

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

POLIANA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *FLAVIVIRUS* EMERGENTES EM
ROEDORES E PRIMATAS: RELAÇÃO ENTRE PATÓGENO, HOSPEDEIRO E
AMBIENTE**

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**DETECÇÃO MOLECULAR E SOROLÓGICA DE *FLAVIVIRUS* EMERGENTES EM
ROEDORES E PRIMATAS: RELAÇÃO ENTRE PATÓGENO, HOSPEDEIRO E
AMBIENTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do título de
Doutora em Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientador: Prof. Dr. Danilo Bretas

Belo Horizonte

2019

*"A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais volta ao seu tamanho original."*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

O fim de cada etapa na vida representa a renovação de expectativas e a certeza de que conquistas não são frutos apenas de esforços individuais. Seria impossível chegar até aqui sozinha.

Agradeço especialmente ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo amor, compreensão, dedicação e pelo apoio incondicional. Ao Wallison por toda a ajuda, carinho e por tornar essa trajetória mais amena.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e por estarem sempre presentes na minha vida.

À minha orientadora Giliane pelos ensinamentos que vão muito além da virologia, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pela atenção e por toda orientação recebida, pelo apoio e seriedade profissional.

Aos colegas do GAG agradeço pela companhia diária.

Aos professores e colegas do Laboratório de Vírus pelo aprendizado e convivência diária.

Ao Danilo pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível a execução deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
GRÁFICOS	V
TABELAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 AS DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES	1
1.2 A ORDEM RODENTIA COMO HOSPEDEIROS DE ZONOSSES	5
1.3 A ORDEM PRIMATA COMO HOSPEDEIRO DE ZONOSSES.....	9
1.4 <i>FLAVIVIRUS</i>	11
1.4.1.1 <i>Dengue virus</i>	14
1.4.1.1.1 FATORES ECOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DENV	15
1.4.1.1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	18
1.4.1.2 <i>Yellow fever virus</i>	20
1.4.1.2.1 FATORES ECOLÓGICOS ASSOCIADOS AO YFV	23
1.4.1.2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	29
1.4.1.2.3 VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA	33
2.0 JUSTIFICATIVA	36
3.0 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4.0 ESTRATÉGIA DE TRABALHO	39
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E ÁREA DE ESTUDO.....	40
4.1.1 AMOSTRAS DE PEQUENOS ROEDORES	43
4.1.2 AMOSTRAS DE GRANDES ROEDORES (CAPIVARAS).....	49
4.1.3 AMOSTRAS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	50

5.0	METODOLOGIA	51
5.1	PRODUÇÃO DE ESTOQUE VIRAL	51
5.1.1	MULTIPLICAÇÃO E TITULAÇÃO DE DENV-4	52
5.2	DETECÇÃO MOLECULAR	53
5.2.1	TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES PARA DENV	53
5.2.2	PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE YFV	53
5.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	54
5.4	EXTRAÇÃO DE RNA	55
5.5	TRANSCRIÇÃO REVERSA	56
5.6	PCR EM TEMPO REAL	56
5.7	PCR CONVENCIONAL	57
5.8	FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	58
5.9	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	59
5.10	SEQUENCIAMENTO E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS	59
5.11	CONSTRUÇÃO DO MAPA PARA CORRELAÇÃO GEOGRÁFICA DE EPIZOOTIAS E CASOS HUMANOS DE YFV	60
5.12	ENSAIO DE SORONEUTRALIZAÇÃO (<i>PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST- PRNT</i>)	60
6.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
6.1	PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DOS VÍRUS CONTROLES	61
6.2	PADRONIZAÇÕES	62
6.2.1	TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES PARA A DETECÇÃO DE DENV	62
6.2.2	PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE YFV	63
6.3	PROSPECÇÃO DE <i>FLAVIVIRUS</i>	64
6.3.1	PROSPECÇÃO VIRAL NA ORDEM RODENTIA	64
6.3.1.1	PROSPECÇÃO MOLECULAR DE DENV EM ROEDORES	64
6.3.1.2	PROSPECÇÃO MOLECULAR DE YFV EM ROEDORES	69
6.3.1.3	PROSPECÇÃO DE ANTICORPOS <i>ANTI- FLAVIVIRUS</i> EM ROEDORES	70
6.3.2	PROSPECÇÃO VIRAL NA ORDEM PRIMATA	72
6.3.2.1	PROSPECÇÃO MOLECULAR DE DENV EM PNH	72
6.3.2.2	PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE YFV EM PNHs	74

6.3.2.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS MOLECULARES E A NECROPSIA DOS PNHs	77
6.3.2.4	CORRELAÇÃO GEOGRÁFICA DE EPIZOOTIAS E CASOS HUMANOS DE YFV	78
6.3.2.5	PROSPECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FLAVIVIRUS EM PNH.....	81
7.0	CONCLUSÃO	84
8.0	REFERENCIAS.....	86

LISTA DE SIGLAS

A – Adenina

ADE– Exacerbação da infecção dependente de anticorpos (do inglês *antibody-dependent enhancement*)

