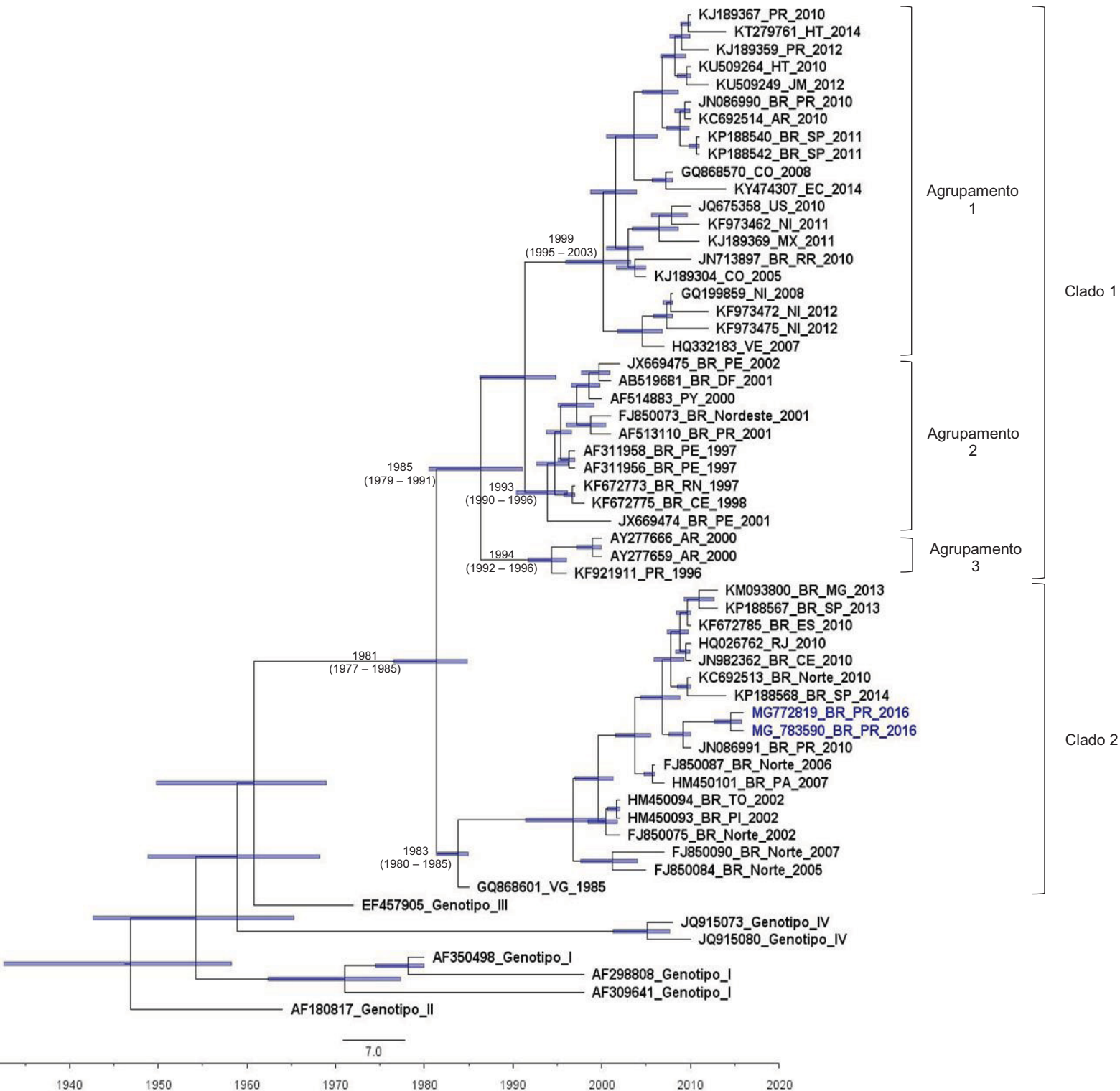
FIGURA 12: FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016



FONTE: O autor (2018).

NOTA: As sequências referentes ao genótipo V do vírus Dengue sorotipo 1 estão descritas pelo número de acesso no *Genbank*, seguido da sigla de cada país, região ou estado (no caso de cepas brasileiras) e ano de isolamento. As amostras obtidas neste estudo estão destacadas em azul. A análise foi realizada utilizando o relógio molecular estricto e *coalescent constant size* como *Tree prior*. As barras sobre os nós correspondem ao intervalo de HPD 95%. A escala se refere ao número de substituições por sítio. A data do ancestral comum mais recente dos principais nós está indicada, os valores descritos abaixo se referem ao intervalo de HPD 95%.

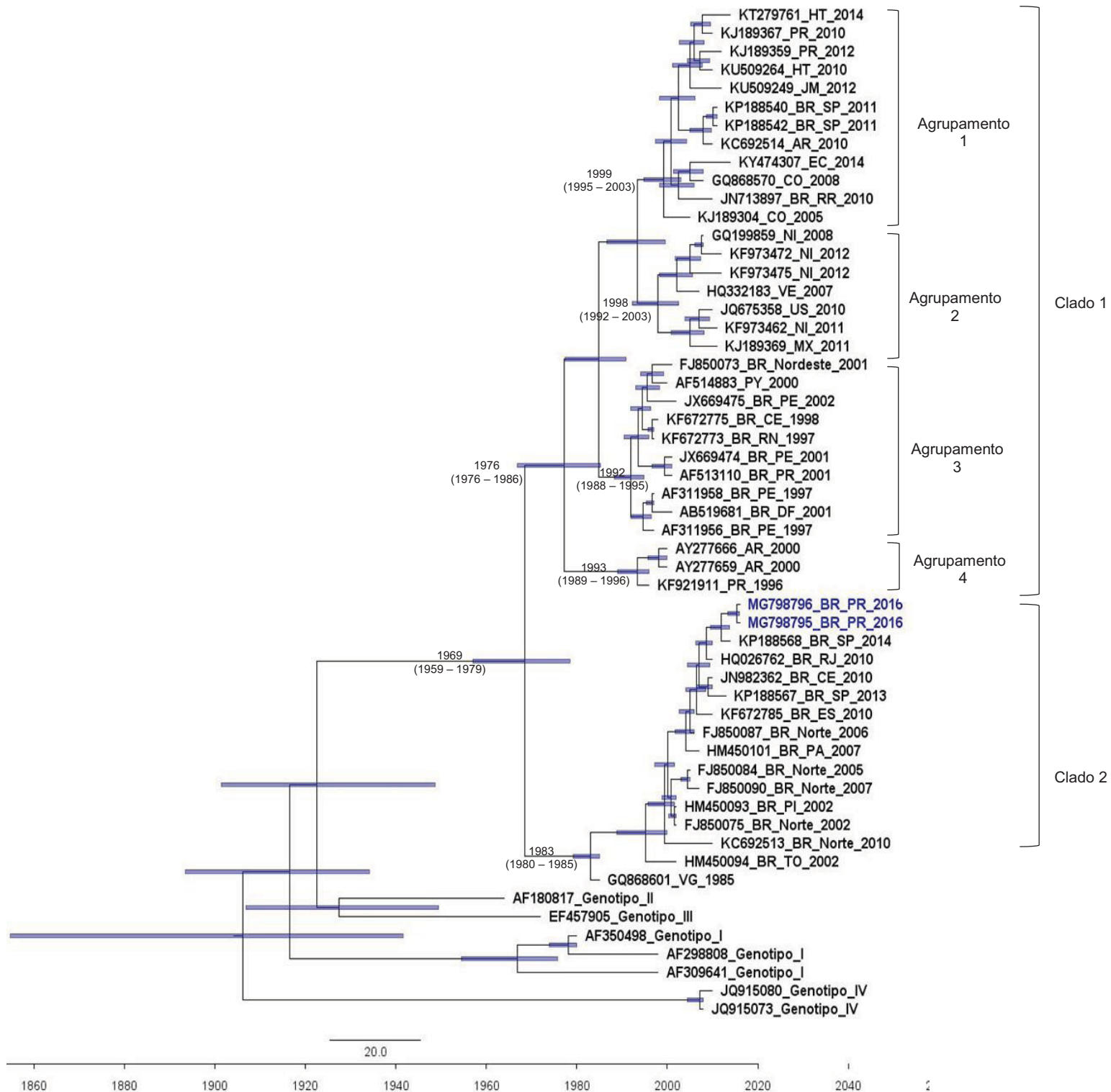
FIGURA 13: FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016



FONTE: O autor (2018)

NOTA: As sequências referentes ao genótipo V do vírus Dengue sorotipo 1 estão descritas pelo número de acesso no *Genbank*, seguido da sigla de cada país, região ou estado (no caso de cepas brasileiras) e ano de isolamento. As amostras obtidas neste estudo estão destacadas em azul. A análise foi realizada utilizando o relógio molecular estrito e *Bayesian Skyline* como *Tree prior*. As barras sobre os nós correspondem ao intervalo de HPD 95%. A escala se refere ao número de substituições por sítio. A data do ancestral comum mais recente dos principais nós está indicada, os valores descritos abaixo se referem ao intervalo de HPD 95%.

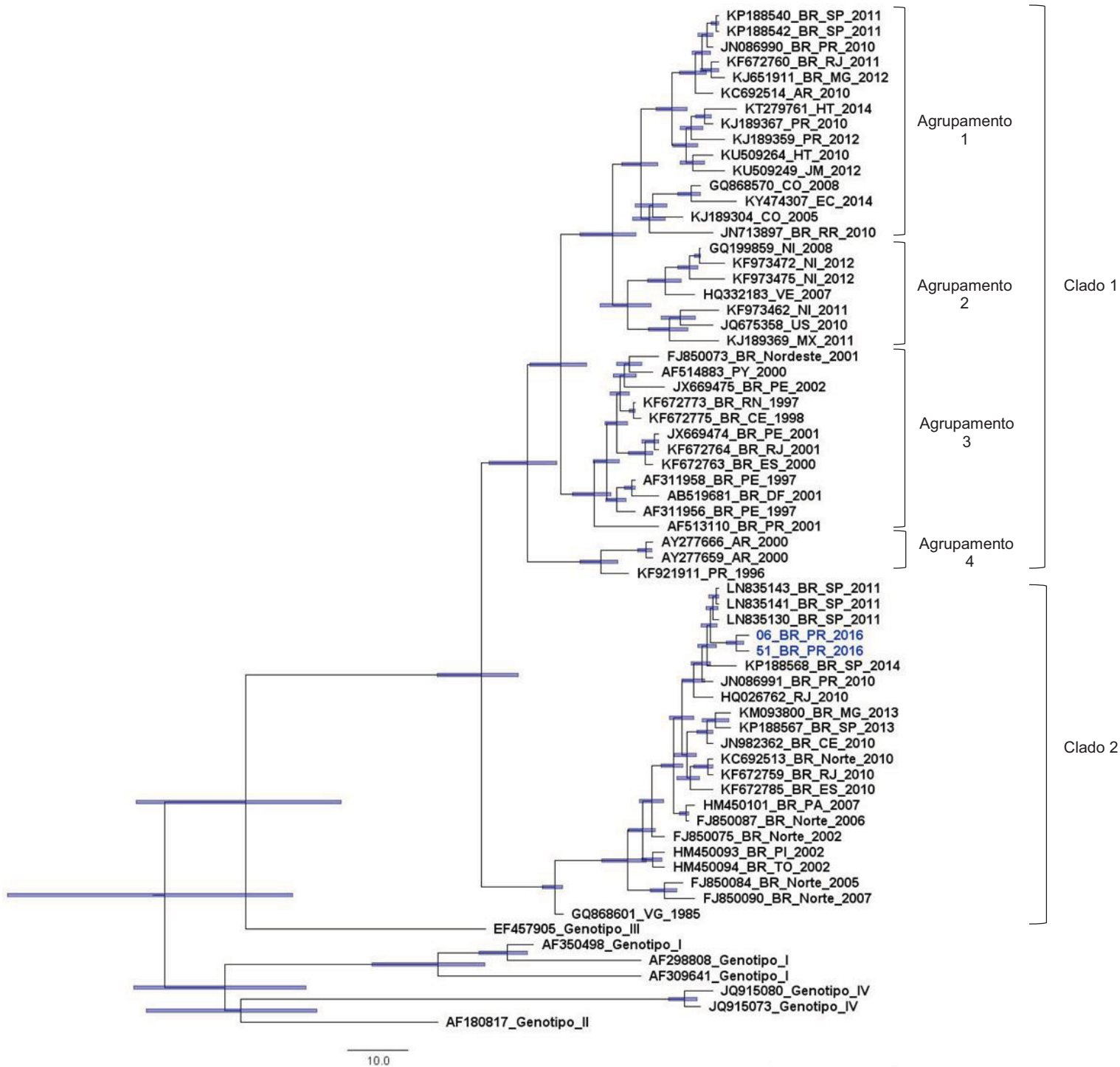
FIGURA 14: FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016



FONTE: O autor (2018)

NOTA: As sequências referentes ao genótipo V do vírus Dengue sorotipo 1 estão descritas pelo número de acesso no *Genbank*, seguido da sigla de cada país, região ou estado (no caso de cepas brasileiras) e ano de isolamento. As amostras obtidas neste estudo estão destacadas em azul. A análise foi realizada utilizando o relógio molecular estrito e *coalescent constant size* como *Tree prior*. As barras sobre os nós correspondem ao intervalo de HPD 95%. A escala se refere ao número de substituições por sítio. A data do ancestral comum mais recente dos principais nós está indicada, os valores descritos abaixo se referem ao intervalo de confiança de HPD 95%.

