

FELIPE LOPES DE ASSIS

**EVIDÊNCIAS DE UM CICLO SILVESTRE DO *Dengue virus*
NAS AMERICAS**

BELO HORIZONTE

2009

FELIPE LOPES DE ASSIS

**EVIDÊNCIAS DE UM CICLO SILVESTRE DO *Dengue virus*
NAS AMERICAS**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Erna Geessien Kroon

BELO HORIZONTE

2009

I RESUMO

O *Dengue virus* (DENV), pertence à família *Flaviviridae*, que compreendem vírus de RNA genômico, fita simples de senso positivo, envelopado, transmitidos por vetores artrópodes. O DENV pode causar desde uma doença branda, denominada febre do dengue (FD), a quadros mais graves com manifestações hemorrágicas (FHD). Atividades humanas como: transporte de animais, circulação de pessoas, reflorestamento e outros, são fatores que contribuem para a emergência da dengue e outras arboviroses. O ciclo ecológico do DENV é complexo e ainda não completamente elucidado. O DENV circula na Ásia e nas Américas através da transmissão ao homem pelo vetor artrópode do gênero *Aedes*. Na África, ocorre predominantemente a circulação silvestre do DENV. Nas Américas, animais silvestres não têm papel confirmado no ciclo da dengue. Recentes estudos sugerem um possível ciclo de amplificação secundário envolvendo outros mamíferos não primatas, como roedores, marsupiais e morcegos. Mas a questão se esses mamíferos mantêm o DENV em um ciclo enzoótico e desempenham um papel na sua re-emergência para a população humana ainda não está bem esclarecida. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar e discutir a relevância de achados epidemiológicos, que consistem na detecção de genoma viral e anticorpos neutralizantes contra DENV em órgão ou soro de animais silvestres na região da Guiana Francesa (GF) e em morcegos no México e anticorpos neutralizantes em morcegos na Costa Rica e Equador, na manutenção do DENV e possíveis reservatórios naturais. A baixa similaridade entre amostras de DENV-1 isoladas de animais silvestres na GF e amostras de DENV-1 endêmicas em humanos na mesma região, sugerem uma circulação silvestre do DENV na região. Amostras de DENV-2 isoladas de animais na GF parecem estar associadas a possíveis hospedeiros-reservatórios não humanos e podem estar relacionadas a um ciclo silvestre na região. Porém, estudos adicionais precisam ser conduzidos para que se possa caracterizar a manutenção do DENV através de um reservatório mamífero não humano, e não uma infecção ocasional da fauna silvestre. Amostras de DENV-3 isoladas na GF parecem estar relacionada a uma circulação viral na região em hospedeiros-reservatórios silvestres durante períodos inter-epidêmicos. Um forte indicio para isso é também a grande similaridade entre amostras isoladas de animais silvestres com amostras isoladas de mosquitos (99,1-99,7% de nt e 99-100% de aa).

A identidade de 100% entre amostras de DENV detectadas na mesma espécie animal em períodos distintos sugere a participação desta espécie na circulação do DENV. Testes sorológicos e moleculares realizados em morcegos no México, e a presença de anticorpos neutralizantes em morcegos na Costa Rica e Equador apesar de inconclusivos para ocorrência de uma infecção ativa e possível participação de animais silvestres no ciclo do DENV, representam fortes indícios para tal afirmação. Os dados aqui apresentados não respondem a todas as perguntas acerca do possível ciclo silvestre do DENV na América, tão pouco a participação destes animais como reservatórios. Para isso novas pesquisas devem ser conduzidas no intuito de se conhecer melhor o ciclo de multiplicação do DENV nos diversos ambientes, para que possamos traçar a melhor estratégia epidemiológica contra ele.

II ABSTRACT

Dengue virus belongs to the *Flaviviridae* family, which comprises genomic RNA virus, single stranded negative sense, enveloped, viruses vectored by arthropods. DENV can cause a mild disease, named dengue fever (DF), until severe disease with bleeding, named dengue hemorrhagic fever (DHF). Human activities like: animals traffic, people circulation, reforestation and others, are factors that contribute to DENV and other arboviruses emergence. The ecological cycle of DENV is complex and not completely understood. DENV circulates in Asia and Americas vectored to humans by the vector of *Aedes* genus. In Africa, occurs predominantly DENV wild circulation. In Americas, wild animals have no confirmed role in DENV cycle. Recent studies suggest a possible secondary cycle of amplification involving mammalian non-primates such as rodents, marsupials and bats. But, if those animals keep the DENV in an enzootic cycle and it plays a role in DENV emergence is not well elucidated. Thus, this study aims to assess and discuss the relevance of epidemiological findings, involving the detection of viral genome and neutralizing antibodies against DENV, in organs or serum of wild animals in the region of French Guiana (GF) and in Mexican bats, besides neutralizing antibodies in bats of Costa Rica and Ecuador, in the maintenance of DENV and possible natural reservoirs. The low similarity between samples of DENV-1 isolated from wild animals in the GF and samples of DENV-1 endemic in humans in the same region, suggest a wild movement of DENV in the region. DENV-2 isolated from animals in the GF seems to be associated with possible non-human host reservoirs and may be related to a sylvatic cycle in the region. However, further studies should be conducted so that we can characterize the maintenance of DENV reservoir through a non-human mammal, not just an occasional infection from wildlife. DENV-3 isolated in GF looks to be related to a regional virus circulation in a wild host-reservoir during inter-epidemic periods. A strong clue to this is also the great similarity between samples isolated from wild animals with samples isolated from mosquitoes (99,1-99,7% of nt and 99-100% of aa). One hundred percent of identity between DENV detected in the same animal species in different periods suggests the involvement of this species in the circulation of DENV. Serological and molecular tests performed on Mexican bats, and neutralizing antibodies found in bats from Costa Rica and Ecuador, although inconclusive for the occurrence of an active infection and possible role of wild

animals in the DENV cycle, represent strong evidence for this assertion. The data presented here do not respond all the questions about the possible DENV sylvatic cycle in America, or the wild animal's role as a natural reservoir of DENV. For this, new research should be conducted in order to better understand the DENV replication cycle in different environments, so we can trace the best epidemiological strategy against it.

III LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Vetores artrópodes..... | 13 |
| Figura 2: Representação da estrutura da partícula viral do DENV..... | 21 |
| Figura 3: Estrutura genômica do <i>Dengue virus</i> | 22 |
| Figura 4: Ciclo de multiplicação do DENV..... | 23 |
| Figura 5: Ciclos de transmissão do DENV..... | 26 |
| Figura 6: Distribuição geográfica do DENV..... | 27 |
| Figura 7: Média anual e países com notificações de dengue..... | 27 |
| Figura 8: Análise filogenética de amostras de DENV-1..... | 36 |
| Figura 9: Análise filogenética de amostras de DENV-2..... | 39 |
| Figura 10: Análise filogenética de amostras de DENV-3..... | 42 |

IV LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-------|
| Tabela 1: Casos notificados, confirmados e óbitos por Febre Hemorrágica do Dengue 2004-2010..... | 24 |
| Tabela 2: Amostras de DENV detectadas em animais silvestres, soro humano e mosquitos..... | 33/34 |
| Tabela 3: Similaridade entre amostras de DENV-1..... | 35 |
| Tabela 4: Similaridade entre amostras de DENV-2..... | 37 |
| Tabela 5: Similaridade entre amostras de DENV-3..... | 40 |

V LISTA DE ABREVIATURAS

BTV – *Bluetongue virus*

CDC: Centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos (*do inglês, “US Center for diseases control and prevention”*)

CHIKV - *Chikungunya virus*

DENV – *Dengue virus*

FD – Febre do dengue

FHD – Febre hemorrágica do dengue

IFN – Interferon

IL - Interleucina

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF - ORF: Janela aberta de leitura (*do inglês, “open reading frame”*)

RNA - Ácido ribonucléico

RVFV - *Rift Valley fever virus*

SCD – Síndrome do Choque do dengue

SEMG – Secretaria do Estado de Minas Gerais

SINAN - Sistema nacional de agravos notificáveis

SLEV – *Saint Louis encephalitis virus*

SVS/MS – Secretaria de vigilância em saúde / Ministério da Saúde

TNF – Fator de necrose tumoral (*do inglês “tumoral necrosis factor”*)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UTR – Região terminal não traduzida (*do inglês “untranslated terminal region”*)

VEEV - *Venezuelan equine encephalitis virus*

WNV – *West Nile virus*

YFV – *Yellow fever virus*

VI SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| I RESUMO..... | 3 |
| II ABSTRACT | 5 |
| III LISTA DE FIGURAS | 7 |
| IV LISTA DE TABELAS..... | 8 |
| V LISTA DE ABREVIATURAS | 9 |
| VI SUMÁRIO | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVO..... | 12 |
| 3. METODOLOGIA..... | 12 |
| 4. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA..... | 15 |
| 4.1 ARBOVIRUS..... | 15 |
| 4.1.1 Espectro de hospedeiros..... | 16 |
| 4.1.2 Emergência de arboviroses..... | 17 |
| 4.2 FAMÍLIA Flaviviridae..... | 19 |
| 4.3 GÊNERO Flavivirus | 20 |
| 4.4 Dengue virus..... | 22 |
| 4.4.1 Morfologia e Genoma Viral..... | 22 |
| 4.4.2 Ciclo de multiplicação do DENV..... | 24 |
| 4.4.3 Patogênese Viral | 25 |
| 4.4.4 Ciclos de Transmissão | 27 |
| 4.4.5 Epidemiologia..... | 28 |
| 4.4.6 Amostras Silvestres do DENV..... | 31 |
| 4.4.7 Possível Reservatório do DENV | 32 |
| 5. RESULTADOS | 35 |
| 6. DISCUSSÃO | 43 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 44 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são agentes infecciosos intracelulares, parasitas dos organismos vivos. São capazes de subverter a maquinaria biossintética da célula hospedeira a fim de gerar um ambiente intracelular favorável à sua multiplicação. Contudo, os organismos possuem mecanismos para identificar uma infecção e combatê-la. A resolução deste processo dependerá da virulência do agente infeccioso e do estado imunológico do hospedeiro, podendo evoluir ou não para a doença. Estes agentes têm sido amplamente estudados devido aos impactos causado por eles na saúde pública e na economia, uma vez que podem afetar populações animais e vegetais (Arnold et al., 2007).

Estudos ao longo dos anos, nos permitiram compreender alguns dos mecanismos virais e anti-virais existentes. Entretanto, os vírus possuem uma grande capacidade de evadir às defesas do hospedeiro, isto devido à simplicidade de sua estrutura genômica, e constantes mutações. Este fato, aliado a fatores ambientais, sociais, alimentação, políticas públicas, comportamentais (sexo, drogas, viagens) e cuidados com a saúde (imunossupressão, antibióticos), tem contribuído para a emergência e re-emergência de doenças graves como, por exemplo, doenças zoonóticas (hantavirose e arenavirose) e arboviroses como febre amarela, encefalite eqüina venezuelana e dengue (Clarence, 2007).

Os vírus, por serem organismos intracelulares obrigatórios, evoluem à medida que todos os organismos evoluem, resultando em uma co-evolução dependente. Acredita-se que os vírus surgiram ao mesmo tempo em que os primeiros organismos celulares, e desde então vem evoluindo em conjunto. Neste contexto, os vírus emergentes que acometem os humanos geralmente possuem um hospedeiro-reservatório não-humano (Esteban, 2007). Muitos vírus têm tido seus reservatórios naturais caracterizados, como é o caso do *Marburg virus*, que em 2007 foi descoberto que o morcego *Rousettus aegyptiacus* nativo do Gabão, na África, era seu reservatório natural (Jonathan et al., 2007). Estes achados nos ajudam a entender melhor a ecologia e epidemiologia dos vírus.

Acreditava-se que o Dengue virus (DENV), diferente da maioria dos Arbovirus, não

possuía um ciclo silvestre nas Américas. Este ciclo era admitido apenas na África, Ásia e possivelmente nas Filipinas (Fagbami et al., 1977; Inoue et al., 2003). Porém, estudos sorológicos e moleculares sugerem um possível ciclo de amplificação secundária envolvendo outros mamíferos não primatas, como roedores, marsupiais e morcegos (de Thoisy et al., 2009; Aguilar-Setién et al., 2008; de Thoisy et al., 2004; Platt et al., 2000; Eryu Manga et al., 2000).

A circulação silvestre do DENV no oeste africano é comum, onde são isolados DENV-1 e DENV-2 de macacos e de mosquitos do gênero *Aedes*. Estas amostras isoladas são distintas dos vírus circulantes entre humanos, sugerindo um ciclo endêmico no ambiente silvestre. No Sri Lanka, pesquisadores evidenciaram um surto epizootico de DENV infectando a espécie primata *Macaca sinica*, levantando a discussão sobre a possível existência de um reservatório silvestre do DENV (Silva et al., 1999).

No entanto, nenhuma associação foi feita entre os achados sorológicos e moleculares de DENV em animais silvestres, e uma possível circulação silvestre de DENV no continente Americano, bem como a possível existência de reservatórios naturais do DENV.

2. OBJETIVO

Contudo, o objetivo deste trabalho foi comparar sequências genômicas, depositadas no Genbank, de amostras detectadas em animais silvestres com amostras humanas brasileiras e de outras regiões da América, África e Ásia, a fim de associá-las a um possível ciclo de transmissão silvestre, bem como à possíveis hospedeiros-reservatórios silvestres do DENV.