FIGURA 15: FILOGRAMA OBTIDO PELA ANÁLISE FILOGENÉTICA CONCATENADA DOS GENES NS5, CprM E ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADO NO MUNICÍPIO DE FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016



FONTE: O autor (2018)

NOTA: As sequências referentes ao genótipo V do vírus Dengue sorotipo 1 estão descritas pelo número de acesso no *Genbank*, seguido da sigla de cada país, região ou estado (no caso de cepas brasileiras) e ano de isolamento. As amostras obtidas neste estudo estão destacadas em azul. A análise foi realizada utilizando o relógio molecular estrito e *exponencial* como *Tree prior*. As barras sobre os nós correspondem ao intervalo de HPD 95%. A escala se refere ao número de substituições por sítio.

Analisando os filogramas obtidos pode-se inferir que as cepas isoladas neste estudo fazem parte do genótipo V do VDEN sorotipo 1, como já era esperado, uma vez que este é o único genótipo conhecido por circular no continente Americano (SANTOS et al., 2011; ALLICOCK et al., 2012; BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012; CARNEIRO et al., 2012; DRUMOND et al., 2012; VILLABONA-ARENAS; ZANOTTO, 2013; TITTARELLI; MISTCHENKO; BARRERO, 2014).

Apesar disso, existe a possibilidade de outros genótipos terem sido introduzidos no país, e que por motivos que ainda não foram esclarecidos, não se estabeleceram (VILLABONA-ARENAS; ZANOTTO, 2013). Devido à dinâmica viral, sabe-se que um genótipo tende a se sobrepor a outro, no entanto, evidências da circulação de dois ou mais genótipos em uma mesma região geográfica aumentam ainda mais os riscos de desenvolvimento de epidemias e formas graves da doença (ALLICOCK et al., 2012).

A partir dos filogramas obtidos neste estudo também foi possível observar que as cepas pertencentes ao genótipo V utilizadas para a realização das análises filogenéticas se dividiram em dois cladogramas principais: um clado que contém cepas provenientes de diferentes países da América do Norte, Central e do Sul, inclusive do Brasil (Clado 1), e o outro que contém cepas brasileiras e apenas uma cepa estrangeira, proveniente das Ilhas Virgens Britânicas (Clado 2).

Pelo fato de o município de Foz do Iguaçu estar localizado em uma região de Tríplice Fronteira, com intenso fluxo de pessoas provenientes tanto de cidades e países vizinhos quanto de turistas provenientes de diversas regiões do mundo, poderia se esperar que as cepas do VDEN isoladas no presente trabalho pudessem estar relacionadas com cepas circulantes no Paraguai e/ou Argentina ou em outros países do continente americano.

No entanto, após a realização das análises filogenéticas observou-se que os vírus identificados neste estudo agruparam-se no segundo clado (Clado 2), que contém cepas brasileiras e apenas uma estrangeira, proveniente das Ilhas Virgens Britânicas, que pode ser considerada como ancestral, indicando uma provável origem caribenha destas cepas brasileiras (DRUMOND et al., 2012).

Desta forma, foi possível inferir que as cepas isoladas em Foz do Iguaçu em 2016 estão mais proximamente relacionadas com estas cepas brasileiras de provável origem caribenha do que com as cepas que circulam na Argentina, Paraguai ou nos demais países do continente.

Nos filogramas obtidos pela análise dos genes NS5, Envelope e dos três genes concatenados foi observado que o primeiro clado (Clado 1), composto por cepas provenientes de diversos países da América do Norte, Central e do Sul, inclusive do Brasil, se dividiu em quatro agrupamentos.

O primeiro agrupamento (Agrupamento 1) foi formado por cepas provenientes de países da América do Norte como Haiti, Porto Rico e Jamaica e de países da América do Sul como Brasil, Argentina, Equador e Colômbia. O segundo agrupamento (Agrupamento 2) foi formado por cepas provenientes de países da América do Norte como Estados Unidos, México e Nicarágua e por uma cepa proveniente da Venezuela. O terceiro agrupamento (Agrupamento 3) foi formado por cepas brasileiras e por uma cepa proveniente do Paraguai, e o quarto agrupamento (Agrupamento 4) foi formado por cepas provenientes da Argentina e de Porto Rico.

Em contrapartida, ao analisarmos o filograma obtido a partir da análise do gene CprM, podemos observar a divisão do primeiro clado (Clado 1) em apenas três agrupamentos. O primeiro agrupamento (Agrupamento 1) foi formado por cepas provenientes de diferentes países da América do Norte, Central e do Sul, como Estados Unidos, México, Jamaica, Haiti, Porto Rico, Nicarágua, Venezuela, Colômbia, Equador, Argentina e Brasil. O segundo agrupamento (Agrupamento 2) foi formado por cepas brasileiras e uma cepa proveniente do Paraguai e o terceiro agrupamento (Agrupamento 3) foi formado por cepas provenientes da Argentina e Porto Rico.

O outro clado (Clado 2), formado por cepas brasileiras e apenas uma cepa estrangeira, originária das Ilhas Virgens Britânicas, foi idêntico em todos os filogramas obtidos.

Um estudo realizado por Bona e colaboradores. (2012) isolou duas cepas do VDEN sorotipo 1 genótipo V no ano de 2010 no estado do Paraná, uma no município de Foz do Iguaçu e a outra no município de Planaltina. A análise filogenética com base no gene CprM realizada pelos autores demonstrou que a cepa proveniente de Foz do Iguaçu estava mais proximamente relacionada à cepas que circulam em países como Porto Rico, Venezuela e Guiana Francesa, enquanto a cepa proveniente de Planaltina estava mais proximamente relacionada com cepas que circulam apenas no Brasil.

Estas duas cepas obtidas por Bona e colaboradores (2012) foram utilizadas nas análises filogenéticas envolvendo o gene CprM do presente estudo. O filograma obtido indicou que a cepa isolada em Foz do Iguaçu no ano de 2010 por Bona e colaboradores (2012) se agrupou no Clado 1 (Agrupamento 1), estando mais

proximamente relacionada com cepas que circulam na Argentina e no estado de São Paulo, que por sua vez, estão relacionadas com cepas provenientes de outros países da América do Norte como Porto Rico, Haiti e Jamaica. Já, a outra cepa isolada, proveniente do município de Planaltina, agrupou-se no Clado 2, sendo mais proximamente relacionada às cepas obtidas neste estudo.

Outra cepa isolada no estado do Paraná no ano de 2001 por Dos Santos e colaboradores (2002) foi utilizada nas análises filogenéticas envolvendo o gene Envelope, agrupando-se também no primeiro clado (Clado 1 – Agrupamento 3) juntamente com cepas brasileiras que estão proximamente relacionadas com cepas circulantes em outros países da América.

No presente estudo o termo linhagem foi usado para descrever vírus agrupados em clados em um nível taxonômico abaixo dos genótipos (DOS SANTOS et al., 2011).

Ao se observar os padrões de agrupamentos presentes nos filogramas pode-se inferir que há a circulação de três linhagens do genótipo V do VDENV sorotipo 1 no Brasil, sendo que as três linhagens já foram detectadas no estado do Paraná e duas linhagens foram encontradas no município de Foz do Iguaçu-PR. Sabe-se que a co-circulação de linhagens distintas pode desempenhar um papel importante na manutenção da endemicidade da Dengue em centros urbanos (RAGHWANI et al., 2011).

Em estudo realizado por Carneiro et al. (2012), utilizando sequências do gene Envelope isoladas em diversos estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil também foi reportada a existência de três linhagens distintas de cepas brasileiras do VDENV sorotipo 1 genótipo V, reforçando a hipótese da circulação simultânea de múltiplas linhagens do vírus, confirmando que novas linhagens vem se estabelecendo no país desde a introdução do sorotipo.

Análises filogenéticas de sequências do VDENV podem ser usadas para melhorar a vigilância e respostas ao vírus em escala continental. Certas regiões geográficas parecem ser suscetíveis a certos genótipos e, provavelmente, estejam em risco de epidemias subsequentes à entrada de diferentes genótipos em populações previamente infectadas com o vírus. Portanto, a identificação dos genótipos virais como parte de atividades de vigilância podem servir como um alerta precoce para ameaças epidêmicas subsequentes (POLLETT et al., 2018).

Estudos filogeográficos também podem contribuir para determinar a magnitude, as rotas e a dinâmica do tráfego viral nos e entre os países endêmicos. A dispersão estruturada espacialmente do VDEN foi observada em todos os países do Caribe, indicando que a proximidade entre os países é um preditor significativo do fluxo gênico do VDEN-1 e VDEN-2 entre eles (ALLICOCK et al., 2012).

As abordagens de epidemiologia molecular também são capazes de determinar quais países podem servir como centros de dispersão viral e quais estão mais envolvidos na difusão viral internacional (POLLETT et al., 2018).

As distâncias evolutivas entre sequências genéticas corresponde ao número de mudanças que ocorreram ao longo do ramo da árvore filogenética que as representam. Diferentes genes podem ter diferentes taxas evolutivas que, por definição, são o número de substituições de nucleotídeos por sítio, por ano (VANDAMME, 2009). Um sítio corresponde ao local ou posição em que se encontra um determinado nucleotídeo na molécula de DNA (HOLDER; LEWIS, 2003).

Com relação as análises de distâncias evolutivas, estas foram realizadas entre os dois cladogramas (Clado 1 e Clado 2), entre os agrupamentos presentes no Clado 1 (Agrupamentos 1, 2, 3 e 4 – quando presente) e entre as cepas pertencentes ao Clado 2, para cada um dos três genes. Os resultados referentes a essas análises são descritos a seguir.

A menor diferença nucleotídica observada dentro do Clado 1 do gene NS5 foi no Agrupamento 3, com uma média de 5,93 substituições nucleotídicas por sequência. A maior diferença nucleotídica observada dentro do Clado 1 foi no Agrupamento 4, com uma média de 11 substituições. Comparando-se os dois cladogramas (Clado 1 e Clado 2), pode-se observar que a maior diferença nucleotídica ocorreu no Clado 1 (12,95), TABELA 4.

TABELA 4: DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Grupos	Distância média global		
	Nº absoluto	Desvio padrão	%
Clado 1	12,95	1,86	1,86
Agrupamento 1	7,35	1,31	1,05
Agrupamento 2	6,48	1,62	0,93
Agrupamento 3	5,93	1,11	0,85
Agrupamento 4	11,00	2,39	1,56
Clado 2	6,49	1,24	0,93
Genótipo V	16,40	2,09	2,35

FONTE: O autor (2018)

O Clado 2 foi analisado separadamente e a porcentagem de identidade nucleotídica entre todas as sequências do clado pode ser observada na FIGURA 16.

FIGURA 16: PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE NS5, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	FJ850075_BR_Norte_2002		0,003	0,003	0,004	0,002	0,003	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,004
2	FJ850084_BR_Norte_2005	99,23		0,004	0,003	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,006	0,005
3	FJ850087_BR_Norte_2006	99,54	98,77		0,004	0,003	0,000	0,000	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004
4	FJ850090_BR_Norte_2007	99,23	99,38	98,77		0,004	0,004	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,006	0,005
5	GQ868601_VG_1985	99,85	99,08	99,38	99,08		0,003	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,004
6	KC692513_BR_Norte_2010	99,54	98,77	100,00	98,77	99,38		0,000	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004
7	KF672759_BR_RJ_2010	99,54	98,77	100,00	98,77	99,38	100,00		0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,004	0,004
8	KP188567_BR_SP_2013	98,77	98,00	99,23	98,00	98,61	99,23	99,23		0,005	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005
9	KP188568_BR_SP_2014	98,77	98,00	99,23	98,00	98,61	99,23	99,23	98,46		0,003	0,003	0,003	0,005	0,005
10	LN835130_BR_SP_2011	99,38	98,61	99,85	98,61	99,23	99,85	99,85	99,08	99,38		0,000	0,000	0,004	0,003
11	LN835141_BR_SP_2011	99,38	98,61	99,85	98,61	99,23	99,85	99,85	99,08	99,38	100,00		0,000	0,004	0,003
12	LN835143_BR_SP_2011	99,38	98,61	99,85	98,61	99,23	99,85	99,85	99,08	99,38	100,00	100,00		0,004	0,003
13	MG783591_BR_PR_2016	98,31	97,53	98,46	97,53	98,15	98,46	98,46	97,69	98,00	98,61	98,61	98,61		0,003
14	MG783592_BR_PR_2016	98,77	98,00	98,92	98,00	98,61	98,92	98,92	98,15	98,46	99,08	99,08	99,08	99,23	

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Os números indicados na parte inferior esquerda se referem a porcentagem de identidade entre as sequências pertencentes ao Clado 2, enquanto que os números indicados na parte superior direita indicam o desvio padrão. As amostras isoladas no presente estudo são as sequências de número 13 e 14 (MG783591_BR_PR_2016 e MG783592_BR_PR_2016).

Analisando a FIGURA 16, pode-se observar que o fragmento sequenciado do gene NS5 das cepas isoladas neste estudo tiveram uma maior distância evolutiva (diferença nucleotídica) das cepas isoladas na região Norte nos anos de 2005 e 2007 (FJ850084_BR_Norte_2005 e FJ850090_BR_Norte_2007) e da cepa isolada no estado de São Paulo, no município de São José do Rio Preto, no ano de 2013 (KP188567_BR_SP_2013), enquanto que tiveram uma menor distância evolutiva das cepas isoladas no estado de São Paulo, no município de Ribeirão Preto, no ano de 2011 (LN835130_BR_SP_2011, LN835141_BR_SP_2011 e LN835143_BR_SP_2011). Comparando-se as duas sequências isoladas em Foz do Iguaçu em 2016, observa-se 99,23% de identidade entre elas.