3. METODOLOGIA

Um estudo filogenético foi realizado para avaliar a relação entre amostras de DENV detectadas em animais silvestres na Guiana Francesa no ano de 2006 e 2007 com amostras de DENV relacionadas a diferentes manifestações clínicas da doença

oriundas do Estado de Minas Gerais e do Piauí e amostras detectadas em mosquitos coletados em Minas Gerais. As amostras de DENV detectadas em animais silvestres, soro de pacientes no Brasil e mosquitos estão descritas na **TABELA 1**. As amostras de DENV detectadas em animais silvestres foram caracterizadas por **de Thoisy et al., 2009**. As amostras de DENV detectadas em mosquito e soro de humanos foram identificadas pelo Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As seqüências de nucleotídeos das amostras descritas na **TABELA 1**, referentes à região gênica C-prM do DENV, foram alinhadas entre si, com amostras do mesmo sorotipo. Em todos os alinhamentos foram calculadas as taxas de similaridade entre as amostras pelo programa LALING. Foi feito um estudo filogenético empregando as amostras de DENV descritas na **TABELA 2**, e outras amostras originárias do Brasil, de diferentes localidades da América e da Ásia.

| Sorotipo | Nº de identificação | Origem da amostra / ano | GenBank |
|----------|----------------------|-------------------------|----------|
| DENV-1 | D1 C0558 – Morcego | Guiana Francesa /2007 | EU518594 |
| DENV-1 | D1 BH-4/FD | Belo Horizonte/MG | - |
| DENV-1 | D1 BH-9/FHD | Belo Horizonte/MG | - |
| DENV-1 | D1 BR/97-233 | Brasil/1997 | - |
| DENV-1 | D1 BR/01-MR | Brasil/2001 | - |
| DENV-1 | D1 BR/97-111 | Brasil/1997 | - |
| DENV-2 | D2 B1032 – Marsupial | Guiana Francesa /2006 | EU518601 |
| DENV-2 | D2 B1015 – Marsupial | Guiana Francesa /2006 | EU518602 |
| DENV-2 | D2 B1010 – Marsupial | Guiana Francesa /2006 | EU518603 |
| DENV-2 | D2 B1004 – Marsupial | Guiana Francesa /2006 | EU518604 |
| DENV-2 | D2 PI-55/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-58/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-59/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-62/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-82/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-92/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-100/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 PI-111/2006 | Piauí/ 2006 | - |
| DENV-2 | D2 Brasil/2006 | Rio de Janeiro/2006 | - |
| DENV-2 | D2 Brasil/1998 | Rio de Janeiro/1998 | - |

| | | | |
|--------|------------------------|----------------------|----------|
| DENV-3 | D3 C1034 – Marsupial | Guiana Francesa/2007 | EU518598 |
| DENV-3 | D3 B1018 – Marsupial | Guiana Francesa/2006 | EU518599 |
| DENV-3 | D3 B1106 – Roedor | Guiana Francesa/2006 | EU518600 |
| DENV-3 | D3 - B1106 – Roedor | Guiana Francesa/2006 | EU518600 |
| DENV-3 | D3 Mosquito fêmea -14 | Belo Horizonte/2005 | - |
| DENV-3 | D3 Mosquito macho - 1 | Belo Horizonte/2006 | - |
| DENV-3 | D3 Larva BH-11 | Belo Horizonte/2006 | - |
| DENV-3 | D3 Mosquito fêmea - 15 | Belo Horizonte/2006 | - |
| DENV-3 | D3 Mosquito fêmea -17 | Belo Horizonte/2006 | - |
| DENV-3 | D3 MG-20 FHD | Minas Gerais/2002 | EF428572 |
| DENV-3 | D3 MG-27 | Minas Gerais/2002 | EF428573 |
| DENV-3 | D3 MG-21 | Minas Gerais/2003 | EF428568 |
| DENV-3 | D3 BH- 16 | Belo Horizonte/2003 | EF428575 |
| DENV-3 | D3 BH-19 | Belo Horizonte/2003 | EF428574 |
| DENV-3 | D3 BH-22 | Belo Horizonte/2004 | EF428571 |
| DENV-3 | D3 BH-24 | Belo Horizonte/2003 | EF428570 |
| DENV-3 | D3 BH-25 | Belo Horizonte/2003 | EF428569 |
| DENV-3 | D3 Brasil/2002 | Brasil/2002 | AY679147 |
| DENV-3 | D3 Brasil-PI-80 | Piauí/2006 | - |

Tabela 2: Amostras de DENV detectadas em animais silvestres, soro humano e mosquitos usados neste estudo. **Fonte:** Thoisy et al., 2009; Figueiredo et al., 2008)

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras, bem como a construção das árvores filogenéticas foram feitas utilizando o programa MEGA 4.1. A filogenia foi estabelecida pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura–Nei implementado no programa MEGA 4.1. As tabelas de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos foram construídas utilizando-se seqüências de nucleotídeos obtidas no Genbank e comparadas utilizando a plataforma LALIGN (site: http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

4. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

4.1 ARBOVIRUS

O termo arbovírus é uma contração do termo *arthropod-borne vírus* (vírus transmitidos por artrópodes). Trata-se de um termo sem importância taxonômica, sendo um termo ecológico usado para classificar os vírus que requerem um artrópode hematófago para a transmissão entre hospedeiros. (WHO, 1985). Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS) os arbovírus são mantidos na natureza pela transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos (**Figura 1**), ou por transmissão transovariana e possivelmente venérea em artrópodes.

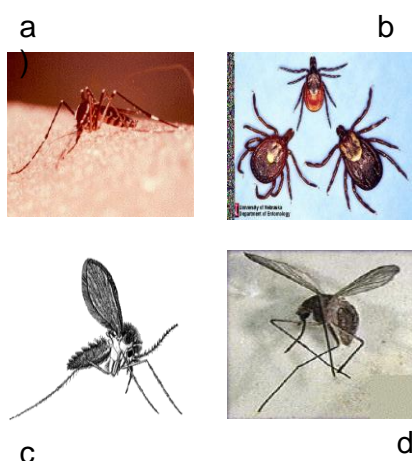


Figura 1 – Vetores artrópodes. a) *Aedes aegypti*; b) Carrapatos; c) mosquito pólvora; d) mosquito *Culex*. Doenças veiculadas por mosquitos: encefalite japonesa, Oeste do Nilo, dengue, febre amarela, encefalites St. Louis, equinas Leste, Oeste, Venezuelana; doenças veiculadas por carrapato: febre da criméia-congo; doença veiculada por mosquito pólvora: febre da sandfly siciliana, febre do Vale Rift.

Existem 538 vírus registrados no catálogo internacional de arbovírus; 218 (40%) são conhecidos ou prováveis arbovírus. Os demais 287(54%) são listados como possíveis arbovírus e 33 (6%) são listados como definitivamente ou provavelmente não sendo arbovírus. Dos 538 vírus registrados, 134 estão envolvidos em casos documentados de doenças em humanos (Gubler, 2001).

O grupo dos arbovírus é bastante diverso, representado por oito famílias e quatorze gêneros. Existem alguns vírus classificados como arbovírus que ainda não foram classificados taxonomicamente. A grande maioria dos arbovírus pertence à família

Bunyaviridae, com cerca de 248 vírus. Os vírus desta família, juntamente com aqueles pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, são os mais importantes patógenos da perspectiva da saúde pública (Gubler, 2001).

Durante as últimas décadas vários arbovirus patogênicos, tanto para o humano quanto para os animais, têm emergido e causado epidemias em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, mas também na América do Norte, Europa e Península Arábica. Esta emergência pode ser atribuída aos impactos da mudança do clima, níveis locais de desenvolvimento sócio-econômico, transporte de pessoas e transportação comercial, urbanização, desmatamentos, aumento da densidade de populações humanas, animais e de artrópodes, atividades políticas e militares (Gould & Higgs, 2009).

Os arbovírus possuem uma grande distribuição geográfica, que é definida por parâmetros ecológicos que envolvem seus ciclos de multiplicação. Importantes fatores como temperatura, umidade e tipo de vegetação influenciam a distribuição dos vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados requeridos para a manutenção viral. A maioria dos arbovírus possui um ciclo silvestre envolvendo um hospedeiro primário vertebrado não humano, e um vetor primário artrópode, normalmente sendo um mosquito ou carrapato. Este ciclo não é detectado até que ocorra uma mudança no meio ambiente que permita ao vírus migrar para um vetor ou hospedeiro secundário (Gubler, 2001; Figueiredo, 2007).

As mais importantes doenças causadas por vírus das principais famílias dos arbovírus são: *Togaviridae* (ex: encefalites equinas Leste, Oeste e Venezuelana), *Bunyaviridae* (ex: febre da sandfly (mosquito pólvora), febre do Vale Rift, febre hemorrágica da Criméia-Congo) e *Flaviviridae* (ex: febre amarela, febre do dengue, encefalite japonesa) (Gubler, 2001).

4.1.1 Espectro de hospedeiros

Muitas pandemias têm sido atribuídas à capacidade de muitos vírus de alterar seu espectro de hospedeiro. Agentes infecciosos que infectam mais de uma espécie de hospedeiros são ubíquos. No caso dos arbovírus, este espectro é grande, sendo

requerido primariamente aves, e uma grande variedade de mamíferos, incluindo primatas, roedores e humanos. Hospedeiros secundários conhecidos são: humanos, suínos e eqüinos (Weaver et al., 2004; Haydon, 2002).

A maioria das infecções por arbovírus são assintomáticas, ou desenvolvem sintomas prodrômicos. Porém, alguns alphavirus e flavivirus causam doenças graves em humanos causando doenças que acometem o sistema nervoso central, podendo levar a morte (Weaver et al., 2004).

Chikungunya virus (CHIKV), membro do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, é responsável pela maioria dos surtos de artralgia febril em humanos. O *Rift Valley fever virus* (RVFV), membro do gênero *Phlebovirus* da família *Bunyaviridae*, causa doença grave com altas taxas de aborto e mortalidade na pecuária. Doenças em humanos provocadas por RVFV são raras, mas ocorrem sintomas graves (Weaver et al., 2004). O *Bluetongue virus* (BTV), pertencente ao gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*, é um vírus de grande importância econômica acometendo ovinos, bovinos e caprinos. O *West Nile virus* (WNV), membro do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, é um vírus de grande importância para a saúde pública, sendo associado a doenças neurológicas em humanos, como encefalite e meningite, encefalite em eqüinos e morte de aves (Komar et al., 2003).

O DENV é considerado por muitos pesquisadores o mais importante arbovirus patogênico para o homem. Além disso, estudos sobre a ecologia do DENV em ambientes silvestres do Oeste da África e Malásia demonstram que o DENV está associado também a um ciclo de transmissão envolvendo primatas não humanos como hospedeiros-reservatórios. Sabe-se também que o DENV é capaz de infectar outros mamíferos não primatas (Scott et al., 2004; de Thoisy et al., 2009).

4.1.2 Emergência de arboviroses

Novos vírus estão sendo frequentemente descobertos. Porém, o maior problema para a saúde humana, desde meados do século XX, tem sido o ressurgimento de doenças que se pensavam estarem controladas, como por exemplo, a febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do Dengue (FHD), febre amarela, encefalite

japonesa e infecções pelo WNV (Gubler, 2001).

As razões para a drástica emergência de doenças provocadas por arbovírus são complexas e ainda não completamente esclarecidas. Os arbovírus desenvolveram uma série de estratégias de sobrevivência às mudanças ambientais. A transmissão destes vírus entre invertebrados e vertebrados resulta em pressões seletivas no processo evolutivo e de dispersão, refletindo em suas relações filogenéticas, mas este é um mecanismo complexo e ainda não completamente elucidado (Gould et al., 2006; Gubler, 2001).

Altas taxas de transmissão, associadas à atividade epidêmica, e transmissão por diferentes vetores e hospedeiros vertebrados, em novas áreas geográficas pode resultar em pressões seletivas que levam a mudanças genéticas no patógeno. Estas novas amostras virais podem ter sua virulência e potencial epidêmico aumentados (Gubler, 2001).

O *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV) e o *Japanese encephalitis virus* (JEV) causam epidemias adaptando-se a animais domésticos e utilizando-os como hospedeiros, onde promovem a amplificação viral (Scott et al., 2004). O *Yellow fever virus* (YFV) circula entre símios e mosquitos do gênero *Aedes* e *Hemagogus* ssp nas florestas e regiões de savana na África e na América do Sul. Na África, primatas não humanos apresentam uma infecção assintomática após infecção com YFV, possivelmente pela adaptação destes hospedeiros ao vírus. Entretanto, epidemias de febre amarela ocorrem nessa região devido à emergência esporádica do vírus vindo das florestas e savanas, sendo introduzido nas áreas rurais e urbanas. Nas florestas americanas, macacos moribundos são frequentemente encontrados pouco antes do início de epidemias de YFV, indicando uma recente introdução do vírus em determinadas regiões (Gould et al., 2006).

Durante os últimos 50 anos a prevalência do DENV na população humana vem aumentando exponencialmente, tornando-o o mais importante arbovirus emergente no ponto de vista da saúde humana. Aproximadamente 2,500 milhões de pessoas (40% da população mundial) estão sob risco de infecção. Cerca de 50 milhões de casos são reportados em todo o mundo a cada ano (Scott et al., 2004) com cerca de

500,000 casos de FHD e 22,000 mortes, a maioria entre crianças (CDC, 2009).