A FIGURA 17 mostra a sequência dos 232 aminoácidos que compõe o fragmento do gene NS5 sequenciado e a ocorrência de substituições sinônimas e não sinônimas entre as sequências que fazem parte do Clado 2.

FIGURA 17 – INDICAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE NS5, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V

	Sequências	Aminoácidos	
1	FJ850075 BR Norte 2002	N I V S A V N M T S R M L L N R F T M A H R K P T Y E R D V D L G A G T R H V A V E P E V A N L D I I G Q R I E N I	[58]
2	FJ850084 BR Norte 2005	.	[58]
3	FJ850087 BR Norte 2006	.	[58]
4	FJ850090 BR Norte 2007	.	[58]
5	GQ868601 VG 1985	.	[58]
6	KC692513 BR Norte 2010	.	[58]
7	KF672759 BR RJ 2010	.	[58]
8	KP188567 BR SP 2013	.	[58]
9	KP188568 BR SP 2014	.	[58]
10	LN835130 BR SP 2011	.	[58]
11	LN835141 BR SP 2011	.	[58]
12	LN835143 BR SP 2011	.	[58]
13	MG783591 BR PR 2016	.	[58]
14	MG783592 BR PR 2016	.	[58]
	Sequências	Aminoácidos	
1	FJ850075 BR Norte 2002	K N E H K S T W H Y D E D N P Y K T W A Y H G S Y E V K P S G S A S S M V N G V V R L L T K P W D V I P M V T Q I A	[116]
2	FJ850084 BR Norte 2005	.	[116]
3	FJ850087 BR Norte 2006	.	[116]
4	FJ850090 BR Norte 2007	.	[116]
5	GQ868601 VG 1985	.	[116]
6	KC692513 BR Norte 2010	.	[116]
7	KF672759 BR RJ 2010	.	[116]
8	KP188567 BR SP 2013	.	[116]
9	KP188568 BR SP 2014	.	[116]
10	LN835130 BR SP 2011	.	[116]
11	LN835141 BR SP 2011	.	[116]
12	LN835143 BR SP 2011	.	[116]
13	MG783591 BR PR 2016	.	[116]
14	MG783592 BR PR 2016	.	[116]
	Sequências	Aminoácidos	
1	FJ850075 BR Norte 2002	M T D T T P F G Q Q R V F K E K V D T R T P R A K R G T A Q I M E V T A K W L W G F L S R N K K P R I C T R E E F T	[174]
2	FJ850084 BR Norte 2005	.	[174]
3	FJ850087 BR Norte 2006	.	[174]
4	FJ850090 BR Norte 2007	.	[174]
5	GQ868601 VG 1985	.	[174]
6	KC692513 BR Norte 2010	.	[174]
7	KF672759 BR RJ 2010	.	[174]
8	KP188567 BR SP 2013	.	[174]
9	KP188568 BR SP 2014	.	[174]
10	LN835130 BR SP 2011	.	[174]
11	LN835141 BR SP 2011	.	[174]
12	LN835143 BR SP 2011	.	[174]
13	MG783591 BR PR 2016	.	[174]
14	MG783592 BR PR 2016	.	[174]
	Sequências	Aminoácidos	
1	FJ850075 BR Norte 2002	R K V R S N A A I G A V F V D E N Q W N S A K E A V E D E R F W D L V H R E R E L H K Q G K C A T C V Y N M M G K R	[232]
2	FJ850084 BR Norte 2005	.	[232]
3	FJ850087 BR Norte 2006	.	[232]
4	FJ850090 BR Norte 2007	.	[232]
5	GQ868601 VG 1985	.	[232]
6	KC692513 BR Norte 2010	.	[232]
7	KF672759 BR RJ 2010	.	[232]
8	KP188567 BR SP 2013	.	[232]
9	KP188568 BR SP 2014	.	[232]
10	LN835130 BR SP 2011	.	[232]
11	LN835141 BR SP 2011	.	[232]
12	LN835143 BR SP 2011	.	[232]
13	MG783591 BR PR 2016	.	[232]
14	MG783592 BR PR 2016	.	[232]

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Demonstração da sequência dos 232 aminoácidos que compõe o fragmento do gene NS5 sequenciado. A similaridade dos aminoácidos está representada por (.) e as substituições não sinônimas que apresentaram alteração do caráter bioquímico do aminoácido estão destacadas em vermelho e as que não apresentaram alteração do caráter bioquímico do aminoácido estão destacadas em amarelo. As amostras isoladas no presente estudo são as sequências de número 13 e 14 (MG783591_BR_PR_2016 e MG783592_BR_PR_2016).

Nota-se a ocorrência de substituições não sinônimas de dois aminoácidos em uma das sequências isoladas em Foz do Iguaçu no presente estudo (MG783591_BR_PR_2016) e de um aminoácido em uma sequência isolada na região Norte em 2007 (FJ850090_BR_Norte_2007).

Na sequência isolada em Foz do Iguaçu (MG783591_BR_PR_2016) houve a alteração do caráter bioquímico do aminoácido localizado na posição 82 devido a substituição de uma serina (caráter polar) por uma fenilalanina (caráter não polar). Já, na substituição do aminoácido na posição 83, uma tirosina (caráter polar) foi substituída por uma asparagina (caráter polar), não havendo alteração do caráter bioquímico do aminoácido. A outra sequência que apresentou substituição não sinônima de aminoácido, FJ850090_BR_Norte_2007, teve a alteração do caráter bioquímico do aminoácido localizado na posição 157 devido à substituição de uma glicina (caráter não polar) por um ácido aspártico (caráter ácido).

Com relação às distâncias evolutivas observadas no gene CprM, o menor valor observado no Clado 1 foi no Agrupamento 2, com uma média de 3,24 substituições nucleotídicas por sequência. Enquanto que a maior diferença nucleotídica do Clado 1 foi observada no Agrupamento 3, com uma média de 8,83 substituições. Comparando-se os dois cladogramas, pode-se observar que a maior diferença nucleotídica ocorreu no Clado 1 (7,61), TABELA 5.

TABELA 5: DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

	Distância média global		
	Nº absoluto	Desvio padrão	%
Clado 1	7,61	1,35	1,57
Agrupamento 1	7,05	1,42	1,45
Agrupamento 2	3,24	0,89	0,67
Agrupamento 3	8,83	2,08	1,82
Clado 2	5,05	1,13	1,04
Genótipo V	9,32	1,57	1,92

FONTE: O autor (2018)

O Clado 2 foi analisado separadamente e a porcentagem de identidade nucleotídica entre todas as sequências do clado pode ser observada na FIGURA 18.

FIGURA 18: PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE CprM, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	FJ850075_BR_Norte_2002		0,005	0,006	0,006	0,005	0,004	0,004	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,005	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007
2	FJ850084_BR_Norte_2005	98,91		0,007	0,006	0,005	0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,006	0,007	0,006	0,007	0,007	0,008	0,008	0,008
3	FJ850087_BR_Norte_2006	98,64	98,10		0,008	0,007	0,006	0,006	0,000	0,005	0,006	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,006	0,006
4	FJ850090_BR_Norte_2007	98,37	98,37	97,55		0,006	0,006	0,006	0,008	0,008	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007	0,008	0,009	0,009	0,009
5	GQ868601_VG_1985	98,91	98,91	98,10	98,37		0,005	0,005	0,007	0,007	0,007	0,006	0,007	0,006	0,007	0,007	0,008	0,008	0,008
6	HM450093_BR_PI_2002	99,46	98,91	98,64	98,37	98,91		0,000	0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,005	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007
7	HM450094_BR_TO_2002	99,46	98,91	98,64	98,37	98,91	100,00		0,006	0,006	0,006	0,005	0,006	0,005	0,006	0,006	0,007	0,007	0,007
8	HM450101_BR_PA_2007	98,64	98,10	100,00	97,55	98,10	98,64	98,64		0,005	0,006	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,006	0,006
9	HQ026762_BR_RJ_2010	98,64	98,10	98,91	97,55	98,10	98,64	98,64	98,91		0,004	0,003	0,004	0,003	0,004	0,004	0,006	0,005	0,005
10	JN086991_BR_PR_2010	98,37	97,83	98,64	97,28	97,83	98,37	98,37	98,64	99,18		0,004	0,005	0,004	0,004	0,004	0,005	0,004	0,005
11	JN982362_BR_CE_2010	98,91	98,37	99,18	97,83	98,37	98,91	98,91	99,18	99,73	99,46		0,003	0,000	0,003	0,003	0,005	0,005	0,005
12	KC692513_BR_Norte_2010	98,64	98,10	98,91	97,55	98,10	98,64	98,64	98,91	99,46	99,18	99,73		0,003	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005
13	KF672785_BR_ES_2010	98,91	98,37	99,18	97,83	98,37	98,91	98,91	99,18	99,73	99,46	100,00	99,73		0,003	0,003	0,005	0,005	0,005
14	KM093800_BR_MG_2013	98,64	98,10	98,91	98,10	98,10	98,64	98,64	98,91	99,46	99,18	99,73	99,46	99,73		0,004	0,006	0,005	0,005
15	KP188567_BR_SP_2013	98,64	98,10	98,91	97,55	98,10	98,64	98,64	98,91	99,46	99,18	99,73	99,46	99,73	99,46		0,006	0,005	0,005
16	KP188568_BR_SP_2014	97,83	97,28	98,10	96,74	97,28	97,83	97,83	98,10	98,64	98,91	98,91	99,19	98,91	98,64	98,64		0,006	0,006
17	MG_783590_BR_PR_2016	98,10	97,55	98,37	97,01	97,55	98,10	98,10	98,37	98,91	99,18	98,91	99,18	98,91	98,91	98,91	98,64		0,004
18	MG772819_BR_PR_2016	98,10	97,55	98,37	97,01	97,55	98,10	98,10	98,37	98,91	99,18	98,91	99,18	98,91	98,91	98,91	98,64	99,46	

NOTA: Os números indicados na parte inferior esquerda se referem a porcentagem de identidade entre as sequências pertencentes ao Clado 2, enquanto que os números indicados na parte superior direita indicam o desvio padrão. As amostras isoladas no presente estudo são as sequências de número 17 e 18 (MG783590_BR_PR_2016 e MG772819_BR_PR_2016).

FONTE: O autor (2018)

Analisando a FIGURA 18, observa-se que o gene CprM das cepas isoladas neste estudo tiveram uma maior distância evolutiva das cepas isoladas na região Norte nos anos de 2005 e 2007 (FJ850084_BR_Norte_2005 e FJ850090_BR_Norte_2007) e da cepa isolada nas Ilhas Virgens Britânicas no ano de 1985 (GQ868601_VG_1985). Enquanto que tiveram uma menor distância evolutiva das cepas isoladas no ano de 2010 nos estados do Paraná (JN086991_BR_PR_2010), Ceará (JN982362_BR_CE_2010) e Espírito Santo (KF672785_BR_ES_2010). As duas cepas isoladas no presente estudo apresentaram 99,46% de identidade.

A FIGURA 19 mostra a sequência dos 161 aminoácidos que compõe o gene CprM e a ocorrência de substituições sinônimas e não sinônimas entre as sequências que fazem parte do Clado 2.

alteração de caráter bioquímico de aminoácidos, nota-se que as duas sequências tiveram substituições idênticas. Nos dois casos houve a substituição de um ácido aspártico (caráter ácido) por um ácido glutâmico (caráter ácido) na posição 159 e de uma valina (caráter não polar) por uma isoleucina (caráter não polar) na posição 161.

Com relação às demais sequências utilizadas, observa-se que outras duas sequências também tiveram duas substituições idênticas, sem alteração do caráter bioquímico dos aminoácidos envolvidos. As sequências FJ850084_BR_Norte_2005 e FJ850090_BR_Norte_2007 tiveram a substituição de uma isoleucina (caráter não polar) por uma metionina (caráter não polar) na posição 78 e de uma alanina (caráter não polar) por uma valina (caráter não polar) na posição 156.

Além disso, outras duas sequências apresentaram substituições não sinônimas com alteração de caráter bioquímico dos aminoácidos. A sequência GQ868601_VG_1985 apresentou uma substituição na posição 78, na qual houve a substituição de uma isoleucina (caráter não polar) por uma arginina (caráter básico) e a sequência HQ026762_BR_RJ_2010 apresentou a substituição de uma arginina (caráter não polar) por uma lisina (caráter básico) na posição 80.

As distâncias evolutivas também foram analisadas para o gene Envelope, e, dentro do Clado 1, a menor diferença nucleotídica observada foi no Agrupamento 3, com uma média de 4,97 substituições nucleotídicas por sequência. A maior diferença nucleotídica do mesmo clado foi observada no Agrupamento 1, com uma média de 10,96 substituições. Comparando-se os dois cladogramas, pode-se observar que a maior diferença nucleotídica ocorreu no Clado 1 (16,73). Este gene apresentou os maiores valores médios de substituições nucleotídicas entre os Agrupamentos pertencentes ao Clado 1. Em contrapartida, foi o gene que apresentou os menores valores médios de substituições nucleotídicas no Clado 2, TABELA 6.

TABELA 6: DISTÂNCIAS EVOLUTIVAS PARA O GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Grupos	Distância média global		
	Nº absoluto	Desvio padrão	%
Clado 1	16,73	1,94	2,44
Agrupamento 1	10,96	1,65	1,60
Agrupamento 2	10,75	2,06	1,57
Agrupamento 3	4,97	1,31	0,72
Agrupamento 4	10,16	2,22	1,48
Clado 2	4,84	0,95	0,71
Genótipo V	19,12	2,34	2,80

FONTE: O autor (2018)

O Clado 2 foi analisado separadamente e a porcentagem de identidade nucleotídica entre todas as sequências do clado pode ser observada na FIGURA 20.