4.2 FAMILIA Flaviviridae

A família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, que significa amarelo), consiste de uma família de vírus transmitidos por vetores artrópodes. Esta família é formada pelos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. Os vírus da família *Flaviviridae* apresentam semelhanças morfológicas, de organização genômica e de estratégia de multiplicação. Porém, vírus de gêneros diferentes dentro da família *Flaviviridae* apresentam diversidade quanto a propriedades biológicas bem como ausência de reatividade sorológica cruzada (Lindenbach et al., 2007).

De acordo com Comitê Internacional de taxonomia de vírus, os vírus da família *Flaviviridae* são constituídos por nucleocapsídeo e envelope. Os vírus são de esféricos a pleomórficos, medindo entre 40-60 nm de diâmetro. Apresentam pequenas projeções superficiais denominadas espículas. O núcleo é isométrico com diâmetro de 25-30 nm. Possuem um segmento genômico de fita simples, polaridade positiva e não segmentado. O genoma completo varia entre 9,500-12,500 nucleotídeos. A região terminal 5' do genoma possui nucleotídeo CAP metilado, ou proteína VPg ligada ao genoma. A região terminal 3' não possui cauda poli A, com exceção de algumas amostras de *Flavivirus* pertencentes ao complexo encefalite transmitido por carrapatos. O genoma codifica para 3 a 4 proteínas estruturais e outras não estruturais. Lipídeos estão presentes localizados no envelope (15-20% do peso do vírus) (ICTVdB, 2006).

Várias doenças humanas e animais estão associadas a vírus da família *Flaviviridae*. Cerca de 120 milhões de pessoas são infectadas com o vírus da Hepatite C (gênero *Hepacivirus*) em todo o mundo. Estes indivíduos apresentam risco de desenvolver cirrose, carcinoma hepato-celular e doenças extra-hepáticas. Os vírus pertencentes ao gênero *Pestivirus* são patógenos de animais e possuem um grande impacto comercial na indústria agropecuária. Os vírus do gênero *Flavivirus* compreendem agentes de doenças veiculadas por vetores. Muitos destes são re-emergentes, se dispersando para novos ambientes, provocando epidemias com altas taxas de morbidade e mortalidade nos indivíduos acometidos (Catherine, 2008). O

significativo aumento dos vírus do gênero *Flavivirus* como patógeno humano e animal enfatizam a necessidade de mais estudos acerca destes vírus (Lindenbach et al., 2007).

4.3 GÊNERO *Flavivirus*

Os vírus do gênero *Flavivirus* são classificados como arbovírus do grupo B. O gênero *Flavivirus* inclui arbovírus transmitidos por mosquitos ou carrapatos, acometendo humanos e animais. Este gênero contém 78 espécies virais, dos quais 39 são transmitidos por mosquitos, 21 são transmitidos por carrapatos, 16 não possuem vetor conhecido e 2 ainda aguardam por aceitação de inclusão no gênero (ICTVdB, 2006). Os flavivirus apresentam RNA fita simples, senso positivo, como todos os outros vírus da família *Flaviviridae*, com genoma de aproximadamente 11 Kb. O RNA genômico representa o único RNA mensageiro em células infectadas pelo vírus e codifica uma única poliproteína, que sofre clivagens pós traducionais para formar 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais, tendo a proteína de envelope E como a mais antigenicamente importante (Mackenzie et al., 2004).

A dificuldade encontrada na classificação dos vírus do gênero *Flavivirus* parcialmente deriva-se da extensiva distribuição geográfica, grande diversidade dos vetores e hospedeiros associados com a transmissão biológica desses vírus. Embora todos os vírus do gênero *Flavivirus* sejam sorologicamente relacionados, eles podem também formar grupos distintos, dos quais os mais importantes são o grupo sorológico do dengue, o grupo sorológico da encefalite japonesa e o menos coesivo grupo sorológico do vírus da febre amarela (Mackenzie et al., 2004; Kuno et al., 1998).

A origem dos vírus do gênero *Flavivirus* tem sido investigada pela extensiva análise de seqüências genômicas calculando as taxas de substituição de bases em genes estruturais e não estruturais conservados ou seqüências genômicas completas. Três grupos distintos de vírus do gênero *Flavivirus* - vírus transmitidos por mosquitos, vírus transmitidos por carrapatos e vírus não associados a vetores – foram reconhecidos baseados em dados filogenéticos e associação ao hospedeiro-vetor. Hipótese envolvendo estes dados e propriedades biológicas virais apontam para

existência de um ancestral comum aos vírus do gênero *Flavivirus* na África à aproximadamente 10.000 anos. Evidências apontam para uma divergência, a partir de amostras virais não transmitidas por vetores, dos vírus transmitidos por carrapatos a cerca de 3.000 anos, seguido dos vírus transmitidos por mosquitos (Mackenzie et al., 2004; Kuno et al., 1998).

Os vírus transmitidos por mosquitos são todos encontrados no velho mundo (África, Europa, Ásia e ilhas adjacentes) e são relacionados aos mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Doenças hemorrágicas, encefalite, doença febril, paralisia e icterícia são manifestações típicas das doenças em seres humanos, após infecção por flavivírus. Em geral os vírus do gênero *Flavivirus* não causam doenças graves em seu hospedeiro natural. Trata-se de uma característica evolucionária para garantir a manutenção do vírus no ambiente, por não matar seu hospedeiro. Apenas uma pequena porcentagem das infecções resulta em casos mais graves (Solomon et al., 2001). Apesar de terem suas características bem definidas, estes vírus ainda são imprevisíveis com aumento da gravidade das infecções, manifestações clínicas atípicas, métodos de transmissão inesperados e descoberta de novas espécies (Gould et al., 2008).

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, transmitidos por mosquitos, representam os mais importantes exemplos de agentes de doenças emergentes e re-emergentes de significância global, e um dos primeiros exemplos documentados de como estes vírus podem se deslocar geograficamente: Durante os séculos XVIII e XIX, o vírus da febre amarela foi disseminado no continente americano, vindo da África, provavelmente em navios que praticavam o tráfico de escravos (Mackenzie et al., 2004; Gould et al., 2008).

Pesquisas acerca dos reservatórios naturais de vírus do gênero *Flavivirus* não são frequentemente realizadas, e poderiam contribuir para o entendimento da re-emergência desses vírus em regiões urbanas. Em ambientes onde a presença do homem é limitada, os vírus do gênero *Flavivirus* são mantidos em ciclos silvestres envolvendo vetores artrópodes e hospedeiros mamíferos diversos. **de Thoisy e colaboradores (2004)** identificaram a presença de anticorpos neutralizantes em diversos animais silvestres da floresta amazônica na região da Guiana Francesa.

Estes achados podem fornecer informações sobre como estes vírus são mantidos na natureza, durante períodos inter-epidêmicos, em possíveis hospedeiros-reservatórios silvestres.

4.4 Dengue virus

O DENV é um antigo patógeno humano. Estudos históricos de doenças clínicas apontam para a possibilidade de dengue durante a dinastia chinesa (ano 265-420 dc). Porém, grandes epidemias foram relatadas na Ásia, África e América do Norte, apenas no século XVIII. Surtos de dengue foram registrados na França e Panamá, durante o século XVII (Gubler et al., 1998). O primeiro relato de epidemia aconteceu em 1780, na Filadélfia, por Benjamim Rush e a primeira grande epidemia de febre hemorrágica do dengue (FHD) ocorreu na Filipinas em 1953 e 1954. Em 1970, tinha se tornado a maior causa de mortes e hospitalizações entre crianças daquela região (Rigau-Pérez, 2006; Gubler et al., 1998).

A Dengue é causada por quatro sorotipos virais: *Dengue virus 1* (DENV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), *Dengue virus 3* (DENV-3) e *Dengue virus 4* (DENV-4) relacionados antigenicamente, porém geneticamente distintos. Cada sorotipo é subdividido em genótipos denominados “clusters”, que por sua vez são compostos por grupos denominados “clados”. Para o DENV-1 foram descritos 5 genótipos, incluindo um clado silvestre. Para o DENV-2 foram descritos também cinco genótipos: silvestre, americano, cosmopolita, asiático e asiático-americano (Rico-Hesse, 1990; Jennifer & Eva, 2008). O DENV-3 é dividido em 4 genótipos: I – Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Pacífico Sul; II – Tailândia; III – Sri Lanka, Índia, África e Samoa; IV – Porto Rico e vírus do Taiti de 1965, algumas vezes sendo referido o sorotipo V; DENV-4 é dividido em 2 genótipos endêmicos: I – Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; e II – Taiti, Indonésia, Ilhas do Caribe, América do Sul e Central, e um silvestre (Lanciotti et al., 1994; Lanciotti et al., 1997; Jennifer & Eva, 2008).

4.4.1 Morfologia e Genoma Viral

A partícula do DENV consiste de um envelope e um nucleocapsídeo. Os vírus são

esféricos com diâmetro entre 40-60 nm. Possui pequenas projeções superficiais ao redor de toda a partícula. O núcleo é isométrico com diâmetro entre 25-30 nm. O envelope viral é constituído por duas proteínas; a M (membrana) e a E (envelope). A proteína E medeia a ligação e fusão durante a penetração viral. A proteína M, produzida durante a maturação viral, é um pequeno fragmento proteolítico do precursor da proteína prM. O nucleocapsídeo é constituído pela proteína C (capsídeo) e o genoma (RNA) viral (**Figura 2**) (Lindenbach & Rice, 2003; ICTVdB/*Dengue virus*, 2006).

O DENV possui um genoma de 11.000 nucleotídeos, constituído de uma fita única de RNA polaridade positiva. Seu genoma possui uma única janela aberta de leitura (ORF), que codifica para uma poliproteína, que sofre processamentos co- e pós-traducionais, para formar três proteínas estruturais: proteína de capsídeo (C), proteína de envelope (E) e proteína de pré-membrana (prM); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (**Figura 3**) (Aleshin et al., 2007; Chambers et al., 2000; Gubler, 1998).

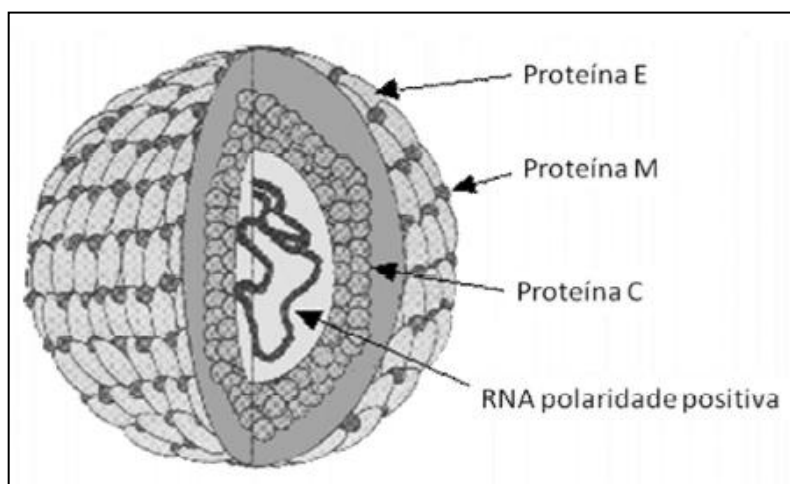


Figura 2: Representação da estrutura da partícula viral do DENV. **Fonte:** Sanchez, 2005 – Modificado.

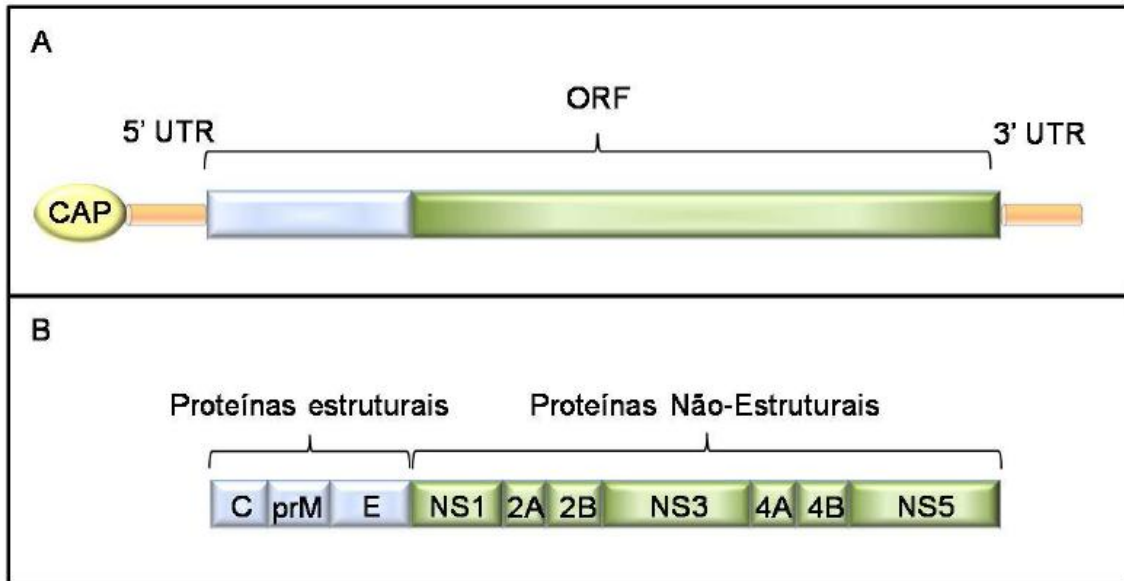


Figura 3: Estrutura genômica do *Dengue virus*: A) Organização do precursor da poliproteína, composto por uma região 5' não codificadora (UTR), que apresenta um "CAP", uma janela aberta de leitura (ORF), uma região terminal não codificadora 3'(UTR). B) As regiões que codificam proteínas estruturais (azul) e proteínas não estruturais (verde). **Fonte: Aleshin et al., 2007 – modificado).**

4.4.2 Ciclo de multiplicação do DENV

A Proteína E medeia a ligação do vírus aos receptores celulares específicos encontrados na superfície das células permissivas do hospedeiro, incluindo células dendríticas, células B, células T, monócitos/hepatócitos, e células neuronais. Alguns dos receptores celulares já identificados são heparan sulfato, CD-14, receptor de laminina de alta afinidade 37/67-kDa, GRP78/BiP e DC-SIGN (Bartenschlager & Miller, 2008).

Após o reconhecimento dos receptores, o DENV penetra na célula através de endocitose mediada por receptor. O ambiente ácido do endossomo promove a trimerização irreversível da proteína E, que resulta na fusão das membranas viral e celular. O nucleocapsídeo é então liberado no citoplasma, ocorrendo em seguida a dissociação do capsídeo e o RNA genômico. Segue-se a tradução e replicação do genoma, e montagem das partículas virais. A tradução do genoma ocorre no retículo endoplasmático rugoso, onde uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos (aa) é produzida. Esta é então clivada por uma combinação de proteases celulares e virais, formando as proteínas estruturais e não estruturais. A

clivagem da proteína prM, que ocorre no complexo de Golgi, finaliza o processo de maturação da partícula viral, que é então liberada por exocitose (**Figura 4**) (Mukhopadhyay et al., 2005).

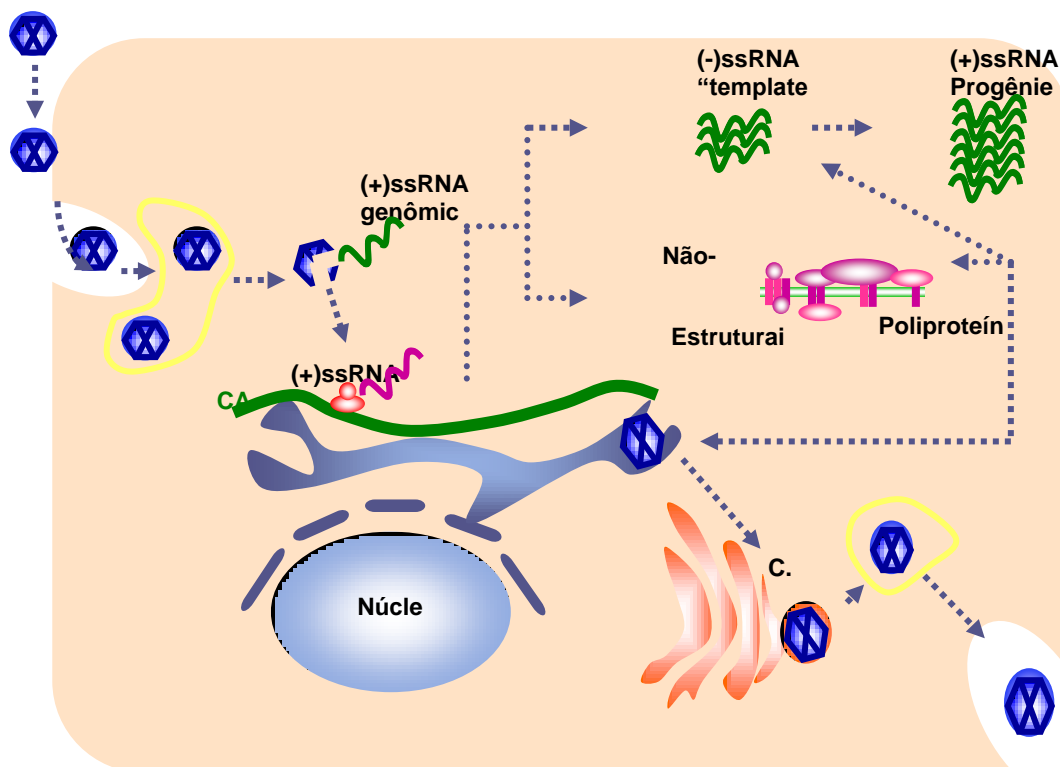


Figura 4: Ciclo de multiplicação do DENV. Fonte: adaptado de Leyssen et al., 2000.

4.4.3 Patogênese Viral

Infecções por DENV normalmente resultam em doença assintomática ou branda ou em doença febril não específica, conhecida como “febre do dengue clássica” (FD), com 5-7 dias de febre, dor de cabeça, dores retro-orbitais e erupções cutâneas. Porém, uma manifestação mais grave, conhecida como febre hemorrágica do dengue (FHD) pode ocorrer, com manifestações hemorrágicas anormais, trombocitopenia, aumento da permeabilidade vascular, e falhas circulatórias, levando a síndrome do choque da dengue (SCD) (Rico-Hesse, 2007). Na FHD ocorre hemorragia petequial difusa em vários órgãos, além de efusão serosa pericardial, pleural e cavidade peritoneal. Microscopicamente, são encontrados

edema perivascular e perda da integridade das junções endoteliais. No fígado, ocorre necrose frequentemente indistinguível das mudanças patológicas causadas pelo YFV. Glóbulos eosinofílicos também são encontrados (Rico-Hesse, 2007).

DENV está entre os flavivírus menos neurovirulentos, apesar de ainda poder estar associado a manifestações neurológicas. FHD pode levar a edemas e hemorragias no cérebro. O DENV pode ser isolado no cérebro, fluido cérebro-espinhal, e produção intratecal de anticorpos sugerem o cruzamento da barreira cerebral-sanguínea. Outros locais como medula óssea, rins, linfonodos e pulmão também podem ser infectados (Gubler et al., 1998).

A primeira infecção por um determinado sorotipo de DENV gera uma proteção por toda a vida do indivíduo. Porém, anticorpos produzidos contra um sorotipo do DENV não geram a proteção contra outros sorotipos no caso de re-infecção. Além disso, acredita-se que anticorpos heterólogos potencializam os sintomas da doença, aumentando as chances de desenvolvimento da FHD (Hilde et al., 2009). Esta hipótese foi baseada em indícios na Tailândia, nos anos 60. Em 85% das crianças observadas com FHD, foram encontrados altos títulos de anticorpos com reatividade cruzada entre os sorotipos, indicando infecção prévia (Halstead, 2007).

As infecções por DENV têm como alvo primário células dendríticas. Porém, outras células como macrófagos, monócitos e células endoteliais também podem ser infectadas pelo DENV. Macrófagos e monócitos infectados pelo DENV podem ser detectados em órgãos linfóides, pulmão e fígado (Halstead, 2007; Chen et al., 2007). As células da linhagem monocítica/macrofágica podem agir como apresentadoras de antígeno e secretar citocinas que participam da ativação das células T e produção de citocinas ativadoras de macrófagos. No caso de uma segunda infecção, essas células produzem e segregam mediadores vasoativos aumentando a permeabilidade vascular que conduz a hipovolemia e choque. Altos níveis de citocinas e outros marcadores de células T ativadas, como TNF α , IFN γ , receptores solúveis TNF's e IL-2, células CD4 e IL-6, sustentam o papel das citocinas no aumento da permeabilidade capilar (Braga et al., 2001).

Nem todas as infecções secundárias levam a FHD/SCD, e estas síndromes podem ocorrer em uma infecção primária (Mcbride & Bielefeldt-ohmann, 2000). Desta forma,

uma segunda hipótese dá maior importância a fatores do vírus para o desenvolvimento dos sintomas mais graves. Esta hipótese sugere que fatores genéticos que determinam a existência de amostras mais virulentas dentro do mesmo sorotipo. A primeira epidemia de FHD em Cuba, em 1981, coincidiu com a introdução de um novo genótipo do DENV-2, vindo do sudeste Asiático. Ensaios de competição em células dendríticas humanas e células de mosquitos mostraram que o genótipo asiático do DENV-2 tem maior taxa de multiplicação e pode sobrepor o genótipo americano na população. A variação e mudanças genéticas, como resultado de pressões seletivas, levam à expressão de fenótipos de maior virulência aumentando a gravidade da doença e o potencial epidêmico (Cologna et al., 2005; Solomon & Mallewa, 2001).

Taxas de mortalidade variam de 1 a 10%, com aumento em pacientes com sintomas hemorrágicos. Altas taxas de mortalidade são observadas também em regiões com falta de experiência clínica no gerenciamento de hemorragias vasculares sistêmicas (Rico-Hesse, 2007).

4.4.4 Ciclos de Transmissão

O DENV circula no meio ambiente utilizando um vetor artrópode e um hospedeiro mamífero. O DENV circula em três possíveis ciclos, silvestre, urbano, rural. O ciclo silvestre ocorre na África e em florestas chuvosas da Ásia, onde o DENV utiliza o mosquito *Aedes spp* como vetores e primatas não humanos como hospedeiros. O ciclo urbano é reconhecido nas regiões tropicais de todos os continentes, exceto Europa. Neste ciclo o DENV utiliza o mosquito *Aedes aegypti* como vetor e o homem como hospedeiro. No ciclo rural o DENV utiliza os mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e possivelmente o *Aedes mediovittatus* como vetores e o homem como hospedeiro (**Figura 5**) (Cardosa et al., 2009; Gubler, 1998).

Pesquisas sobre ciclo silvestre do DENV no continente americano ainda são discretas, com poucos dados disponíveis. Mas, recentes achados sorológicos e moleculares demonstram a possibilidade deste ciclo existir também no continente americano. Se confirmado levaria a uma mudança de perspectiva na epidemiologia

do DENV. Além disso, a detecção de DENV em animais silvestres em áreas endêmicas, apontam para a possibilidade de estes animais participarem do ciclo do DENV não só como hospedeiros ocasionais, mas sim como reservatórios naturais em períodos inter-epidêmicos (Thoisy et al., 2004).

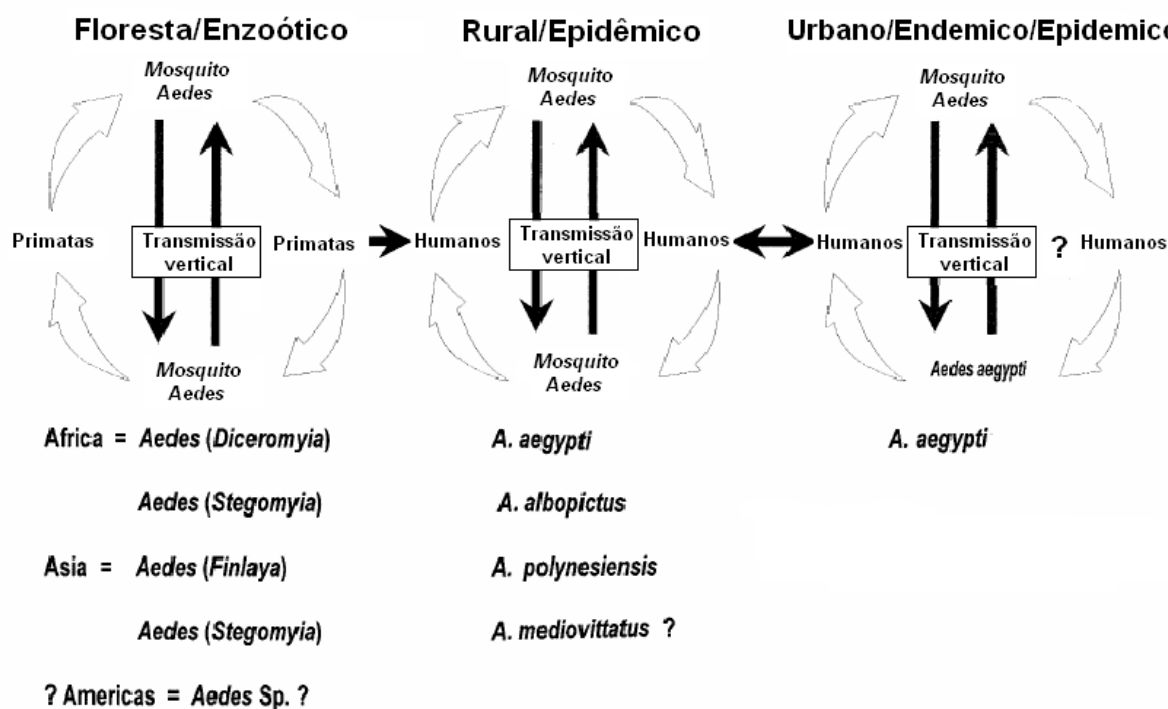


Figura 5 – Ciclos de transmissão do DENV. Fonte: Adaptado de Gubler, 1998.

4.4.5 Epidemiologia

Desde 1999, a dengue tem sido incluída em programas de pesquisa e treinamento no controle de doenças tropicais, e pesquisas sobre vacinas vêm sendo desenvolvidas por várias instituições em todo o mundo. Pesquisas são direcionadas para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente, uma vez que estudos epidemiológicos mostram que anticorpos preexistentes contra um determinado sorotipo é fator de risco para a DHF (Gubler, 1998).