FIGURA 20: PORCENTAGEM DE IDENTIDADE NUCLEOTÍDICA ENTRE AS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE ENVELOPE, VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V

Sequências		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	FJ850075_BR_Norte_2002		0,003	0,000	0,003	0,003	0,000	0,003	0,002	0,002	0,000	0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
2	FJ850084_BR_Norte_2005	99,38		0,003	0,002	0,004	0,003	0,004	0,003	0,004	0,003	0,005	0,004	0,003	0,004	0,004	0,004
3	FJ850087_BR_Norte_2006	100,00	99,38		0,003	0,003	0,000	0,003	0,002	0,002	0,000	0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
4	FJ850090_BR_Norte_2007	99,22	99,84	99,22		0,004	0,003	0,004	0,004	0,004	0,003	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
5	GQ868601_VG_1985	99,53	98,91	99,53	98,76		0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
6	HM450093_BR_PI_2002	100,00	99,38	100,00	99,22	99,53		0,003	0,002	0,002	0,000	0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
7	HM450094_BR_TO_2002	99,22	98,91	99,22	98,76	99,07	99,22		0,004	0,004	0,003	0,005	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
8	HM450101_BR_PA_2007	99,84	99,22	99,84	99,07	99,38	99,84	99,07		0,003	0,002	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
9	HQ026762_BR_RJ_2010	99,69	99,07	99,69	98,91	99,22	99,69	98,91	99,53		0,002	0,005	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
10	JN982362_BR_CE_2010	100,00	99,38	100,00	99,22	99,54	100,00	99,22	99,84	99,69		0,004	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002
11	KC692513_BR_Norte_2010	98,76	98,14	98,76	97,98	98,29	98,76	97,98	98,60	98,45	98,76		0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
12	KF672785_BR_ES_2010	99,69	99,07	99,69	98,91	99,22	99,69	98,91	99,53	99,38	99,69	98,45		0,003	0,003	0,003	0,003
13	KP188567_BR_SP_2013	99,69	99,07	99,69	98,91	99,22	99,69	98,91	99,53	99,38	99,69	98,45	99,38		0,003	0,003	0,003
14	KP188568_BR_SP_2014	99,53	98,91	99,53	98,76	99,07	99,53	98,76	99,38	99,53	99,53	98,29	99,22	99,22		0,002	0,002
15	MG798795_BR_PR_2016	99,53	98,91	99,53	98,76	99,07	99,53	98,76	99,38	99,53	99,53	98,29	99,22	99,22	99,69		0,0000
16	MG798796_BR_PR_2016	99,53	98,91	99,53	98,76	99,07	99,53	98,76	99,38	99,53	99,53	98,29	99,22	99,22	99,69	100,00	

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Os números indicados na parte inferior esquerda se referem a porcentagem de identidade entre as sequências pertencentes ao Clado 2, enquanto que os números indicados na parte superior direita indicam o desvio padrão. As amostras isoladas no presente estudo são as sequências de número 15 e 16 (MG798795_BR_PR_2016 e MG798796_BR_PR_2016).

Analisando a FIGURA 20, pode-se observar que o fragmento do gene Envelope sequenciado das cepas obtidas neste estudo tiveram uma maior distância evolutiva das cepas isoladas na região Norte nos anos de 2007 e 2010 (FJ850090_BR_Norte_2007 e KC692513_BR_Norte_2010) e da cepa isolada no Tocantins em 2002 (HM450094_BR_TO_2002). As menores distâncias evolutivas foram observadas com as cepas isoladas na região Norte nos anos de 2002 e 2006 (FJ850075_BR_Norte_2002 e FJ850087_BR_Norte_2006), nos estados de São Paulo em 2014 (KP188568_BR_SP_2014), Ceará em 2010 (JN982362_BR_CE_2010), Rio de Janeiro em 2010 (HQ026762_BR_RJ_2010), e no

Piauí no ano de 2002 (HM450093_BR_PI_2002). As duas sequências isoladas no presente estudo não tiveram nenhuma diferença nucleotídica.

A FIGURA 21 mostra a sequência dos 228 aminoácidos que compõe o gene Envelope e a ocorrência de substituições sinônimas e não sinônimas entre as sequências que fazem parte do Clado 2.

FIGURA 21 - INDICAÇÃO DAS SUBSTITUIÇÕES NÃO SINÔNIMAS DE AMINOÁCIDOS DAS SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO CLADO 2, GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 GENÓTIPO V

Sequências	Aminoácidos	
1 FJ850075 BR Norte 2002	G I G N R D F V E G L S G A T W V D V V L E H G S C V T T M A K N K P T L D I E L L K T E V T N P A V L R K L C I	[57]
2 FJ850084 BR Norte 2005	.	[57]
3 FJ850087 BR Norte 2006	.	[57]
4 FJ850090 BR Norte 2007	.	[57]
5 Q868601 VG 1985	.	[57]
6 HM450093 BR PI 2002	.	[57]
7 HM450094 BR TO 2002	.	[57]
8 HM450101 BR PA 2007	.	[57]
9 HQ026762 BR RJ 2010	.	[57]
10 JN982362 BR CE 2010	.	[57]
11 KC692513 BR Norte 2010	.	[57]
12 KF672785 BR ES 2010	.	[57]
13 KP188567 BR SP 2013	.	[57]
14 KP188568 BR SP 2014	.	[57]
15 MG798795 BR PR 2016	.	[57]
16 MG798796 BR PR 2016	.	[57]
Sequências	Aminoácidos	
1 FJ850075 BR Norte 2002	E A K I S N T T T D S R C P T Q G E A T L V E E Q D A N F V C R R T F V D R G W G N G C G L F G K G S L L T C A K	[114]
2 FJ850084 BR Norte 2005	.	[114]
3 FJ850087 BR Norte 2006	.	[114]
4 FJ850090 BR Norte 2007	.	[114]
5 Q868601 VG 1985	.	[114]
6 HM450093 BR PI 2002	.	[114]
7 HM450094 BR TO 2002	.	[114]
8 HM450101 BR PA 2007	.	[114]
9 HQ026762 BR RJ 2010	.	[114]
10 JN982362 BR CE 2010	.	[114]
11 KC692513 BR Norte 2010	.	[114]
12 KF672785 BR ES 2010	K	[114]
13 KP188567 BR SP 2013	.	[114]
14 KP188568 BR SP 2014	.	[114]
15 MG798795 BR PR 2016	.	[114]
16 MG798796 BR PR 2016	.	[114]
Sequências	Aminoácidos	
1 FJ850075 BR Norte 2002	F K C V T K L E G K I V Q Y E N L K Y S V I V T V H T G D Q H Q V G N E T T E H G T I A T I T P Q A P T S E I Q L	[171]
2 FJ850084 BR Norte 2005	.	[171]
3 FJ850087 BR Norte 2006	.	[171]
4 FJ850090 BR Norte 2007	.	[171]
5 Q868601 VG 1985	.	[171]
6 HM450093 BR PI 2002	R	[171]
7 HM450094 BR TO 2002	.	[171]
8 HM450101 BR PA 2007	.	[171]
9 HQ026762 BR RJ 2010	.	[171]
10 JN982362 BR CE 2010	.	[171]
11 KC692513 BR Norte 2010	.	[171]
12 KF672785 BR ES 2010	.	[171]
13 KP188567 BR SP 2013	.	[171]
14 KP188568 BR SP 2014	.	[171]
15 MG798795 BR PR 2016	.	[171]
16 MG798796 BR PR 2016	.	[171]
Sequências	Aminoácidos	
1 FJ850075 BR Norte 2002	T D Y G A L T L D C S P R T G L D F N E M V L L T M K E K S W L V H K Q W F L D L P L P W T S G A S T S Q E T W N	[228]
2 FJ850084 BR Norte 2005	.	[228]
3 FJ850087 BR Norte 2006	.	[228]
4 FJ850090 BR Norte 2007	.	[228]
5 Q868601 VG 1985	.	[228]
6 HM450093 BR PI 2002	.	[228]
7 HM450094 BR TO 2002	.	[228]
8 HM450101 BR PA 2007	.	[228]
9 HQ026762 BR RJ 2010	.	[228]
10 JN982362 BR CE 2010	.	[228]
11 KC692513 BR Norte 2010	.	[228]
12 KF672785 BR ES 2010	.	[228]
13 KP188567 BR SP 2013	.	[228]
14 KP188568 BR SP 2014	.	[228]
15 MG798795 BR PR 2016	.	[228]
16 MG798796 BR PR 2016	.	[228]

FONTE: O autor (2018)

NOTA: Demonstração da sequência dos 228 aminoácidos que compõe o fragmento do gene Envelope sequenciado. A similaridade dos aminoácidos está representada por (.) e as substituições não sinônimas que apresentaram alteração do caráter bioquímico do aminoácido estão destacadas em vermelho e as que não apresentaram alteração do caráter bioquímico do aminoácido estão destacadas em amarelo. As amostras isoladas no presente estudo são as sequências de número 15 e 16 (MG798795_BR_PR_2016 e MG798796_BR_PR_2016).

Observa-se que as duas sequências isoladas no presente estudo não apresentaram substituições não sinônimas de aminoácidos no gene do Envelope. No entanto, outras seis sequências apresentaram substituições não sinônimas, sendo que três destas apresentaram alteração de caráter bioquímico dos aminoácidos. Entre as sequências que apresentaram substituições com alteração de caráter bioquímico estão: HM450094_BR_TO_2002 – substituição de uma treonina (caráter polar) por uma metionina (caráter não polar) na posição 47, KF672785_BR_ES_2010 – substituição de um ácido glutâmico (caráter ácido) por uma lisina (caráter básico) na posição 58 e KC692513_BR_Norte_2010 – substituição de uma serina (caráter polar) por uma prolina (caráter não polar).

As substituições não sinônimas que não envolveram alteração do caráter bioquímico dos aminoácidos ocorreram nas sequências: HM450101_BR_PA_2007 – substituição de uma lisina (caráter básico) por uma arginina (caráter básico) na posição 54, KP188567_BR_SP_2013 – substituição de uma valina (caráter não polar) por uma isoleucina (caráter não polar) na posição 51 e GQ868601_VG_1985 – substituição de uma lisina (caráter básico) por uma arginina (caráter básico).

Estudo realizado por Soares (2014) identificou uma semelhança variando entre 95,29% e 100% entre o gene Envelope de cepas isoladas em um mesmo município, Ribeirão Preto-SP. Dados semelhantes também foram encontrados por Cunha (2015), em Goiânia-GO.

O VDEN é dividido em quatro sorotipos (VDEN 1-4) que apresentam entre 30 e 35% de diversidade entre os aminoácidos. Dentro de cada sorotipo, os diferentes genótipos tendem a apresentar uma variação de cerca 3% entre aminoácidos, não excedendo 6% de divergência entre os nucleotídeos (SIM; HIBBERD, 2016).

Estudos evolutivos sugerem que a diversidade genética do VDEN tem aumentado devido as mutações e recombinações que ocorrem com o decorrer do tempo. A alta taxa de replicação viral bem como a ocorrência de infecção simultânea por diferentes vírus em uma mesma fêmea de *Aedes aegypti*, que pode ocorrer durante períodos epidêmicos, favorecem o surgimento de alterações genéticas nos vírus. Além disso, se uma mesma pessoa estiver co-infectada por diferentes genótipos de um mesmo sorotipo viral pode haver a formação de uma molécula de RNA híbrido (BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012).

A presença de substituições não sinônimas de aminoácidos com alteração do caráter bioquímico dos mesmos pode levar a alterações de propriedades físico-

químicas e conformacionais de proteínas, havendo a possibilidade de alteração da interação com células do hospedeiro bem como alterações na virulência. No entanto, mais estudos envolvendo análises adicionais da estrutura tridimensional das proteínas e análises de dinâmica molecular e mutagênese são necessárias para investigar se algumas dessas substituições podem estar relacionadas à virulência do VDEN-1 (CARNEIRO et al., 2012).

As análises de taxas evolutivas e de tempo de divergência foram realizadas para cada um dos três genes, entre os dois clados (Clado 1 e Clado 2), entre os agrupamentos do Clado 1 (Agrupamentos 1, 2, 3 e 4 – quando presente) e entre as cepas pertencentes no Clado 2.

Analisando a taxa de mudanças evolutivas do gene NS5, pode-se observar que a taxa evolutiva do Clado 1 foi superior à do Clado 2. Dentro do clado 1, os Agrupamentos 2, 3 e 4 apresentaram valores de taxa de mudanças evolutivas bastante semelhantes, enquanto que o Agrupamento 1 apresentou valor consideravelmente maior.

Com relação ao tempo de divergência, o Clado 1 surgiu anteriormente ao Clado 2. No Clado 1 o primeiro agrupamento a divergir foi o Agrupamento 3, enquanto que os últimos foram os Agrupamentos 1 e 2, como pode ser observado na TABELA 7.

TABELA 7: TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE NS5 DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Grupos	Taxa de mudanças evolutivas	Tempo de divergência
Clado 1	4,00x10 ⁻⁴ – 8,41x10 ⁻⁴ 6,10x10 ⁻⁴	1967 – 1981 1974
Agrupamento 1	1,72x10 ⁻⁴ – 7,53x10 ⁻⁴ 4,32x10 ⁻⁴	1998 – 2003 2001
Agrupamento 2	6,10x10 ⁻⁵ – 4,56x10 ⁻⁴ 2,28x10 ⁻⁴	1998 – 2004 2001
Agrupamento 3	9,46x10 ⁻⁵ – 4,91x10 ⁻⁴ 2,74x10 ⁻⁴	1983 – 1993 1988
Agrupamento 4	1,52x10 ⁻⁵ – 8,00x10 ⁻⁴ 2,68x10 ⁻⁴	1987 – 1995 1991
Clado 2	1,62x10 ⁻⁴ – 5,61x10 ⁻⁴ 3,61x10 ⁻⁴	1982 – 1985 1984
Genótipo V	4,82x10 ⁻⁴ – 8,78x10 ⁻⁴ 6,80x10 ⁻⁴	1967 – 1981 1974

FONTE: O autor (2018)

Nota: Os valores de taxas de mudanças evolutivas estão compreendidos em um intervalo de confiança de 95% e o valor indicado abaixo representa a média dos valores.