Atualmente, o DENV possui uma distribuição global (**Figura 6**), com concentrações nas regiões tropicais do sul e sudeste da Ásia, África e muitos países da América do Sul e Central. Como resultado das principais mudanças demográficas, rápida e massiva urbanização, viagens globais e mudanças ambientais o mundo, particularmente nas regiões tropicais, enfrenta grandes desafios no que se refere às

doenças infecciosas emergentes (Rico-Hesse, 2007).

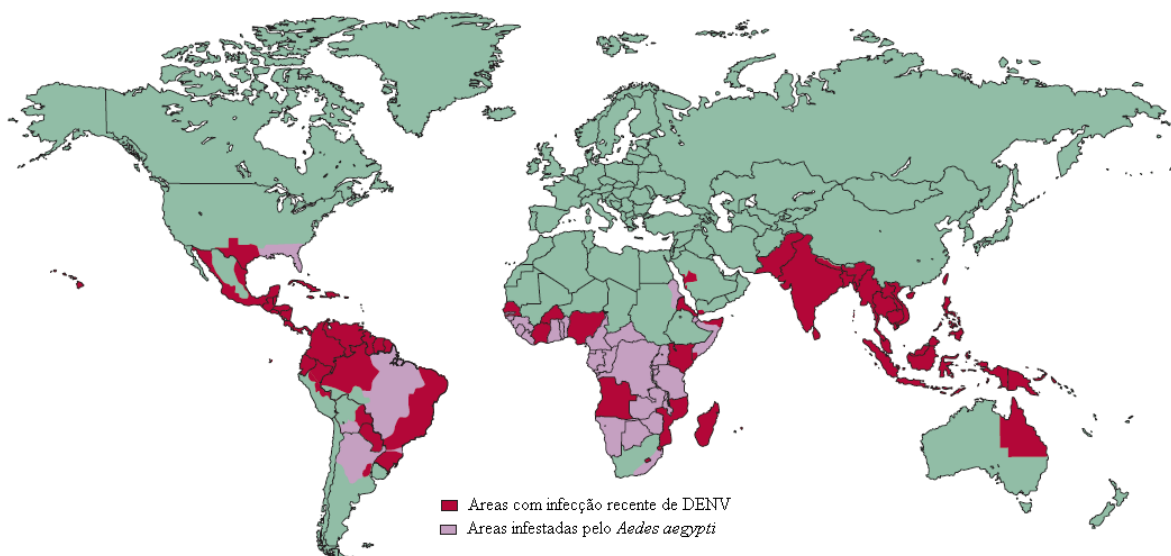


Figura 6 – Distribuição geográfica do DENV. Fonte Adaptado de Halstead, 2007.

A OMS declarou em 2005 que a dengue consistia no principal exemplo de doença emergente de grande importância para a saúde pública. Isto devido ao número crescente dos casos notificados em diferentes países (**Figura 7**) e o aumento global da distribuição da doença.

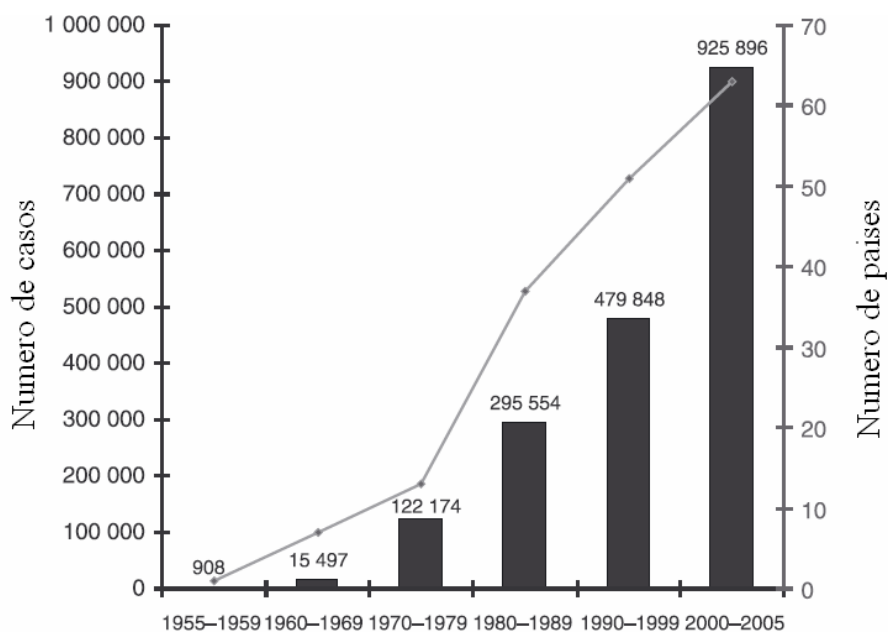


Figura 7 – Média anual e países com notificações de dengue. Média do número de casos de DF e DHF notificados para a OMS e de países com casos de dengue. Fonte: Ferrar et al., 2007.

No Brasil, as infecções pelo DENV aumentaram na última década, particularmente após 1994, como resultado da disseminação do *Aedes aegypti*. A dispersão vetorial foi seguida da introdução do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 na maioria das cidades brasileiras. Epidemias de FHD foram observadas em vários estados como Amazonas, Minas Gerais, e Rio de Janeiro. Atualmente co-circulam no Brasil os quatro sorotipos de DENV. Recentes amostras de DENV-4 foram identificadas no Estado do Amazonas reafirmando, juntamente com amostras de DENV-4 isoladas no estado de Roraima em 1982, de que este sorotipo também circula em território brasileiro (Figueiredo et al., 2008).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou, no período de janeiro a março de 2008, 120.413 casos de dengue clássica, 647 casos de FHD e a ocorrência de 48 óbitos. Ao comparar com o ano de 2006, foi observado um aumento de 136.488 casos de dengue no país, sendo o mês de março aquele com o maior número de notificações no período, correspondendo a 102.011 casos. É importante destacar que este aumento no número absoluto de casos está relacionado à ocorrência de epidemias com altas taxas de incidência em alguns Estados. Neste caso, destaca-se o ocorrido nos Estados: Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio de Janeiro que notificaram um excedente de 59.370, 39.391 e 18.181 casos, respectivamente (SVS/MS, 2009).

No ano de 2009 a Secretaria do estado de Minas Gerais recebeu 81.989 notificações de casos de dengue, número este superado em 2010 nos primeiros três meses do ano, com 86.189 casos notificados da doença. O número de casos de FHD notificados em 2008 foi muito superior aos seis anos anteriores, com um número de óbitos também elevado, apesar da baixa taxa de letalidade observada (**Tabela 1**) (SEMG, 2010).

Tabela 1: Casos notificados, confirmados e óbitos por Febre Hemorrágica do Dengue 2004-2010

| ANO | Casos Confirmados | Óbitos confirmados ⁽¹⁾ | Taxa de Letalidade (%) |
|------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| 2004 | 19 | 2 | 10,5 |
| 2005 | 17 | - | - |
| 2006 | 15 | 3 | 20,0 |
| 2007 | 13 | 4 | 30,8 |
| 2008 | 46 | 6 | 13,0 |
| 2009 | 104 | 11 | 10,6 |
| 2010 | 31 | 6 | 19,4 |

Fonte: SINAN e GVA/SE/SUBVS/SES- MG

4.4.6 Amostras Silvestres do DENV

Amostras silvestres do DENV são ancestrais das amostras circulantes em ciclos urbanos, que divergiram a milhares de anos atrás. Porém, pouco se sabe sobre os processos evolucionários que caracterizam o DENV silvestre. De fato, entender a extensão e estrutura da diversidade genética do DENV silvestre são fundamentais para compreender como estes vírus cruzam a barreira entre espécies e emergem na população humana (Vasilakis et al., 2006).

Amostras silvestres de DENV ainda circulam entre primatas não humanos na África e na Malásia (Cardosa et al., 2009; Wang et al., 2000), porém, nunca foram associadas a epidemias em humanos, apesar de haver relatos de caso de FHD em paciente na Malásia e na Nigéria envolvendo amostras de DENV-2 silvestre (Cardosa et al., 2009; Vasilakis et al., 2008).

Amostras silvestres do DENV foram isoladas apenas na África (DENV-2) e na Ásia (DENV-1, DENV-2 e DENV-4). DENV-3 nunca foi isolado na África, porém, acredita-se que ele esteja presente na Malásia devido à soroconversão de macacos sentinelas (Vasilakis et al., 2008). Recentes evidências sugerem que a emergência do DENV-2 endêmico, proveniente de amostras silvestres, não requer adaptação para se replicar eficientemente em humanos, mostrando que o potencial de re-emergência do DENV-2 silvestre é alto. As manifestações clínicas causadas por amostras silvestre de DENV são indistinguíveis daquelas causadas por amostras

endêmicas (Vasilakis et al., 2007).

Recentes estudos mostram que espécies silvestres de mosquitos do gênero *Aedes sp*, que habitam galerias de florestas próximas a vilarejos na África, são capazes de se infectar com amostras silvestres de DENV. Estes vetores podem agir como pontes entre o habitat silvestre e peridoméstico. A capacidade dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de transmitir o DENV silvestre sem necessidade de adaptação do vírus ao vetor sugere uma transferência regular entre a floresta e habitat humano (Vasilakis et al., 2008).

4.4.7 Possível Reservatório do DENV

Embora muitas doenças humanas emergentes sejam mantidas em hospedeiros reservatórios, estes reservatórios raramente são identificados (Haydon et al., 2002). As amostras silvestres do DENV são mantidas em ciclos enzoóticos envolvendo mosquitos *Aedes sp* e primatas não humanos como hospedeiros. Porém, pouco se sabe sobre a manutenção de amostras endêmicas ou epidêmicas na natureza em períodos inter-epidêmicos. Alguns autores sugerem uma transmissão vertical direta ou horizontal, onde os ovos contaminados manteriam o vírus e o passaria para as gerações seguintes. Outros sugerem uma transmissão assintomática entre períodos epidêmicos, devido ao baixo número de vetores, levando a uma transmissão silenciosa. Outra possibilidade, porém mais remota, seria a sobrevivência da população de mosquitos infectados, os quais introduziriam o vírus novamente na próxima estação (Jennifer & Eva, 2008; Silva et al., 1999).

Vários arbovírus utilizam um reservatório não-humano para sua manutenção (Silva et al., 1999). É reconhecido um ciclo silvestre de DENV, com a existência de reservatórios mamíferos não humanos, na Ásia e na África juntamente com um ciclo humano. No entanto, na América não se reconhecia a existência de um ciclo silvestre de DENV, com a participação de reservatórios não-humanos, até surgimento de estudos sorológicos em florestas americanas revelando resultados divergentes a respeito de um possível ciclo silvestre de DENV na América (Scott, 2001; Roberts et al., 1984; Valero et al., 2004).

de Thoisy e colaboradores (2009) detectaram, em soros de animais capturados durante vários períodos entre 2001 e 2007 na Guiana Francesa, RNAs virais dos quatro sorotipos de DENV em 92 mamíferos pertencentes as ordens *Rodentia* (33 positivos/146 testados), *Marsupialia* (40/318) e *Chiroptera* (19/152). Estes animais foram capturados tanto em áreas peridomésticas como em florestas, onde o contato com o homem é limitado, o que sugere uma ampla distribuição dessas amostras virais. Neste trabalho foi mostrado uma grande similaridade das amostras isoladas com outras isoladas de humanos no mesmo período na mesma região (99,2%), e com amostras isoladas em diferentes países da Ásia e América do Sul (94,6 -100%), incluindo amostras brasileiras. **de Thoisy e colaboradores (2004)** relatam anteriormente a identificação de anticorpos neutralizantes para YFV, DENV e SLEV (pertencentes ao gênero *Flavivirus*) em vários animais capturados durante um resgate de fauna no mesmo país durante o período de 1994-95.

Anticorpos neutralizantes detectados em soros de morcegos capturados em áreas endêmicas da Costa Rica (12 positivos/53 testados), Equador (3/10), México (9/70) representam um importante dado ecológico e epidemiológico, e reforçam a idéia da existência de um reservatório natural do DENV em ambientes urbanos na América do Sul (Aguilar-Setién et al., 2008; Platt et al., 2000).

Zhang e colaboradores (1998) detectaram o genoma de DENV em 20 de 35 (57%) amostras de cérebro de morcegos que viviam em área endêmica na China. Dentre as amostras positivas para RNA viral, 16 de 20 (80%) apresentavam IgG no soro. Estudo similar em morcegos e mosquitos em áreas não endêmicas revelou resultado negativo.

Estudos têm demonstrado que morcegos possuem um importante papel como hospedeiros reservatórios de vários vírus que cruzam barreiras entre espécies infectando o homem e outros mamíferos. Vírus de diversas famílias já foram isolados de morcegos, inclusive da família *Flaviviridae*. Contudo, esforços para a elucidação do papel epidemiológico dos morcegos como um reservatório do vírus rábico são mais freqüentes (Calisher et al., 2006).

A origem da ordem *Chiroptera* data de 52 -50 milhões de anos. Isto faz dos

morcegos um dos primeiros mamíferos a se desenvolverem, e desde então sofreram poucas modificações. Um longo período de co-especiação pode ter levado a aquisição de respostas imunológica inata e adquirida em morcegos de forma a controlar a infecção, e a utilização viral de vias bioquímicas e receptores celulares conservados entre mamíferos, para estabelecer uma infecção persistente. Este fato poderia aumentar a capacidade de transmissão de vírus associado a morcegos para outros mamíferos (Calisher et al., 2006).