As análises de taxas de mudanças evolutivas e tempo de divergência realizadas para o gene CprM mostram que dentro do Clado 1, o Agrupamento 1

apresentou uma taxa de mudança evolutiva superior aos Agrupamentos 2 e 3. Com relação aos dois cladogramas (Clado 1 e Clado 2), observa-se que o Clado 1 apresentou valores superiores de taxa de mudanças evolutivas. Foi possível observar também que para este gene os Clados 1 e 2 surgiram provavelmente com pouco tempo de diferença. No Clado 1, os primeiros agrupamentos a divergir foram os Agrupamentos 2 e 3, como demonstrado na TABELA 8 a seguir.

TABELA 8: TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE CprM DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Grupos	Taxa de mudanças evolutivas	Tempo de divergência
Clado 1	$6,23 \times 10^{-4} - 1,31 \times 10^{-3}$	1979 – 1991
	$9,46 \times 10^{-4}$	1985
Agrupamento 1	$5,42 \times 10^{-4} - 1,45 \times 10^{-3}$	1995 – 2003
	$9,70 \times 10^{-4}$	1999
Agrupamento 2	$1,09 \times 10^{-4} - 6,95 \times 10^{-4}$	1990 – 1996
	$3,65 \times 10^{-4}$	1993
Agrupamento 3	$1,28 \times 10^{-5} - 8,68 \times 10^{-4}$	1992 – 1996
	$2,78 \times 10^{-4}$	1994
Clado 2	$3,45 \times 10^{-4} - 9,78 \times 10^{-4}$	1980 – 1985
	$6,45 \times 10^{-4}$	1983
Genótipo V	$7,37 \times 10^{-4} - 1,35 \times 10^{-3}$	1977 – 1985
	$1,03 \times 10^{-3}$	1981

FONTE: O autor (2018)

Nota: Os valores de taxas de mudanças evolutivas estão compreendidos em um intervalo de confiança de 95% e o valor indicado abaixo representa a média dos valores.

Com relação ao gene Envelope, foi observado que dentro do Clado 1, o Agrupamento 1 foi o agrupamento que apresentou maior valor de taxa de mudanças evolutivas, enquanto que o Agrupamento 4 apresentou o menor valor. Comparando-se os dois cladogramas, nota-se que o Clado 2 apresenta um valor consideravelmente menor de taxa de mudança evolutiva. Com relação aos tempos de divergência, é possível inferir que o Clado 1 surgiu antes do Clado 2, e que dentro do Clado 1, o primeiro agrupamento a divergir foi o Agrupamento 3 e o último foi o Agrupamento 1, demonstrado na TABELA 9.

TABELA 9: TAXAS DE MUDANÇAS EVOLUTIVAS E TEMPOS DE DIVERGÊNCIA DO GENE ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1, GENÓTIPO V, ISOLADO EM FOZ DO IGUAÇU-PR NO ANO DE 2016

Grupos	Taxa de mudanças evolutivas	Tempo de divergência
Clado 1	$4,83 \times 10^{-4} - 9,94 \times 10^{-4}$	1966 – 1986
	$7,31 \times 10^{-4}$	1976
Agrupamento 1	$2,45 \times 10^{-4} - 9,66 \times 10^{-4}$	1995 – 2003
	$5,65 \times 10^{-4}$	1999
Agrupamento 2	$9,28 \times 10^{-5} - 6,14 \times 10^{-4}$	1992 – 2003
	$3,19 \times 10^{-4}$	1998
Agrupamento 3	$5,12 \times 10^{-5} - 2,96 \times 10^{-4}$	1988 – 1995
	$1,58 \times 10^{-4}$	1992
Agrupamento 4	$8,55 \times 10^{-5} - 3,39 \times 10^{-4}$	1989 – 1996
	$1,38 \times 10^{-4}$	1993
Clado 2	$8,82 \times 10^{-5} - 3,51 \times 10^{-4}$	1980 – 1985
	$1,99 \times 10^{-4}$	1983
Genótipo V	$4,85 \times 10^{-4} - 8,94 \times 10^{-4}$	1959 – 1979
	$6,86 \times 10^{-4}$	1969

FONTE: O autor (2018)

Nota: Os valores de taxas de mudanças evolutivas estão compreendidos em um intervalo de confiança de 95% e o valor indicado abaixo representa a média dos valores.

Com relação as taxas de mudanças evolutivas, levando-se em consideração os valores obtidos para os três genes analisados, observa-se que o gene CprM foi o gene que apresentou maiores valores de taxas de mudanças evolutivas para os Clados 1 e 2 e para as sequências pertencentes ao genótipo V. Os genes NS5 e Envelope foram os genes que apresentaram valores mais parecidos de taxas de mudanças evolutivas, principalmente com relação as taxas de mudanças evolutivas para as sequências do genótipo V.

O valor de taxa de mudança evolutiva obtido para o gene Envelope para as sequências pertencentes ao genótipo V encontra-se bastante próximo a valores descritos na literatura, com valores médios de taxa de mudança evolutiva variando entre $5,1$ a $7,8 \times 10^{-4}$ (TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012; SUN; MENG, 2013; VILLABONA-ARENAS; ZANOTTO; AFREEN; PARVEEN, 2015; JIANG et al., 2017). Apenas o valor obtido para o gene CprM foi superior, provavelmente devido a data de divergência do genótipo V para este gene ser mais recente quando comparada aos outros dois genes.

O valor de taxa de mudança evolutiva obtido pelo gene NS5 para as sequências do genótipo V foi bastante semelhante ao valor obtido pelo gene Envelope, no entanto, pelo fato de o tempo de divergência do gene NS5 ser mais recente ao do gene Envelope, pode-se inferir que o gene NS5 tenha sofrido menos substituições nucleotídicas ao longo do tempo, o que pode ser confirmado pela porcentagem de diferenças nucleotídicas entre os dois genes. O gene NS5

apresentou 2,35% de diferença nucleotídica entre as sequências pertencentes do genótipo V, enquanto que o gene Envelope apresentou 2,80%.

A maioria dos estudos de taxas de mudanças evolutivas e de estimativa do ancestral comum mais recente são realizadas com o gene Envelope por ser o gene que interage diretamente com o sistema imunológico do hospedeiro, sofrendo forte pressão evolutiva. Análises filogenéticas deste gene permitem a identificação de mudanças recentes e o acompanhamento da evolução viral (CHEN; WU; CHIOU, 2003; DETTOGNI; LOURO, 2012).

Costa e colaboradores (2012) sugeriram que o VDEN evolui mais lentamente do que alguns outros vírus de RNA, como influenza. Esta hipótese foi levantada como sendo um reflexo do custo de adaptação do vírus devido a circulação alternada entre vetores e seres humanos, embora sejam necessários mais estudos para confirmar esta hipótese (TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

As taxas evolutivas do VDEN, como as de outros vírus de RNA, são melhor entendidas como fenômenos dinâmicos no tempo que refletem, pelo menos parcialmente, a epidemiologia viral e a dinâmica populacional, em vez de uma propriedade intrínseca do vírus (HOLMES et al., 2016). Atualmente, reconhece-se que as estimativas de taxas de mudanças evolutivas para os vírus RNA são fortemente dependentes da escala de tempo da amostragem e da dinâmica da população viral (DUCHÊNE; HOLMES, HO, 2014; HOLMES et al., 2016).

Acredita-se que uma população rapidamente diversificada de um vírus de RNA, como seria observado durante uma epidemia de Dengue, experimenta uma quantidade limitada de seleção purificadora em mutações deletérias que serão extintas com o tempo. Como tal, as estimativas de taxas evolutivas medidas ao longo de um curto período de tempo são tipicamente maiores do que as medidas ao longo de uma longa escala de tempo (TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; DUCHÊNE; HOLMES, HO, 2014).

A determinação do ACMR de um determinado surto ou epidemia de Dengue também tem implicações operacionais na Saúde Pública, como estimar o período da emergência de uma nova linhagem de vírus em um país ou cidade específica e pode dar uma indicação de quanto tempo o vírus circulou antes da detecção pela vigilância de Saúde Pública. Esta abordagem de detecção molecular avançada pode testar a robustez de um sistema de vigilância e também determinar se as epidemias são

derivadas de uma introdução separada ou única comum em um local (MONDINI et al., 2009; SOUZA et al., 2011a).

A análise de sequências genômicas completas e parciais para um número cada vez maior de *Flavivirus* tem se mostrado importante para estimar relações filogenéticas e hipóteses evolutivas. Análises filogenéticas têm sido realizadas com base nas sequências genômicas completas, sequências nucleotídicas parciais ou em sequências de aminoácidos das proteínas virais, principalmente dos genes NS5, CprM e Envelope (ZANOTTO et al., 1996; BILLOIR et al., 2000; GAUNT et al., 2001; GOULD et al., 2003; KUNO; CHANG, 2005; COOK; HOLMES, 2006; BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012).

Os estudos de caracterização genética dos vírus podem contribuir para um estreitamento das relações entre suas características biológicas e genéticas, além de contribuírem com a taxonomia viral e serem considerados elementos fundamentais para o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e rápidos, assim como para a elaboração de vacinas e de drogas antivirais (KUNO et al., 1998; SCARAMOZZINO et al., 2001; CHANG et al., 2004; RAY; SHI, 2006; SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

Vários estudos filogenéticos vêm sendo realizados também com objetivo de compreender fatores relacionados a origem, dispersão e potencial epidêmico de novas linhagens virais. Dentro desse contexto, destaca-se a importância de estudos que identifiquem as linhagens virais e mutações que possam interferir na sua virulência e transmissão (BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012; DRUMOND et al., 2012).

A crescente incidência e disseminação para novas áreas geográficas do VDEN provavelmente deve continuar devido a globalização, mudanças climáticas, viagens, comércio e expansão do vetor *Aedes* (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013). Embora tenha havido avanços na elaboração de vacinas contra o vírus, o controle da doença continua sendo o controle clínico de pessoas infectadas e o controle de vetores (POLLET et al., 2018).

A importância da vigilância virológica por meio da detecção de mosquitos naturalmente infectados com o VDEN como um sistema de previsão rápido e eficiente para surtos da doença é bem documentado na literatura (CHOW et al., 1998; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2005; URDANETA et al., 2005; GARCÍA-REJÓN et al., 2011).

Pires-Neto e colaboradores (2005) acreditam que o monitoramento constante da introdução de novos sorotipos/genótipos/linhagens do VDEN no Brasil é necessário para que medidas de controle sejam executadas prontamente a fim de reduzir o risco potencial de epidemias associadas a linhagens mais virulentas. Diante disso, ações de vigilância ativa e contínua e estudos filogenéticos que monitorem a entrada e circulação dos VDEN no Brasil são de extrema importância, pois podem fornecer informações sobre a disseminação, genética e evolução do vírus.

O município de Foz do Iguaçu possui condições climáticas altamente favoráveis para a proliferação do principal vetor de arboviroses no ambiente urbano, o mosquito *Aedes aegypti*. Somando-se a isso, o grande fluxo e circulação de pessoas devido as atrações turísticas mundialmente conhecidas e pelo fato de o município fazer parte de uma região de Tríplice Fronteira, podem estar contribuindo para a emergência e reemergência de arboviroses na região.

Anualmente, são relatados diversos casos de doença febril aguda sem causa definida no município. Frequentemente, amostras desses casos são negativas para os sorotipos do VDEN ou VFA quando submetidas a diagnóstico laboratorial. Neste sentido, a investigação de diferentes arbovírus aliada a utilização de métodos moleculares, que apresentam maior sensibilidade, pode elucidar a circulação de outros arbovírus na região, bem como possibilitar a adequação de estratégias de vigilância epidemiológica e entomológica.

Um fator importante a ser ressaltado são as subnotificações dos casos de infecção por arbovírus, apesar de serem de notificação compulsória. No geral, os fatores normatizados pelos sistemas de saúde a respeito das notificações de casos de doenças transmissíveis são decorrentes de informações disponibilizadas por indivíduos infectados que acessam os serviços de saúde. Entretanto, este método passivo de coleta pode subestimar os dados, gerando assim, índices e coeficientes de risco abaixo da realidade. As subnotificações podem mascarar a realidade epidemiológica dessas doenças, pois a ausência de notificações de casos dificulta as pesquisas sobre os processos de difusão das doenças, além de atrapalharem os programas de saúde no controle de vetores (AQUINO JR., 2014).

Nas infecções pelo VDEN, estima-se que a proporção de casos assintomáticos para sintomáticos é de aproximadamente 4 para 1, embora essa relação seja provavelmente bastante dinâmica ao longo do tempo (POLLET et al., 2018). Os casos sintomáticos de Dengue apresentam ampla variação no espectro da

doença e cerca de 70% dos pacientes não procuram atendimento (BHATT et al., 2013). Além disso, as infecções assintomáticas são cada vez mais reconhecidas por desempenhar um papel importante na epidemia de Dengue e demonstraram contribuir para a transmissão do VDEN (DUONG et al., 2015).

Mesmo com a existência de políticas regionais e federais que preconizam articulação intersetorial e intermunicipal, principalmente nos países pertencentes a região do Mercosul, as áreas de fronteiras internacionais apresentam dificuldades em criar programas de ação contra doenças como a Dengue. Por se tratar de uma região de fronteira, o planejamento da saúde deveria ultrapassar os limites administrativos municipais. Enquanto tais medidas não se operem efetivamente para o controle da doença nesta região da Tríplice Fronteira, a utilização de medidas complementares se faz necessária (AQUINO JR, 2014).

Hukić e colaboradores (2010) ressaltam a necessidade da execução de mais ações para se reconhecer e controlar doenças infecciosas emergentes, principalmente doenças zoonóticas. Os autores afirmam que primeiramente há de se melhorar o sistema de notificação de doenças infecciosas nos níveis estadual, regional e da Organização Mundial de Saúde. Além disso, há a necessidade de se melhorar outras ferramentas para o controle dessas doenças, como a investigação epidemiológica de campo, erradicação, treinamento, desenvolvimento de diagnósticos e atividades de pesquisa básica e aplicada, incluindo transferência de tecnologia.

O monitoramento da circulação de patógenos em vetores e animais vertebrados (possíveis hospedeiros) antes do aparecimento de casos das diversas doenças em humanos viabiliza ações de intervenção por parte das autoridades de Saúde Pública em tempo oportuno para controle e interrupção de transmissão dessas doenças, como campanhas de vacinação no caso da FA, ações de educação em saúde, mutirão de limpeza para a remoção de criadouros dos mosquitos vetores e aplicação de inseticidas, por exemplo.

A criação e implantação de um sistema que permita monitorar em tempo real os fatores determinantes à disseminação de doenças e a adequação metodológica das práticas de controle vetorial que possam contribuir nas ações de vigilância e detecção de fatores condicionantes de risco para a transmissão de arboviroses ainda é considerada uma lacuna nos dias atuais. Estas ações realizadas de forma precoce, efetiva e homogênea possibilitariam uma nova abordagem de enfrentamento,

potencializando as medidas de prevenção e controle de arboviroses de interesse em Saúde Pública.

O ressurgimento da Dengue nas Américas pode ser atribuído conjuntamente à: disseminação de diferentes sorotipos do VDEN em países vizinhos; ao fluxo migratório permanente de viajantes virêmicos; e ao aumento da infestação de vetores. Além disso, a urbanização provavelmente teve o maior impacto sobre o aumento da Dengue dentro dos países, enquanto que a alta frequência de viagens internacionais de baixo custo teve o maior efeito sobre a disseminação global do vírus (WILDER-SMITH; GUBLER, 2008).

Estas situações destacam a importância da vigilância sistemática do vírus Dengue, pois a introdução críptica ou a circulação de um novo sorotipo de VDEN em áreas endêmicas é geralmente considerada como um fator que contribui para o aumento do risco do desenvolvimento de Dengue grave. A extinção regional e o surgimento de novas linhagens estão associados a surtos periódicos de Dengue e, possivelmente, também à gravidade e fatalidade da doença (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2017).

Ações de vigilância epidemiológica contínuas e sequenciamento de cepas virais circulantes em todos os países de regiões endêmicas são importantes para a detecção de novas linhagens do VDEN e para melhorar a compreensão sobre os padrões regionais de disseminação do vírus (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2017).

A co-circulação de linhagens distintas no Brasil nos últimos anos tem sido caracterizada e o envolvimento de ambas em casos leves, graves e fatais demonstra que essas linhagens não são restritas a um desfecho da doença em particular. Devido a geografia e a epidemiologia da Dengue no Brasil, a vigilância de populações virais, linhagens e genótipos é necessária, pois o impacto da substituição e co-circulação de linhagens ainda não é totalmente compreendido (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2015).

Durante décadas, as doenças arbovirais foram consideradas apenas pequenas contribuintes para a mortalidade global. Como resultado, baixa prioridade foi dada ao investimento em pesquisa de arbovírus e infraestrutura de Saúde Pública relacionada. Nas últimas cinco décadas, no entanto, houve um surgimento sem precedentes de doenças arbovirais epidêmicas resultantes da tríade do mundo moderno: urbanização, globalização e mobilidade internacional. A emergência de Saúde Pública do VZIK e a ameaça de disseminação global da FA, combinada com o

ressurgimento da Dengue e Chikungunya, constituem um alerta para fortalecer programas e melhorar a pesquisa acerca das arboviroses. Novas alianças globais também são necessárias para combinar esforços e recursos para soluções mais eficazes e oportunas contra essas doenças (WILDER-SMITH et al., 2016).

Mesmo diante de dificuldades na atuação sobre fatores socioeconômicos e ambientais, os órgãos de Saúde Pública brasileira são responsáveis por investimentos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de infecções. Desta forma, investimentos na qualificação das ações de vigilância epidemiológica, virológica, vetorial e de epizootias são urgentes no país, especialmente no atual momento de risco importante à Saúde Pública (DONALISIO et al., 2017).

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- Os 117 equinos analisados neste estudo não estavam infectados por arbovírus dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* no momento em que as amostras foram coletadas, e, portanto, não representavam risco de transmissão viral para seres humanos e vetores.

- Dos 75 *pools* de fêmeas de *Aedes aegypti* analisados provenientes do município de Foz do Iguaçu nos anos de 2008, 2011, 2015 e 2016: nenhum *pool* foi positivo para a presença do genoma de arbovírus do gênero *Alphavirus* e dois *pools* coletados nos meses de fevereiro e março do ano de 2016 foram positivos para a presença de arbovírus do gênero *Flavivirus*.

- Nos dois casos, o *Flavivirus* identificado foi o vírus *Dengue* sorotipo 1, genótipo V, coincidindo com o período de maior incidência da doença no município (julho de 2015 – agosto 2016).

- Pelas análises filogenéticas foi possível inferir que as duas cepas obtidas neste estudo pertencem ao mesmo clado e estão mais proximamente relacionadas com cepas de provável origem caribenha e que circulam apenas no Brasil do que com cepas paraguaias, argentinas ou provenientes de outros países da América.

- Foi possível observar a ocorrência de 3 linhagens brasileiras do vírus *Dengue*, sendo que as três já ocorreram no estado do Paraná e duas linhagens ocorreram no município de Foz do Iguaçu.

- As cepas isoladas no presente estudo apresentaram pouca ou nenhuma diferença para os genes analisados: 100% de identidade para o gene Envelope, 99,46% para o gene CprM e 99,23% para o gene NS5.

- O gene do Envelope foi o gene que apresentou maior porcentagem de substituições nucleotídicas para as sequências do genótipo V.

- O *pool* positivo nº 06 apresentou duas substituições aminoacídicas não sinônimas com alteração de caráter bioquímico do aminoácido envolvido (uma no gene NS5 e uma no gene CprM).

- O *pool* positivo nº 51 apresentou duas substituições aminoacídicas não sinônimas sem alteração de caráter bioquímico do aminoácido envolvido, ambas no gene CprM.

- Os valores de taxas de mudanças evolutivas encontrados para os genes Envelope e NS5 foram bastante parecidos e próximos a valores descritos na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro virus infection in Amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.
- AFREEN, N. et al. Phylogenetic and molecular clock analysis of dengue serotype 1 and 3 from New Delhi, India. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141628, 2015.
- AITKEN, T. H. et al. Mayaro virus isolated from a Trinidadian mosquito, *Mansonia venezuelensis*. **Science**, v. 131, n. 3405, p. 986, 1960.
- ALERA, M. T. et al. Zika virus infection, Philippines, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 722-724, 2015.
- ALLICOCK, O. M. et al. Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 6, 1533-1543, 2012.
- AMBERG, S. M.; RICE, C. M. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8083-8094, 1999.
- ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012-1016, 1957.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Informativa Vacina Dengue Dengvaxia®**. 2017. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201>. Acesso em 20 jul. 2018.
- AQUINO JR, J. **A dengue em área de fronteira internacional: Riscos e vulnerabilidades na tríplice fronteira de Foz do Iguaçu**. 201 f. Tese (Doutorado em Geografia) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- ARRIGO, N. C.; ADAMS, A. P.; WEAVER, S. C. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. **Journal of Virology**, v. 84, n. 2, p. 1014-1025, 2010.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. **Arboviroses**. In: FARHAT, C. K.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. (Eds). *Infectologia Pediátrica*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.533-551.
- BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses: an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, p. 1-21, 2013.

BARRERO, P. R.; MISTCHENKO, A. S. Genetic analysis of Dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina. **Virus Research**, v. 135, n. 1, p. 8388, 2008.

BARRETO, M. L.; TEXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.

BATISTA, P. M. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684-690, 2013.

BATISTA, P. M. et al. Seroepidemiological monitoring in sentinela animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p.168-173, 2012.

BECK, C. E.; WYCKOFF, R. W. Venezuelan equine encephalomyelitis. **Science**, v. 88, n. 2292, p. 530, 1938.

BENCHIMOL, J. L. História da Febre Amarela no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 1, n. 1, p. 121-124, 1994.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BHULLAR, K. et al. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.

BILLOIR, F. et al. Phylogeny of the genus Flavivirus using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no know vector. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 781-790, 2000.

BONA, A. C. D.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 297-300, 2012.

BRASIL. Lei nº 8.080 de 19 de setembro de 1990. **Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela**. Brasília: MS-FUNASA; 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Notícias: SVS informa procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do Chikungunya no Brasil**. 2014. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/omisterio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/9545-svs-informa-procedimentos-a>

erem-adotados-para-a-vigilancia-da-febre-do-chikungunya-no-brasil>. Acesso em 03 Dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 2**, 2016, v. 47, n. 5, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/2016-003-Dengue-SE2.pdf>>. Acesso em 23 de abr. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico nº14 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 10 de 2018**. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/06/2018-012.pdf>>. Acesso em 10 Abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe nº 20 |2017/2018 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018**. 2018a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/01/Informe-n15-FA-28fev18-d.pdf>>. Acesso em 10 de Abr. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe nº 26 |2017/2018 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018**. 2018b. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/18/Informe-FA-26.pdf>>. Acesso em 29 de Ago. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília: MS; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 782, de 15 de março de 2017. Define a relação das epizootias de notificação compulsória e suas diretrizes para notificação em todo o território nacional. **Ministério da Saúde – Gabinete do Ministro**, Brasília. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Critérios para orientar o processo de decisão para introdução da vacina contra dengue no Programa Nacional de Imunizações (PNI) Relatório do Grupo de Trabalho do Ministério da Saúde**. 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/07/Parecer-16-Analise-situa---o-da-Dengue-01-02-2016.pdf>>. Acesso em 20 jul. 2018.

BRASIL. Ministério do Turismo. **Cidades do Sul estão entre as 10 mais visitadas do País**. Brasília: Ministério do Turismo; 2017b. Disponível em: <<http://www.turismo.gov.br/%C3%BAltimas-not%C3%ADcias/8101-regi%C3%A3o-sul-entre-as-10-mais-do-turismo-internacional.html>>. Acesso em 21 de jul. de 2018.

- BRASIL. SINAM - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2016**. 2017a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/10/Dengue-classificacao-2016.pdf>>. Acesso em 23 de abr. de 2018.
- BRAULT, A. C. et al. Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central, and South America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 579-586, 1999.
- BRITO, A. **Divisão da base territorial de Foz do Iguaçu** [Mensagem pessoal]. Mensagem recebida por: <tcarneiro.rocha@gmail.com>. 3 mai. 2017.
- BROCCHIERI, L. Phylogenetic Inferences from Molecular Sequences: Review and Critique. **Theoretical Population Biology**, v. 59, n. 1, p. 27-40, 2001.
- BROECK, G. T.; MERRILL, M. H. A serological difference between eastern and western equine encephalomyelitis virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 217-220, 1933.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. **Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores**. In: MURRAY, P. R. et al. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375-393.
- BRUYCKER-NOGUEIRA, F. et al. Insights of the genetic diversity of VDENV-1 detected in Brazil in 25 years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 34, p. 126-136, 2015.
- BUATHONG, R. et al. Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012-2014. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 380-383, 2015.
- CALDART, E. T. et al. Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiarum Veterinariae**, v. 44, n. 1392, p. 1-20, 2016.
- CALISHER, C. H. et al. Identification of a new Venezuelan equine encephalitis virus from Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 6, p. 1260-1272, 1982.
- CAMPOS, K. F. et al. Surto de encefalomielite equina Leste na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 443-448, 2013.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, 2014.
- CARNEIRO, A. R. et al. Molecular characterization of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 805-812, 2012.

CASALS, J.; CURNEN, E. C.; THOMAS, L. Venezuelan equine encephalomyelitis in man. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 77, n. 6, p. 521–530, 1943.

CASTILLO-OLIVARES, J.; WOOD J. West Nile infection of horses. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 467-483, 2004.

CAUSEY, O.; MAROJA, O.; AZEVEDO, M. Epidemia pelo vírus Mayaro no Estado do Pará. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 152-154, 1958.

CERDAS-QUESADA, C. A.; RETANA-SALAZAR, A. P. Characterization and phylogenetic relationships of strains of Dengue type 1 virus from Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v. 55, n. 2, p. 365-372, 2007.

CFSPH - The Center for Food Security and Public Health. **Eastern Equine Encephalomyelitis, Western Equine Encephalomyelitis and Venezuelan Equine Encephalomyelitis**. 2015. Disponível em: <http://www.cfsp.h.iastate.edu/Factsheets/pdfs/easter_wester_venezuelan_equine_encephalomyelitis.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

CHANG, G. J. et al. Recent advancement in flavivirus vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 2, p. 199-220, 2004.