A grande diversidade, modo de vida e ampla distribuição geográfica de morcegos são fatores importantes para sua capacidade de albergar uma grande variedade de vírus. Na França, infecções com o vírus da raiva têm sido associadas à migração de morcegos em certas regiões. Este comportamento pode favorecer a dispersão de vírus entre populações garantir uma manutenção eficiente do vírus na natureza. Uma vez que morcegos possuem uma associação com diversos vírus, estes representam um possível alvo no estudo sobre a importância epidemiológica de animais silvestres no ciclo de transmissão do DENV na América (Calisher et al., 2006).

5. RESULTADOS

Sequências de nucleotídeo e aminoácidos obtidas no Genbank, referentes a junção gênica C-prM (419 pb), das amostras **C0558–Morcego**, **BH-4/FD**, **BH-9/FHD**, **BR/97-233**, **BR/01-MR** e **BR/97-111**, foram submetidas a teste de similaridade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa), e foi verificado uma baixa similaridade de nucleotídeo (92,6-93,6%) e aminoácidos (95-95,7%) entre a amostra C0558-Morcego e as demais amostras analisadas (**Tabela 3**). Entre as amostras BH-4/FD, BH-9/FHD, BR/97-233, BR/01-MR e BR/97-111. **de Thoisy e colaboradores em 2009** identificaram uma similaridade de 97,3% de nt entre a amostra CO558-Morcego e a amostra DENV-1 Mochizuki, detectada em humanos no Japão em 1943, e uma baixa similaridade com amostras de DENV-1 endêmicas em humanos na mesma região no mesmo período (92,6%).

Tabela 3: - Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as amostras de DENV-1 isolada de morcego com isolados de pacientes do Estado de Minas Gerais e outras amostras brasileiras.

| Amostras | C0558 Morcego | BH-4 (FD) | BH-9 FHD | BR/97-233 | BR/01 MR | BR/97 111 |
|------------------------|------------------|-----------|----------|-----------|-------------|--------------|
| CO558 - Morcego | | 95,7% | 95% | 95,7% | 95% | 95,7% |
| BH-4 (FD) | 92,8% | | 99,3% | 100% | 99,3% | 100% |
| BH-9 FHD | 93,6% | 97,9% | | 99,3% | 99,3% | 99,3% |
| BR/97-233 | 92,8% | 99% | 98,3% | | 99,3% | 100% |
| BR/01-MR | 92,6% | 98,8% | 98,3% | 99,3% | | 99,3% |
| BR/97-111 | 92,6% | 98,8% | 98,1% | 99,8% | 99% | |

Os valores azuis representam as porcentagens de similaridade de aminoácidos. Os valores vermelhos representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos.

A árvore filogenética (**figura 8**) construída a partir das sequências de nucleotídeos, utilizando amostras de DENV-1 de diferentes genótipos, isoladas de diferentes localidades, revelou que a amostra de DENV-1 isolada de morcego (**C0558–Morcego**) não se agrupa com as amostras DENV-1 brasileiras isoladas de humanos, tão pouco com amostras asiáticas e outras regiões da América do Sul.

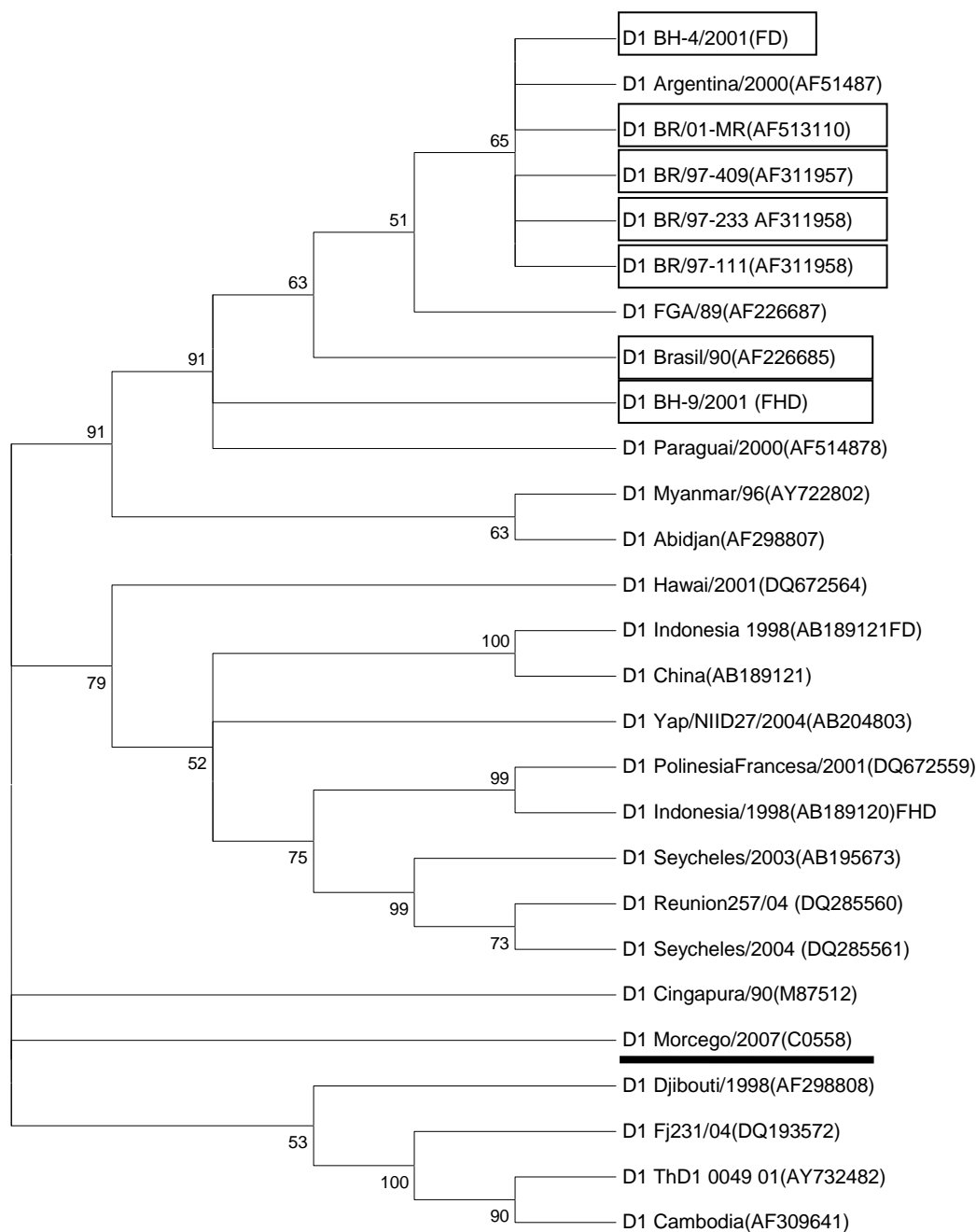


Figura 8: Análise filogenética de amostras de DENV-1. Árvore construída a partir da análise da seqüência parcial de nucleotídeos da região gênica C/prM (419 pb) de amostras isoladas de animais silvestres, amostras brasileiras e amostras endêmicas da America do Sul e Ásia pertencentes ao sorotipo 1. A filogenia foi estabelecida pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura–Nei implementado no programa MEGA4.1. As amostras humanas brasileiras de D1 estão destacadas em caixa; a amostra de D1 isolada de morcego esta sublinhada.

Nos estudos filogenéticos das amostras de DENV-2, as amostras brasileiras isoladas de pacientes, no estado do Piauí, foram incluídas com o objetivo de compará-las às amostras isoladas de animais silvestres, a fim de estabelecer uma relação filogenética entre estas amostras, que sustentem a hipótese da existência de hospedeiros-reservatórios não humanos, uma vez que há indícios da existência de

um ciclo silvestre de DENV na Guiana Francesa.

No teste de similaridade de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) para as amostras de DENV-2 **B1015-Marsupial**, **B1010-Marsupial**, **B1004-Marsupial**, **B1032-Marsupial**, **PI-55/2006**, **PI-58/2006**, **PI-111/2006**, **Brasil/2002** (Tabela 4) foi averiguada uma similaridade de 98,7% de nt e 96,9% de aa entre as amostras B1015-Marsupial e B1032-Marsupial. As amostras B1010-Marsupial e B1004-Marsupial apresentaram uma similaridade de 99,5% de nt e 100% entre si. Porém, quando comparada as amostras B1015-Marsupial e B1032-Marsupial com as amostras B1010-Marsupial e B1004-Marsupial foram observadas baixas taxas de similaridade de nt (88,2-89,5%) e aa (91,5-89,2%).

As amostras B1015-Marsupial e B1032-Marsupial apresentaram baixas taxas de similaridade de nt (87,7-89%) e aa (89,2-92,3%) com as amostras brasileiras PI-55/2006, PI-58/2006, PI-111/2006, Brasil/2002. Já as amostras B1010-Marsupial, B1004-Marsupial apresentaram similaridades entre 96,2-100% de nt e 99,2-100% de aa com as amostras brasileiras PI-55/2006, PI-58/2006, PI-111/2006, Brasil/2002.

Tabela 4: Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as amostras de DENV-2 isoladas de marsupiais na Guiana Francesa com amostras brasileiras isoladas no Estado do Piauí, e uma amostra brasileira de referencia isolada em 2002.

| Amostras | B1015 Marsupial | B1010 Marsupial | B1004 Marsupial | B1032 Marsupial | PI-55 2006 | PI-58 2006 | PI-111 2006 | Brasil 2002 |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| B1015-Marsupial | | 91,5% | 91,5% | 96,9% | 91,5% | 91,5% | 92,3% | 92,3% |
| B1010-Marsupial | 89,5% | | 100% | 89,5% | 100% | 100% | 99,2% | 99,2% |
| B1004-Marsupial | 89,5% | 99,5% | | 89,2% | 100% | 100% | 99,2% | 99,2% |
| B1032-Marsupial | 98,7% | 88,2% | 88,2% | | 89,2% | 89,2% | 90% | 90% |
| PI-55/2006 | 89,5% | 100% | 99,5% | 88,2% | | 100% | 99,2% | 99,2% |
| PI-58/2006 | 89% | 97,7% | 97,2% | 87,7% | 97,7% | | 98,5% | 98,5% |
| PI-111/2006 | 89,7% | 96,7% | 96,2% | 89% | 96,7% | 95,9% | | 100% |
| Brasil/2002 | 89,7% | 97,2% | 96,7% | 89% | 97,2% | 96,4% | 99% | |

Os valores azuis representam as porcentagens de similaridade de aminoácidos. Os valores vermelhos representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos.

Uma árvore filogenética foi construída, baseada na seqüência de nucleotídeos da região de junção dos genes C-prM de 390pb, utilizando amostras de DENV-2 de diferentes genótipos, isoladas de diferentes localidades, para analisar os agrupamentos filogenéticos entre essas amostras (**Figura 9**).

Neste estudo foram incluídas amostras de DENV-2 isoladas de animais silvestres na Guiana Francesa, amostras brasileiras detectadas em soro de pacientes nos Estados do Piauí e do Rio de Janeiro e amostras provenientes de varias regiões da América e Ásia. As amostras B1010-Marsupial e B1004-Marsupial se agrupam com as amostras humanas brasileiras PI-55/2006, PI-58/2006, PI-59/2006, PI- 62/2006, PI-82/2006, PI-92/2006, PI-100/2006, corroborando com os resultados obtidos no teste de similaridade de nt e aa. Já as amostras **B1032-Marsupial e B1015-Marsupial** se agruparam no mesmo clado juntamente com as amostras **D2 Peru, 1995 FD e D2 Venezuela/87**.

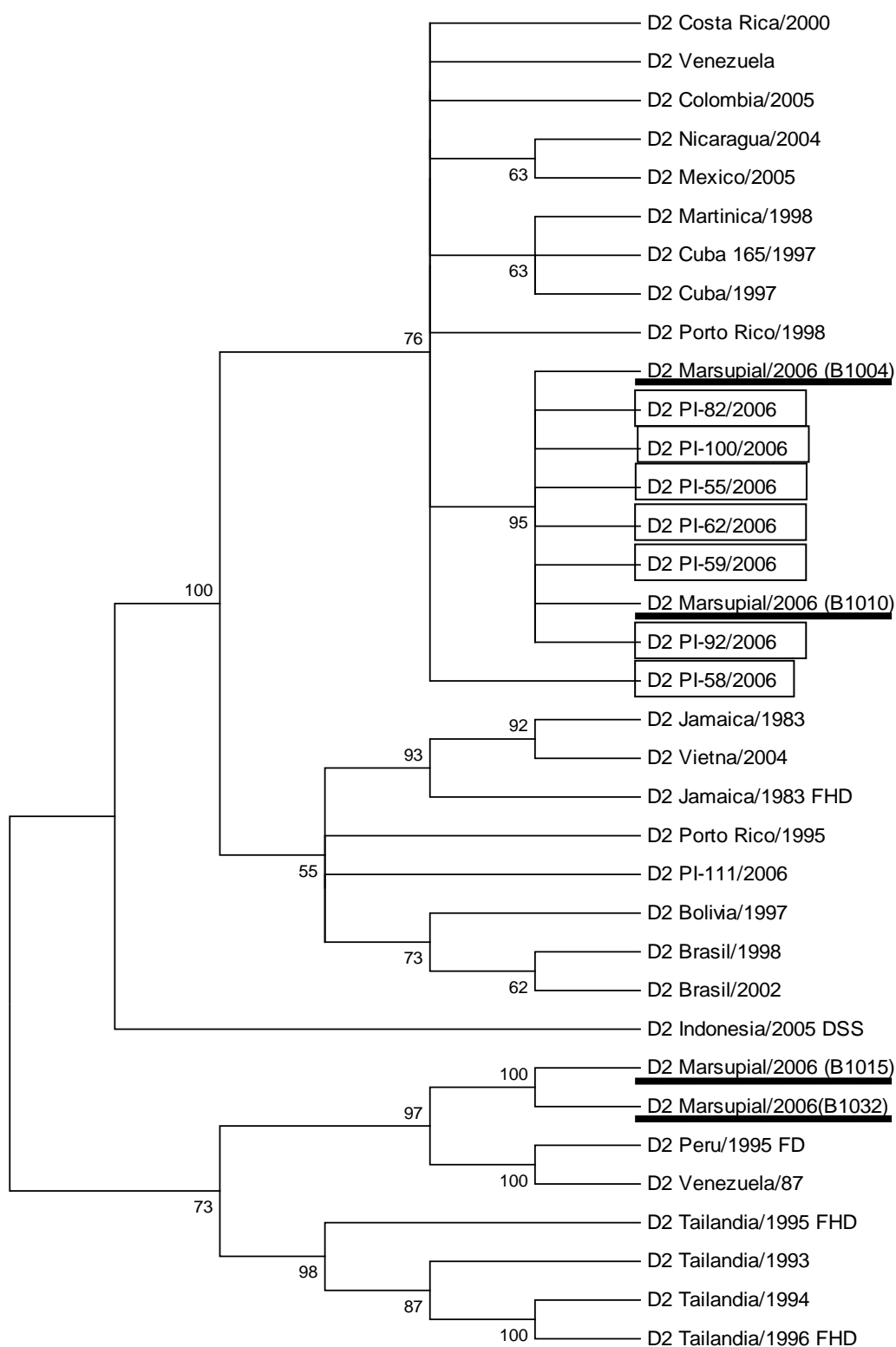


Figura 9: Análise filogenética de amostras de DENV-2. Árvore construída a partir da análise da seqüência parcial de nucleotídeos da região gênica C/prM (390 pb) de amostras isoladas de animais silvestres, amostras brasileiras e amostras endêmicas da America do Sul e Ásia pertencentes ao sorotipo 2. A filogenia foi estabelecida pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura–Nei implementado no programa MEGA4.1. As amostras humanas brasileiras de D2 estão destacadas em caixa; as amostra de D2 isolada de animais silvestres na Guiana Francesa estão sublinhada.

As seqüências de DENV-3 da Guiana Francesa foram comparadas com seqüências virais, detectadas em Minas Gerais e do Piauí, relacionado com quadro de FD e FHD e também com amostras de mosquitos. Como pode ser observado na Tabela 9, os vírus **B1018-Marsupial**, **B1106-Roedor** e **C1034-Marsupial**, apresentaram similaridades entre 99,1-99,7% de nt e 99-100% de aa com as amostras **Mosquito fêmea -14** e **Mosquito macho BH-1**; os mesmos valores de similaridade (99,1-99,7% de nt e 99-100% de aa) foram encontrados entre as amostras Marsupial/2007, Roedor/2006 e Marsupial/2006 e as amostras **MG20/2004FHD**, **MG27/FD-2002** e **BH19/2003**. As amostras **Marsupial/2006** e **Marsupial/2007** foram idênticas (Tabela 5).

de Thoisy e colaboradores (2009) observaram uma identidade nucleotídica entre 99,7% e 100% de entre as amostras Marsupial/2007, Roedor/2006 e Marsupial/2006 e isolados das Filipinas, e que amostras humanas isoladas na Guiana Francesa, pertencentes ao genotipo III, apresentaram apenas 95% de similaridade de nt com as amostras Marsupial/2007, Roedor/2006 e Marsupial/2006.

Tabela 5: Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos entre as amostras de DENV-3 isoladas de animais silvestres na Guiana Francesa com amostras brasileiras, relacionadas a diferentes manifestações da doença, isoladas no estado de Minas Gerais.

| Amostras | C1034 Marsupial | B1106 Roedor | B1018 Marsupial | Mosquito Fêmea- 14 | Mosquito Macho BH-1 | MG20/ FHD 2004 | MG27/FD 2002 | BH19/ 2003 |
|--------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------|---------------|
| C1034 Marsupial | | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99,4% |
| B1106 Roedor | 99,7% | | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 9,4% |
| B1018 Marsupial | 100% | 99,7% | | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% |
| Mosquito fêmea -14 | 99,7% | 99,4% | 99,7% | | 99% | 100% | 99% | 100% |
| Mosquito Macho BH-1 | 99,4% | 99,1% | 99,4% | 99,7% | | 99% | 98,1% | 99% |
| MG20/2004FHD | 99,7% | 99,4% | 99,7% | 100% | 99,7% | | 99% | 100% |
| MG27/FD 2002 | 99,4% | 99,1% | 99,4% | 99,7% | 99,4% | 99,7% | | 99% |
| BH19/2003 | 99,7% | 99,4% | 99,7% | 100% | 99,7% | 100% | 99,7% | |

Os valores azuis representam as porcentagens de similaridade de aminoácidos. Os valores vermelhos representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos.

Uma árvore filogenética foi construída, baseada na seqüência de nucleotídeos da região de junção dos genes C-prM de 316pb, utilizando amostras de DENV-3 de diferentes genótipos, isoladas de diferentes localidades, para analisar os agrupamentos filogenéticos entre essas amostras (**Figura 10**).

Neste estudo foram incluídas amostras de DENV-3 isoladas de animais silvestres na Guiana Francesa, amostras brasileiras detectadas em soro de pacientes nos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, amostras detectadas em mosquitos em Belo Horizonte e amostras provenientes de varias regiões da América e Ásia. As amostras isoladas a partir de soros humanos e coletadas de mosquitos foram incluídas neste estudo devido a importância epidemiológica que estas amostras representam para o Brasil, as demais amostras analisadas representam amostras de referencia em estudos de filogenia do DENV.

Na **Figura 10** pode ser verificado que as amostras de DENV-3 isoladas de animais silvestres, mosquitos coletados em campo e soro de pacientes envolvidos em diferentes manifestações da doença, agruparam no mesmo grupo juntamente com as amostras pertencentes ao genótipo V (**de Thoisy et al., 2009**). Este genótipo é formado por isolados do Sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico. **Figueiredo e colaboradores (2008)** agruparam este mesmo genótipo como I, as diferenças nas classificações é apenas uma questão de nomenclatura e abordagem adotadas pelos autores.

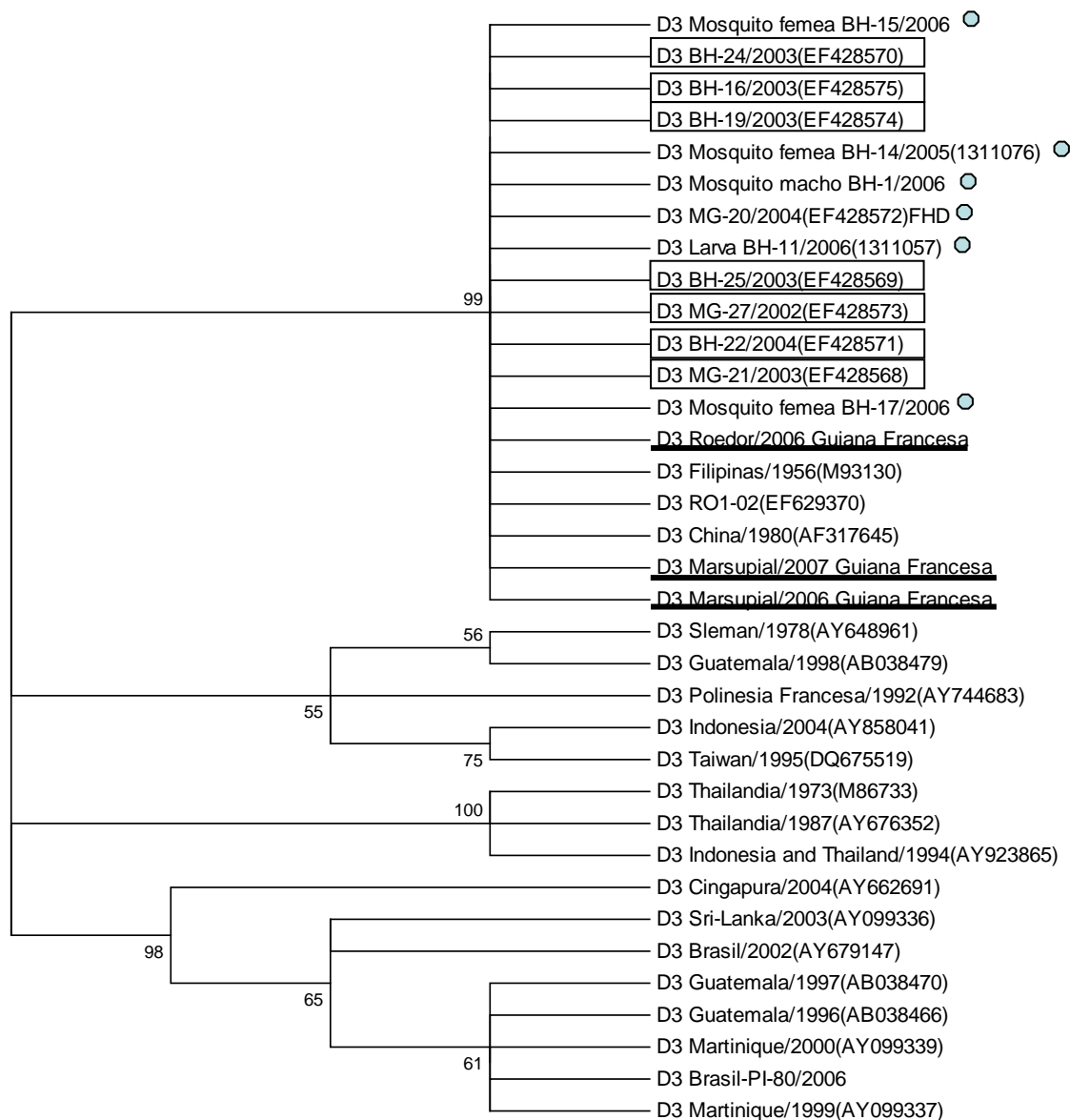


Figura 10: Análise filogenética de amostras de DENV-3. Árvore foi construída a partir da análise da seqüência parcial de nucleotídeos da região gênica C/prM (316 pb) de amostras isoladas de animais silvestres (sublinhadas), amostras brasileiras relacionadas a diferentes manifestações da doença (destacada em caixa) e mosquitos (marcador ●) coletados no campo, e amostras endêmicas da America do Sul e Ásia pertencentes ao sorotipo 3. A filogenia foi estabelecida pelo método de “Neighbor joining” utilizando o modelo de substituições de nt de Tamura–Nei implementado no programa MEGA4.1.

6. DISCUSSÃO

A baixa similaridade entre a amostra de DENV-1 **C0558–Morcego** com as amostras humanas **BH-4/FD, BH-9/FHD, BR/97-233, BR/01-MR e BR/97-111**), Mochizuki, detectada em humanos no Japão em 1943, e amostras de DENV-1 endêmicas em humanos na mesma região no mesmo período, aliada ao fato de esta espécie de morcego fazer parte da fauna neotropical, e possivelmente migrar entre regiões em busca de alimentos (Passos et.al, 2003), sugerem que esta amostra viral esteja circulando nesta região em ciclo silvestre, mas para tal afirmação, estudos mais aprofundados sobre a prevalência desta amostra em animais silvestres seriam necessários.

Com as análises das amostras de DENV-2, é possível sugerir duas situações; a primeira de que as amostras de DENV-2 **B1010-Marsupial e B1004-Marsupial**, isoladas de animais silvestres, estas relacionadas a amostras brasileiras e a amostras da Guiana Francesa (similaridade entre 98,2-99,2% de nt) analisadas por **de Thoisy e colaboradores em 2009**, possam estar associadas a possíveis hospedeiros-reservatórios não humanos; e segundo, de que as amostras de DENV-2 **B1032-Marsupial e B1015-Marsupial**, isoladas de animais silvestres, que apresentaram baixa similaridade com amostras brasileiras e com outras amostras humanas analisadas por **de Thoisy e colaboradores em 2009**, possam estar relacionadas a um ciclo silvestre na região. A similaridade de 96,7-97,2% de nt e 99,2% de aa entre as amostras **Marsupial B1010 e B1004** isoladas em 2006 e a amostra de DENV-2 **Brasil/2002** sugere fortemente que este vírus possa ter utilizado a fauna silvestre como meio de se manter na natureza. Porém, estudos adicionais precisam ser conduzidos para que se possa caracterizar a manutenção do DENV através de um reservatório mamífero não humano, e não uma infecção ocasional da fauna silvestre.