CHEN, W-J.; WU, H-R.; CHIOU; S-S. E/NS1 modifications of Dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells. **Intervirolgy**, v. 46, n. 5, p. 289-295, 2003.

CHILDS, J. E.; GORDON, E. R. Surveillance and control of zoonotic agents prior to disease detection in humans. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 76, n. 5, p. 421-428, 2009.

CHOW, V. T. K. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 578-586, 1998.

CLYDE, K.; BARRERA, J.; HARRIS, E. The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis. **Virology**, v. 379, n. 2, p. 314-323, 2008.

COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

COIMBRA, T. L. M. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221-224, 2007.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.

COOK, S.; HOLMES, E.C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. **Archives of Virology**, v. 151, n. 2, p. 309-325, 2006.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 309-314, 2012.

CUNHA, M. P. **Caracterização filogenética de isolados do Vírus dengue em Goiânia, Goiás**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE THOISY, B. et al. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326-1329, 2003.

DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Phylogenetic characterization of Dengue virus type 2 in Espírito Santo, Brazil. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 71-80, 2012.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DICK, O. B. et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584-593, 2012.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 10-15, 2017.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

DONATTI, J. E.; GOMES, A. C. Adultrap: Descrição de armadilha para adulto de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 51, n. 2, p. 255-256, 2007.

DOS SANTOS, C. N. et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, n. 1-2, p. 197-205, 2002.

DOS SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 8, p. 7-10, 2011.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS Biology**, v. 4, n. 5, p. e88, 2006.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, 2007.

DRUMOND, B. P. et al. Phylogenetic analysis of Dengue virus 1 isolated from South Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 251-258, 2016.

DRUMOND, B. P. et al. Population dynamics of VDENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, n. 157, v. 11, p. 2061-2073, 2012.

DUCHÊNE, S.; HOLMES, E. C.; HO, S. Y. Analyses of evolutionary dynamics in viruses are hindered by a time-dependent bias in rate estimates. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 281, p. 1-7, 2014.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688-14693, 2015.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2014.

ESTEP, L. K. et al. Risk of exposure to eastern equine encephalomyelitis virus increases with the density of northern cardinals. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57879, 2013.

ÉTIENNE, J.; MILLOT, F.; CERQUEIRA, A. J. **Bioquímica genética e biologia molecular**. 6.ed. São Paulo: Livraria & Editora, 2003.

FARFÁN-ALE, J. A. et al. Antibodies to West Nile Virus in asymptomatic mammals, birds and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, p. 908-914, 2006.

FELSENSTEIN, J. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. **Systematic Zoology**, v. 27, n. 4, p. 401-410, 1978.

FERGUSON, J. M. et al. Optimal Sampling Strategies for Detecting Zoonotic Disease Epidemics. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 6, p. e1003668, 2014.

FERNÁNDEZ, Z. et al. Identificação do vírus causador de encefalomielite eqüina, Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 232-235, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. How are so many foreign arboviruses introduced in Brazil? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 665-667, 2016.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes and infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA B. A. L. **Dengue**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.) *Tratado de Infectologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 204-217.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Uma breve história da Febre Amarela**. 2008. Disponível em: < <https://agencia.fiocruz.br/uma-breve-hist%C3%B3ria-da-febre-amarela> >. Acesso em: 01 out 2016.

FLORES, E. F. **Togaviridae**. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária*. 2 ed. Santa Maria: Editora da Universidade de Santa Maria, 2012. p. 691-712.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. **Febre Amarela**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.) *Tratado de Infectologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 389-397.

FONSECA, K. et al. Case report: first case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 1035-1038, 2014.

FORATTINI, O. P. **Conceitos básicos de epidemiologia molecular**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2004.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, vol.2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

FORSHEY, B. M. et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.

FOZ DO IGUAÇU. Prefeitura Municipal. **Dados Socioeconômicos de Foz do Iguaçu, 2011. Aspectos Gerais**. Foz do Iguaçu PR: Prefeitura Municipal; 2017. Disponível em: <http://www.pmfi.pr.gov.br>. Acesso em 23 de abr. de 2018.

GALINDO, P. et al. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panamá, 1959-1962. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.15, n. 3, p.385-400, 1966.

GARCÍA-REJÓN, J. E. et al. Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Mérida, México. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 3, p. 489-496, 2011.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 8, p. 1867-1876, 2001.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 58-77, 2014.

GOMES, A. C. **Vigilância entomológica**. Informe epidemiológico do SUS, v. 11, n. 2, p. 79-90, 2002.

GONÇALVES-NETO, V. S.; REBÊLO, J. M. M. Aspectos epidemiológicos do dengue no município de São Luís, Maranhão, Brasil, 1997-2002. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1427-1431, 2004.

GONÇALVEZ, A. P. et al. Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1. **Virology**, v. 303, p. 110-119, 2002.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016.

GOULD, E. A. et al. Origins, evolution, and vector/host co adaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 277-314, 2003.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1-13, 2017.

GRIFFIN, D. E. **Alphaviruses**. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1023-1067.

GUBERNOT, D. M.; BOYER, B. L.; MOSES, M. S. Animal as early detectors of bioevents: Veterinary tools and a framework for animal-human integrated zoonotic disease surveillance. **Public Health Reports**, v. 123, n. 3, p. 300-315, 2008.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. **Dengue Bulletin**, v. 21, p. 1-19, 1997.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMEL, R. et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interaction. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 7-8, p. 441-449, 2016.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591-638, 2007.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.

HEANG, V. et al. Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 349-351, 2012.

HEINEN, L. B. et al. Saint Louis Encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 57, n. 3, p. 215-220, 2015.

HERVÉ, J. P. et al. **Arboviroses: aspectos ecológicos**. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (Org.). Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, v. 1. Belém: Editora Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 409-437.

HOLDER, M.; LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature**, v. 4, n. 4, p. 275-284, 2003.

HOLMES, E. C. et al. The evolution of Ebola virus: insights from the 2013-2016 epidemic. **Nature**, v. 538, n. 7624, p. 193-200, 2016.

HOWITT, B. Recovery of the virus of equine encephalomyelitis from the brain of a child. **Science**, v.88, n. 2289, p.455-456, 1938.

HUKIĆ, M. et al. Surveillance of wildlife zoonotic diseases in the Balkans Region. **Medicinski Glasnik**, v. 7, n. 2, p. 96-105, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema Nacional de Indicadores Urbanos**. 2011. Disponível em <www.ibge.com.br>. Acesso em 20 de jun. 2016.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2017 Release**. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 10 de Mar de 2018.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302-307, 2014.

IVERSSON, L. B. et al. Circulation of Eastern equine encephalitis, Western equine encephalitis, Ilhéus, Maguari and Tacaiuma viruses in equines of the Brazilian Pantanal, South America. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 4, p. 355-359, 1993.

IVERSSON, L. B. et al. Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. IV – Inquérito em escolares residentes no município de Iguape, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 423-435, 1983.

- IVERSSON, L. B. Situação atual do conhecimento epidemiológico sobre o arbovírus patogênicos para o homem na região da mata atlântica do estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 343-353, 1994.
- IVERSSON, L. B.; TIRIBA, A. C. **Encefalite por arbovírus Rocío**. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 233-239.
- JIANG, L. Y. et al. Molecular characterization and genotype shift of dengue virus strains between 2001 and 2014 in Guangzhou. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 4, p. 760-765, 2017.
- JOHNSON, N. et al. Assessment of a novel real-time pan-Flavivirus RT-polymerase chain reaction. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 7, p. 665-671, 2010.
- JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990-993, 2008.
- KADING, R. C. et al. Prevalence of Antibodies to Alphaviruses and Flaviviruses in Free-Ranging Game Animals and Nonhuman Primates in the Greater Congo Basin. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 587-599, 2013.
- KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. San Antonio, TX: USA, 1985.
- KARESH, W. B. et al. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1936-1945, 2012.
- KENT, R. J.; LACER, L. D.; MEISCH, M. V. Initiating Arbovirus Surveillance in Arkansas, 2001. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 223-229, 2003.
- KLUNGTHONG, C. et al. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 175-181, 2008.
- KOMAR, N. West Nile Virus: Epidemiology and ecology in North America. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 185-234, 2003.
- KUBES, V.; RÍOS, F. A. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. **Science**, v. 90, n. 2323, p. 20-21, 1939.
- KUHN, R. J. **Togaviridae: the viruses and their replication**. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). Fields virology. 5 ed. New York: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. p. 1001-1022.
- KUIKEN, T. et al. Pathogen Surveillance in Animals. **Science**, v. 309, n. 5741, p. 1680-1681, 2005.

- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KUNO, G. et al. Phylogeny of genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998.
- KUNO, G.; CHANG, G.J. J. Biological Transmission of Arboviruses reexamination of the new insights into Components, Mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005.
- KUTSUNA, S. et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 4, p. 1-4, 2014.
- KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Case Report: Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 516-517, 2013.
- LAILLE, M.; ROCHE, C. Comparison of Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene sequences from French Polynesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 4, p. 478-484, 2004.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.
- LAVERGNE, A. et al. Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research**, v. 117, n. 2, p. 283-290, 2006.
- LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.
- LESER, W. **Elementos em epidemiologia geral**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985.
- LEUNG, J. Y-S; NG, M. M-L; CHU, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Advances in Virology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.
- LEVIN, B. R.; LIPSITCH, M.; BONHOEFFER, S. Population Biology, Evolution, and Infectious Disease: Convergence and Synthesis. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 806-809, 1999.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, n. 3, p. 1-5, 2015.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.; RICE, C. M. **Flaviviridae**: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). *Fields virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-1152.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p.55-64, 2014.

LOPES, O. S. et al. Isolation of St Louis encephalitis virus in South Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 3, p. 583-585, 1979.

LORD, R. D. History and geographic distribution of Venezuelan equine encephalitis. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 2, p. 100-110, 1974.

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 799-800, 2002.

MADALENGOITIA, J.; FLORES, W.; CASALS, J. Arbovirus antibody survey of sera from residents of eastern Peru. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 77, n. 4, p. 300-310, 1973.

MAHER-STURGESS, S. L. et al. Universal primers that amplify RNA from all three *Flavivirus* subgroups. **Virology Journal**, v. 5, n. 16, p. 1-10, 2008.

MALONE, R. W. et al. Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-26, 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4-10, 2016.

MARLENEE, N. L. et al. Detection of antibodies to West Nile and Saint Louis encephalitis viruses in horses. **Salud Pública de México**, v. 46, n. 5, p. 373-375, 2004.

MATTAR, S. et al. West Nile Virus antibodies in colombian horses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1497-1498, 2005.

MCCLUSKEY, B. J. **Use of sentinel herds in monitoring and surveillance systems**. In: SALMAN, M. D. *Animal disease surveillance and survey systems: methods applications*. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 119-133.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073-1075, 2012.

MELO, R. M. et al. Ocorrência de equídeos soropositivos para os vírus das encefalomyelites e anemia infecciosa no estado do Mato Grosso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 169-175, 2012.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.

MEYER, K. F.; HARING, C. M.; HOWITT, B. The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, 1930. **Science**, v. 74, n. 1913, p. 227-228, 1931.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-319, 2004.

MONATH, T. P. **O desafio da Febre Amarela**. In: QUADROS, C. A. Vacinas. São Paulo: Roca, 2008. p. 67-76.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 176-178, 2007.

MONDINI, A. et al. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in Sao Paulo, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 5, p. e448, 2009.

MOORE, C. G. et al. **Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States**. Colorado: CDC; 1993.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MORSE, S. S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 7-15, 1995.

MOURÃO, M. P. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, n. 2, p. 286-302, 2012.

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

NAPOLEÃO-PEGO, P. et al. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, 2014.

NEMESIO, H.; VILLALAIN, J. Membranotropic regions of the dengue virus prM protein. **Biochemistry**, v. 53, n. 32, p. 5280-5289, 2014.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and 2 serotypes. **Epidemiology & Infection**, v. 111, n. 1, p. 163-170, 1993.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205-211, 2000.

NUNES, M. R. T. et al. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 12, p. 2583-2602, 2009.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December, 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, 2014.

OSANAI, C. H. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima – Nota Prévia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

PAHO. Pan American Health Organization. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory – 2015**. 2016.

Disponível em: <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en >. Acesso em 19 de jul. 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory – 2017**. 2017a.

Disponível em: <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en >. Acesso em 19 de jul. 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory – 2016**. 2017.

Disponível em: <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en >. Acesso em 19 de jul. 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Reported Cases of Dengue Fever in the Americas**. 2018. Disponível em: < <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html> >. Acesso em 30 de jul. 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Zika Cumulative Cases**. 2018a.

Disponível em: <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090&lang=en>. Acesso em 30 de jul. 2018.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Manual de normas e procedimentos para vacinação – Dengue**. 2016. Disponível em: <

http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/VacinaDENGUE_protocolo.pdf>. Acesso em 20 jul. 2018.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná – 2017/2018. Informe Técnico 39 – Período 2017/2018 – Semana Epidemiológica(SE) 31/2017 a 29/2018**. 2018. Disponível em: <

http://www.dengue.pr.gov.br/arquivos/File/Dengue_INFORME392018.pdf>. Acesso em 25 de jul. 2018.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná – 2016/2017. Informe Técnico 49 – Período 2016/2017 – Semana Epidemiológica(SE) 31/2016 a 30/2017**. 2017a. Disponível em: <

http://www.dengue.pr.gov.br/arquivos/File/dengue_49_2.pdf>. Acesso em 25 de jul. 2018.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. **Situação da Dengue, Chikungunya e Zika Vírus no Paraná – 2015/2016. Informe técnico 37 – Período 2015/2016. Semana Epidemiológica (SE) 31/2015 a 30/2016**. 2017. Disponível em: <

http://www.dengue.pr.gov.br/arquivos/File/DengueInformeTcnico37_2015_2016atSE302016_ZIKA_CHIKUNGUNYA_novatabelaCHIKUN_ZIKA_2017_02_22divulgado_final__1.pdf>. Acesso em 25 de jul. 2018.