A grande similaridade entre amostras de DENV-3 **B1018-Marsupial, B1106-Roedor e C1034-Marsupial** e as amostras brasileiras analisadas sugere uma possível circulação viral na região em hospedeiros-reservatórios silvestres durante períodos inter-epidemicos. Um forte indicio para isso é também a grande similaridade destas

amostras isoladas de animais silvestres com amostras isoladas de mosquitos (99,1-99,7% de nt e 99-100% de aa). As amostras **B1018-Marsupial** e **C1034-Marsupial** foram idênticas, sugerindo o envolvimento destes animais na circulação desta amostra, uma vez que estas foram coletadas em períodos distintos.

7. CONCLUSÃO

Por ser a Guiana Francesa um país fronteiriço com o Brasil, a grande proximidade entre amostras coletadas de animais silvestres, amostras coletadas de mosquito em campo e amostras coletadas de humanos representa uma preocupação, no ponto de vista da saúde pública, que nos leva a pensar no real papel destes animais na ecologia do DENV.

Os dados aqui apresentados não respondem a todas as perguntas acerca do possível ciclo silvestre do DENV na América, tão pouco a participação destes animais como reservatórios, mas fornece indícios que necessitam serem elucidados. Para isso novas pesquisas devem ser conduzidas no intuito de se conhecer melhor o ciclo de multiplicação do DENV nos diversos ambientes, para que possamos traçar a melhor estratégia epidemiológica contra ele.

As amostras de DENV isoladas de animais silvestres na Guiana Francesa representam um avanço para o estudo da biologia do vírus, bem como do seu processo de interação vírus-hospedeiro. A possibilidade de se caracterizar estes animais como hospedeiros reservatórios possui impacto direto na epidemiologia da Dengue.

Contudo, o avanço das pesquisas sobre a prevalência do DENV em mamíferos não-humanos deve ocorrer para que se conheça exatamente como este vírus, que ao longo do ano causa epidemias em humanos, sobrevive e se perpetua na natureza, afim de que possamos combatê-lo de forma mais eficiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESHIN, A.E; SHIRYAEV, S.A; STRONGIN, A.Y; LIDDINGTON, R.C. **Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold.** Protein Sci. v. 16, p. 795-806, 2007.

ARNOLD, J.L; LYNN W.E. **History of Virology.** Fields Virology, 5th Edition. v. 1, Sessão 1, p 3-20. 2007.

BRAGA, E.L; MOURA, P; et al. **Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 96, p.229-32. 2001.

CARDOSA, J; OOI, M.H; TIO, P.H; PERERA, D; HOLMES, E.C; BIBI, K; MANAP, Z.A. **Dengue Virus Serotype 2 from a Sylvatic Lineage Isolated from a Patient with Dengue Hemorrhagic Fever.** Open access freely available online. v. 3, nº4. e423. 2009.

CATHERINE, L.MURRAY; CHRISTOPHER, T.JONES; CHARLES, M.R. **Architects of assembly: roles of *Flaviviridae* non-structural proteins in virion morphogenesis.** Nature Reviews. v. 6, p. 699-708. 2008.

CHEN, H; HOFMAN, F.M; et al. **Both Virus and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Critical for Endothelium Damage in a Mouse Model of Dengue Virus-Induced Hemorrhage.** Journal of Virology. v.81, n.11, p. 5518–5526. 2007.

CHAMBERS, T.J; HAHN, C.S; GALLER, R; RICE, C.M. **Flavivirus genome: organization, expression and replication.** Annu Rev Microbiol. v. 44, p. 649-688. 1990,

CHARLES H. CALISHER; JAMES E. CHILDS; HUME E. FIELD; KATHRYN V. HOLMES; TONY SCHOUNTZ. **Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging**

Viruses. Clinical Microbiology Reviews, v.19, n. 03, p. 531–545. 2006.

CLARENCE, J.P. **Emerging Viral Diseases.** Fields Virology, 5th Edition. V. 1, Cap.18, p. 605-622, 2007.

COLOGNA, R., P. M. ARMSTRONG, et al. **Selection for virulent Dengue viruses occurs in humans and mosquitoes.** Journal of Virology, v.79, n.2, p.853-859, 2005.

COLOGNA R, RICO-HESSE R: **American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells.** Journal of Virology, v. 77, p. 3929-3938, 2003.

DIALLO, M; BA, Y; SALL, A.A; DIOP, O.M; NDIONE, J.A; MONDO, M; GIRAULT, L; MATHIOT, C. **Amplification of the Sylvatic Cycle of Dengue Virus Type 2, Senegal, 1999-2000: Entomologic Findings and Epidemiologic Considerations.** Emerging infectious Diseases, v. 9, n. 3, p.362-367. 2003.

ESTEBAN, D. **Virus Evolution.** Fields Virology, 5th Edition. v. 1, Cap. 12, pág. 389-418, 2007.

FAGBAMI, A.H; MONATH, T.P; FABIYI, A. **Dengue virus infections in Nigeria: a survey for antibodies in monkeys and humans.** Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 71, p. 60–65, 1977.

FARRAR, J; FOCKS, D; GUBLER, D; BARRERA, R; GUZMAN, M.G; SIMMONS, C; KALAYANAROOJ, S; LUM, L; MCCALL, P.J; LLOYD, L; HORSTICK, O; DAYAL-DRAGER, R; NATHAN, M.B; KROEGER, A. **Towards a global dengue research agenda.** Tropical Medicine and International Health, v. 12, p. 695–699, 2007.

FIGUEIREDO, R.M.P; NAVECA, F.G; BASTOS, M.S; MELO, M.N; VIANA, S.S; MOURÃO, M.P.G; COSTA, C.A; FARIAS, I.P. **Dengue Virus Tpe 4, Manaus, Brazil.** Emerging Infectious Diseases, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

FIGUEIREDO, L.B; CECÍLIO, A.B; FERREIRA, G.P; DRUMOND, B.P; OLIVEIRA, J.G; BONJARDIM, C.A; FERREIRA, P.C.P; KROON, E.G. **Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil.** Emerging Infectious Diseases, v. 14, n. 2, p. 314-316, 2008.

GOULD, E.A; HIGGS, S; BUCKLEY, A; GRITSUN, T.S. **Potential Arbovirus Emergence and Implications for the United Kingdom.** Emerging Infectious Diseases, v. 12, n. 4, p. 549-555, 2006.

GUBLER, D.J. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** Clinical Microbiológicos Reviews, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. **Human arbovirus infections worldwide.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 951, p. 13-24, 2001.

HALSTEAD, S.B. **Dengue.** The Lancet, v. 370, n. 10, p.1644-1652, 2007.

HAYDON, D.T; SARAH, C; LOUISE, H. T; KAREN, L.M. **Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge.** Emerging Infectious Diseases, v. 8, n. 12, p. 1468-1473, 2002.

HESSE, R.R. **Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature.** Virology, v. 174, p. 479–493, 1990.

HESSE, R.R. **Dengue Virus Evolution and Virulence Models.** Clinical Infectious Diseases, v. 44, p. 1462-1466, 2007.

HILDE M.S; WILSCHUT, J.C; SMIT, J.M. **Role of antibodies in controlling dengue virus infection.** Immunobiology, v. 214, p. 613–629, 2009.

[HTTP://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html](http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html). **Index of Dengue.** Center for Disease Control and Prevention. Acesso: 09/02/10. Postado por: Division of Vector Borne and Infectious Diseases, em 26/10/09.

ICTVdB Management (2006). 00.026. **Flaviviridae**. In: *ICTVdB – The universal Virus Database*, Version 3. Buchen-Osmond, C.(Ed), Columbia University, New York, USA.

ICTVdB Management (2006). 00.026.0.01. **Flavivirus**. In: *ICTVdB – The Universal Virus Database*, Version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

ICTVdB Management (2006) 00.026.0.01.013. **Dengue virus**. In: *ICTVdB – The Universal Virus Database*, Version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

INOUE S, MORITA K, MATIAS RR, TUPLANO JV, et al. **Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines**. *J Med Primatol*, v. 32, p. 89–94, 2003.

JENNIFER L. KYLE AND EVA HARRIS. **Global Spread and Persistence of Dengue**. *Annu. Rev. Microbiol*, v. 62: p. 71-92, 2008.

JONATHAN, S.T; XAVIER, P, CE´SAR, G. A; CHIMÈNE, N. N; BRIAN, H. B; GILDA, G; THOMAS, G. K; JEAN-PAUL, G; STUART, T. N; ERIC, M. L. **Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat**. *Plos One*, Issue 8, e764, 2007.

KUNO, G; GWONG, J.J; CHANG, K; TSUCHIYA, R; NICK, K; BRUCE, C.C. **Phylogeny of the Genus *Flavivirus***. *Journal of Virology*, v. 72, p. 73-83, 1998.

LANCIOTTI, R.S; LEWIS, J.G; GUBLER, D.J; TRENT,D.W. **Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses**. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 65-75, 1994.

LANCIOTTI RS, GUBLER DJ, TRENT DW. **Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses**. *J Gen Virol*, v. 78, p. 2279–2284, 1997.

LINDENBACH, B.D., THIEL H.J., RICE C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M., Griffin D.E., LAMB R.A. **Fields Virology**.

5th Edition, vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. USA, 2007.

LINDENBACH, B.D; RICE, C.M. **Molecular biology of flavivirus**. Adv Virus Res, vol.59, p.23-61, 2003.

MINISTERIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/>
Acesso em 28 set. 2009.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R.J; ROSSMANN, M.G. **A structural perspective of the flavivirus life cycle**. Nat Rev Microbiol, v. 3, p. 13-22, 2005.

PASSOS, F.C; SILVA, W.R; PEDRO,W.A; BONIN, M.R. **Frugivory in bats (Mammalia, Chiroptera) at the Intervales State Park, Southeastern Brazil**. Revista Brasileira de Zoologia, v. 20, p. 511-517, n. 3, 2003.

ROBERTS, D.R; PEYTON, E.L; PINHEIRO, F.P; BALDERRAMA, F. **Associations of arbovirus vectors with gallery forests and domestic environments in southeastern Bolivia**. Bull Pan Am Health Organ, v. 18, p. 337–350, 1984.

SEMG - Secretaria do Estado de Minas Gerais; Superintendência de Epidemiologia; Gerencia de Vigilância Ambiental. **Situação atual da dengue em Minas Gerais: resumo informativo - 06/04/2010**.

SCOTT, C.W; ALAN, D.T.B. **Transmission Cycles, Host Range, Evolution and Emergence of Arboviral Disease**. Nature Reviews, v. 2, p. 789-801, 2004.

SCOTT, T.W. **Are bats really involved in dengue virus transmission?** J Med Entomol, v. 38, p. 771–772, 2001.

SILVA, A.M; DITTUS, W.P.J; AMERASINGHE, P.H; AMERASINGHE, F.P. **Serologic Evidence for an Epizootic Dengue Virus Infecting Toque Macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 60, p. 300-306, 1999.

SOLOMON, T. E. M. MALLEWA. **Dengue and other emerging *Flaviviruses***. *J Infect*, v. 42, n. 2, p.104-115, 2001.

THOISY, B; LACOSTE, V; GERMAIN, V; MUÑOZ-JORDÁN, J; COLÓN, C; MAUFFREY, J.F; DELAVAL, M; CATZEFLIS, F; KAZANJI, M; MATHEUS, S; DUSSART, P; MORVAN, J; SETIÉN, A.A; DEPARIS, X; LAVERGNE, A. **Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals**. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, n. 2, p. 157-169, 2009.

THOISY, B; P, DUSSART; M; KAZANJI. **Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana**. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 98, p. 409-412, 2004.

TOWNER, J.S; POURRUT, X; ALBARIN˜O, C.G; NKOGUE, C.N; BIRD, B.H; GRARD, G; KSIAZEK, T.G; PAUL, J; GONZALEZ, S.T; NICHOL, E.M.L. **Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat**. *Open Access Freely*, issue 8, e764, p. 1-4, 2007.

VALERO, N; ESPINA, L.M; ESTEVEZ, J; MELEAN, E. **Immunity to flavivirus in Amerindian population of the Sierra de Perija, Zulia state, Venezuela**. *Invest Clin*, v. 45, p. 337–345, 2004.

VASILAKIS, N; SHELL, E.J; FOKAM, E.B; MASON, P.W; HANLEY, K.A; ESTES, D.M; WEAVER, S.C. **Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge**. *Virology*, v. 358, p. 402–412, 2007.

VASILAKIS, N; HOLMES, E.C; FOKAM, E.B; FAYE, O; DIALLO, M; SALL, A.A; WEAVER, S.C. **Evolutionary Processes among Sylvatic Dengue Type 2 Viruses**. *Journal of Virology*, v. 81, p. 9591-9595, 2007.

VASILAKIS, N; TESH, R.B; WEAVER, S.C. **Sylvatic Dengue Virus Type 2 Activity in Humans, Nigeria, 1966**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, p. 502-504, 2008

WANG, E; NI, H; XU, R; BARRETT, A.D.T; WATOWICH, S.J; GUBLER, D.J; WEAVER, S.C. **Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and sylvatic Dengue Viruses.** Journal of Virology, v. 74, p. 3227-3234, 2000.

WHO. 1985. **Arthropod-born and Rodent-born Viral Diseases.** World Health Organization Technical Report Series No. 719, WHO. Geneva.

ZHANG, H; YANG, X; LI, G. **Detection of dengue virus genome RNA in some kinds of animals caught from dengue fever endemic areas in Hainan Island with reverse transcription-polymerase chain reaction.** Chinese journal of experimental and clinical virology, v.12, p. 226-228, 1998.