PAUVOLID-CORRÊA, A. **Estudo sobre arbovírus em populações de equinos e artrópodes na sub-região da Nhecolândia no Pantanal de Mato Grosso do Sul**. 159 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125-133, 2015.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralizing antibodies for Venezuelan equine encephalitis virus in horses from Brazilian Pantanal. In: XXIV BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & VIII MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 2013, Porto Seguro. **Abstract/Posters...** 2013. p. 245-246.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 829-833, 2010.

PEREIRA SERRA, O. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20-29, 2016.

PFEFFER, M. et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 6, p. 709-718, 1997.

PFEFFER, M.; DOBLER, G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 35, p. 1-15, 2010.

PINHEIRO, F. P. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674-681, 1981.

PINHEIRO, V. C. S. et al. Detection of dengue vírus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 833-839, 2005.

PIRES-NETO, R. J. et al. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 843-852, 2005.

POLLETT, S. et al. Understanding dengue virus evolution to support epidemic surveillance and counter-measure development. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 62, p. 279-295, 2018.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PUPO, M. et al. West Nile Virus infection in humans and horses, Cuba. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1022-1024, 2006.

RABAAN, A. A. et al. Overview of Zika infection, epidemiology, transmission and control measures. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 2, p. 141-149, 2017.

RÁCZ, M. L. **Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 671-678.

RAGHWANI, J. et al. Endemic dengue associated with the co-circulation of multiple viral lineages and localized density-dependent transmission. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 6, p. e1002064, 2011.

RAMBAUT, A. et al. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). **Virus Evolution**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2016.

RAMBAUT, A. et al. **Tracer**, versão v. 1.6, 2013.

RAMBAUT, A. **Figtree**, versão 1.4, 2016.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. **Treeannotator**, versão 1.8, 2016.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005224, p. 2017.

RAY, D.; SHI, P. Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 45-55, 2006.

RICHARTZ, R. **Detecção de anticorpos inibidores de hemaglutinação para Alphavirus em soros de eqüinos do Estado do Paraná**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

RIDPATH, J. F.; FLORES, E. F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária*. 2 ed. Santa Maria: Editora da Universidade de Santa Maria, 2012. p. 563-591.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. First isolation of dengue in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.

RODPOTHONG, P. et al. Relative contribution of dengue prM- and E-specific polyclonal antibodies to neutralization and enhancement. **Acta Virologica**, v. 60, n. 3, p. 249-259, 2016.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2537, 2013.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2005.

SAMPATH, A., PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SAMSA, M. M. et al. Uncoupling cis-Acting RNA elements from coding sequences revealed a requirement of the N-terminal region of dengue virus capsid protein in virus particle formation. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2, p. 1046-1058, 2012.

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

SANTOS, F.B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 8, p. 1-4, 2011.

SCARAMOZZINO, N. et al. Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1922-1927, 2001.

SCHERER, W. F. et al. Ecologic studies of Venezuelan encephalitis virus in Peru during 1970-1971. **American Journal of Epidemiology**, v. 101, n. 4, p. 347-355, 1975.

SCHERER, W. F. et al. Study of VE virus and isolation of SLE, EE, group C, and GUAMA group arboviruses in the Amazon region of Peru, 1975. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 13, n. 3, p. 272-284, 1979.

SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921-923, 2013.

SILVA, M. L. et al. Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 3, p. 570-575, 2011.

SIM, S.; HIBBERD, M. L. Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. **Genome Biology**, v. 17, n. 38, p. 1-15, 2016.

SMITH, S. A. et al. Dengue virus prM-specific human monoclonal antibodies with virus replication-enhancing properties recognize a single immunodominant antigenic site. **Journal of Virology**, v. 90, n. 2, p. 780-789, 2015.

SMITHBURN, K.C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **The Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 223-234, 1952.

SMOLINSKI, M.S. et al. **Microbial Threats to Health: Emergence, Detection and Response**. Washington, DC: National Academies Press. 2003.

SOARES, A. M. **Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SOPER, F. L. Febre Amarela Silvestre. Novo aspecto epidemiológico da doença. **Revista de Higiene e Saúde Pública**, v. 10, p. 107-144, 1936.

SOUNIS, E. **Epidemiologia geral**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1985.

SOUZA, F. M. **Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos em localidades do sul do Brasil**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SOUZA, R. P. et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 5, n. 12, p. e1439, 2011a.

SUMMERS, D. J.; ACOSTA, R. W.; ACOSTA, A. M. Zika virus in an American recreational traveler. **Journal of Travel Medicine**, v. 22, n. 5, p. 338-340, 2015.

SUN, Y.; MENG, S. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of dengue virus type 1 in Asia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 19-26, 2013.

SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 280-286, 2014.

SVOBODA, W. K. **Vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em Saúde Pública**. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

TALARMIN, A. et al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 452-456, 1998.

TAYLOR, L. H.; LATHAM, S. M.; WOOLHOUSE M. E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

TEIXEIRA, L. A. Da transmissão hídrica a culicidiana: a febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. **Revista Brasileira de História**, v. 21, n. 41, p. 217-242, 2001.

THRUSFELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2004.

TITTARELLI, E.; MISTCHENKO, A. S.; BARRERO, P. R. Dengue Virus 1 in Buenos Aires from 1999 to 2010: Towards Local Spread. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111017, 2014.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665-668, 2016.

TORRES, J. R. et al. Family cluster of Mayaro fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p.1304-1306, 2004.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. **Arboviroses**. In: LEÃO, R. N. Q. Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque Amazônico, Belém: CEJUP, 1997. p. 207-225.

TRAVASSOS DA ROSA, J. E. S. et al. **Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathogeny for man**. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA

ROSA, J. F. S. An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries. Belém, 1998. p. 19-31.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 7 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 122-129, 2003.

URDANETA, L. et al. Detection of dengue viruses in Field-caught *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2005.

VANDAMME, A. M. **Basic Concepts of Molecular Evolution**. In: SALEMI, M. (Ed). The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, p.1-23. 2009.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 2-3, p. 117-124, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Epidemiologia das encefalites por arbovírus na amazônia brasileira. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465-476, 1991.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, suppl, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P. **Arboviruses pathogenic for man in Brazil**. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A; VASCONCELOS, P. F. C; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Eds.). An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 71-99.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532-541, 2011.

VELASQUEZ, J. Enfermedades de los animales transmisibles al hombre. **Revista de Medicina Veterinária**, p. 253-270, 1939.

VIEIRA, M. A. et al. West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377-379, 2015.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. A. Worldwide spread of Dengue virus type 1. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62649, 2013.

VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 85-90, 2016.

WÆHRE, T. et al. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1412-1414, 2014.

WANG, S.; HE, R.; ANDERSON, R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 2547-2551, 1999.

WANG, Z. et al. Vector competence of five common mosquito species in the People's Republic of China for Western equine encephalitis virus. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 7, p. 605-608, 2012.

WEAVER, S. C. et al. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Research**, v. 94, n. 3, p. 242-257, 2012.

WEAVER, S. C. et al. Reemergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. VEE Study Group. **The Lancet**, v. 348, n. 9025, p. 436-440, 1996.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 285-314, 2006.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, 2013.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p.789-801, 2004.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

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

WEBSTER, L. T.; WRIGHT, F. H. Recovery of Eastern equine encephalomyelitis virus from brain tissue of human cases of encephalitis in Massachusetts. **Science**, v. 88, n. 2283, p. 305-306, 1938.

WHO. World Health Organization. **Dengue vaccine**: WHO position paper – July 2016. Weekly epidemiological record, v. 91, n. 30. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1>>. Acesso em 20 jul. 2018.

WHO. World Health Organization. **WHO director-general summarizes the outcome of the emergency committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-**

Barré syndrome. 2016a. Disponível em: < <http://who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>>. Acesso em 10 fev. 2017.

WHO. World Health Organization. World Health Organization Technical Report Series 719. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases.** Geneva: 1985.

WIGG, M. D. **Isolamento de uma amostra de vírus WEE em *Haemagogus janthinomys*.** Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1977.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101 - e106, 2016.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1377-1390, 2008.

WOLFE, N. D. et al. Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing link? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 149-158, 1998.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1842-1847, 2005.

ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic Alphaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 281-286, 2010.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 32-35, 2015.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. Zika virus - An overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295-301, 2016.

ZANOTTO, P. M. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 548-553, 1996.

ZHANG, P. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105-110, 2013.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-823, 2014.

**APÊNDICE 1 – BANCO DE DADOS DE SEQUÊNCIAS GENÉTICAS DO VÍRUS
DENGUE SOROTIPO 1 UTILIZADAS PARA ELABORAÇÃO DAS ANÁLISES
FILOGENÉTICAS**

(continua)

Nº de acesso Genbank	Localização geográfica	Data de isolamento	Genótipo
AB519681	Brasil – Distrito Federal	2001	Genótipo V
AF311956	Brasil – Pernambuco	1997	
AF311958	Brasil – Pernambuco	1997	
AF513110	Brasil – Paraná	2001	
AF514883	Paraguai	2000	
AY277659	Argentina	2000	
AY277666	Argentina	2000	
FJ850073	Brasil – Nordeste	2001	
FJ850075	Brasil – Norte	2002	
FJ850084	Brasil – Norte	2005	
FJ850087	Brasil – Norte	2006	
FJ850090	Brasil – Norte	2007	
GQ199859	Nicarágua	2008	
GQ868570	Colômbia	2008	
GQ868601	Ilhas Virgens Britânicas	1985	
HM450093	Brasil – Piauí	2002	
HM450094	Brasil – Tocantins	2002	
HM450101	Brasil – Pará	2007	
HQ026762	Brasil – Rio de Janeiro	2010	
HQ332183	Venezuela	2007	
JN086990	Brasil – Paraná	2010	
JN086991	Brasil – Paraná	2010	
JN713897	Brasil – Roraima	2010	
JN982362	Brasil – Ceará	2010	
JQ675358	Estados Unidos	2010	
JX669474	Brasil – Pernambuco	2001	
JX669475	Brasil – Pernambuco	2002	
KC692513	Brasil – Região Norte	2010	
KC692514	Argentina	2010	
KF672759	Brasil – Rio de Janeiro	2010	
KF672760	Brasil – Rio de Janeiro	2011	
KF672763	Brasil – Espírito Santo	2000	
KF672764	Brasil – Rio de Janeiro	2001	
KF672773	Brasil – Rio Grande do Norte	1997	
KF672775	Brasil – Ceará	1998	
KF672785	Brasil – Espírito Santo	2010	
KF921911	Porto Rico	1996	
KF973462	Nicarágua	2011	
KF973472	Nicarágua	2012	
KF973475	Nicarágua	2012	
KJ189304	Colômbia	2005	
KJ189359	Porto Rico	2012	
KJ189367	Porto Rico	2010	
KJ189369	México	2011	
KJ651911	Brasil – Minas Gerais	2012	
KM093800	Brasil – Minas Gerais	2013	
KP188540	Brasil – São Paulo	2011	
KP188542	Brasil – São Paulo	2011	
KP188567	Brasil – São Paulo	2013	
KP188568	Brasil – São Paulo	2014	
KT279761	Haiti	2014	

(continuação)

Nº de acesso <i>Genbank</i>	Localização geográfica	Data de isolamento	Genótipo
KU509249	Jamaica	2012	Genótipo V
KU509264	Haiti	2010	
KY474307	Equador	2014	
LN835130	Brasil – São Paulo	2011	
LN835141	Brasil – São Paulo	2011	
LN835143	Brasil – São Paulo	2011	
AF298808	Djibouti	1998	Genótipo I
AF309641	Camboja	1998	Genótipo I
AF180817	Tailândia	1964	Genótipo II
EF457905	Malásia	1972	Genótipo III
JQ915073	Polinésia Francesa	2008	Genótipo IV
JQ915080	Nova Caledônia	2010	Genótipo IV

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 046/2016, referente ao projeto “Protocolo de monitoramento da Febre Maculosa Brasileira em áreas não endêmicas do Estado do Paraná: cavalos carroceiros e cães como sentinelas”, sob a responsabilidade de Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ • BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 06/07/2016.


Vigência do projeto	Agosto/2016 até Agosto/2018
Espécie/Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i> (cão) e <i>Equus caballus</i> (equídeo)
Número de animais	1113 (765 cães e 348 equídeos)
Peso/Idade	Cães: > 10 kg/ Não verificado; equídeos: 250 kg / Não verificado
Sexo	Não verificado
Origem	Animais de tutores das cidades de São José dos Pinhais e Foz do Iguaçu, Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 046/2016, regarding the project “Protocol for monitoring Brazilian Macular Fever in non-endemic areas of the State of Paraná: horses for traction and dogs as sentinels” under Thállitha Samih Wischral Jayme Vieirasupervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 07/06/2016.

Duration of the project	August/2016 until August/2018
Specie/Line	<i>Canis lupus familiaris</i> (dog) and <i>Equus caballus</i> (equidae)
Number of animals	1113 (765 dogs and 348 equines)
Wheight/Age	Dogs:> 10 kg / Not verified; equines: 250 kg / Not verified
Sex	Not verified
Origin	Animal owners from São José dos Pinhais and Foz do Iguaçu, Paraná

Curitiba, 6 de julho de 2016.


Simone Tostes de Oliveira Stedile
Coordenadora CEUA-SCA