C – Citosina

°C – graus Celsius

cDNA – DNA complementar

CI – Controle Interno

CO₂ – Dióxido de Carbono

Ct – Cycle threshold

DENV- *Dengue virus*

DIE- Doenças Infecciosas Emergentes

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

ECP – Efeito Citopático

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético Tetra-acético

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

G – Guanina

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICTV – *International Commitee on Taxonomy of Viruses*

kb– quilobases

KCl – Cloreto de potássio

M – Molar

MEM – Meio Mínimo Essencial de Eagle

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

L – Mililitro

mM – Micro Molar

M-MLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NCP – Não Citopático

NS5- Porção amino-carboxi terminal da quinta proteína não estrutural (NS5)

ng – nanograma

ng/ μ L – nanogramas/microlitro

nm – nanômetro

nM – nanomolar

OIE – Organização Internacional das Epizootias

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – Região Aberta de Leitura

p/v – peso/volume

pb – pares de bases

PBS – Tampão Salina Fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

qPCR–Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RPM – Rotações por Minuto

RT – Transcrição Reversa

SVS– Secretaria de Vigilância em Saúde

T – Timina

T_m – Temperatura de *Melting*

U – Unidades

U/ μ L – Unidades/microlitro

U/mL – Unidades/mililitro

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UTR – *Untranslated Region*

V – Volt

YFV – *Yellow Fever Virus*

5'UTR- região 5' não traduzida

μ g/mL – Microgramas/Mililitro

μ g – Micrograma

μ L –Microlitro

ρ mol/ μ L – picomol/microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fatores associados à emergência das DIES..	3
Figura 2- Fatores envolvidos na transmissão de patógenos pelos roedores..	6
Figura 3 - Representação esquemática da organização gênica dos <i>Flavivirus</i> ..	12
Figura 4 - Filogenia da família <i>Flaviviridae</i> ..	13
Figura 5 - Ciclo de manutenção do DENV..	16
Figura 6 - Árvore filogenética representativa dos genótipos virais do YFV..	22
Figura 7 - Distribuição espacial dos genótipos virais de YFV..	23
Figura 8 - Ciclos epidemiológicos do YFV..	24
Figura 9 - Distribuição geográfica das espécies de PNH relacionadas a febre amarela no Brasil.....	28
Figura 10 - Distribuição geográfica dos Casos de epizootias e humanos de YFV entre 2016/2018..	32
Figura 11 - Áreas brasileiras com recomendação de vacina para YFV..	35
Figura 12- Fluxograma de trabalho.....	39
Figura 13 - Mapa de localização das amostras utilizadas neste trabalho.....	42
Figura 14 - Vista panorâmica do local de coleta dos pequenos roedores em Sabará.	44
Figura 15 - Vista panorâmica dos locais de coleta das amostras de roedores no Serro.....	45
Figura 16 - Vista panorâmica dos locais de coleta das amostras de roedores em Contagem.	46
Figura 17 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de roedores em Ouro Preto.....	47
Figura 18 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de roedores na Serra do Caraça	48
Figura 19 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de capivaras na Lagoa da Pampulha..	49
Figura 20 -Vista panorâmica do local de coleta das amostras de capivaras em Goiás..	50
Figura 21 - Comparação da sensibilidade entre as reações descritas por Bronzoni <i>et al.</i> (2005) e Lanciotti <i>et al.</i> (1992) para a detecção de DENV4 a partir da matriz de fígado de roedor..	62
Figura 22 – PadronizaçãoPCR convencional para a detecção de YFV.	63
Figura 23 -Gel representativo da reação de PCRde uma amostra de roedor apresentando amplificação suspeita para DENV1.....	65
Figura 24 - Geral representativo do perfil das PCRs das amostras de capivaras para prospecção de DENV.....	66
Figura 25 - Perfil de amplificação da reação de qPCR para detecção de YFV em amostras de roedores.....	69
Figura 26 - Porcentagem de redução na PRNT das amostras de pequenos roedores..	71
Figura 27 - Porcentagem de redução na PRNT das amostras de capivaras... ..	71

Figura 28 - Gel representativo do perfil das amostras de PNH na PCR pra prospecção de DENV... 73	73
Figura 29 - Inferência filogenética construída a partir de 207 pb da região NS5 de YFV.. 75	75
Figura 30 - Inferência filogenética construída a partir de 945 pb da região CprM de YFV..... 76	76
Figura 31 - Fotos da necropsia de PNH. 77	77
Figura 32 - Associação geográfica entre os casos humanos e as epizootias confirmadas de YFV em Minas Gerais em 2017. 79	79
Figura 33 - Porcentagem de redução na PRNT das amostras de PNH. 82	82

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação de casos humanos e epizootias de YFV no Brasil entre julho de 2014 e dezembro de 2016..	31
Gráfico 2 - Série histórica de YFV no Brasil. Número de casos humanos confirmados de febre amarela silvestre e a letalidade no Brasil entre 1980 e 2018..	33

TABELAS

Tabela 1 - Flaviviroses associadas a roedores	8
Tabela 2 - Detecção de YFV em diversas ordens de mamíferos	27
Tabela 3 - Banco de amostras de primatas não humanos e roedores analisados neste projeto.....	41
Tabela 4 - Características ecológicas dos roedores desta coleção	43
Tabela 5 - Características ecológicas dos primatas desta coleção	43
Tabela 6- Concentrações dos reagentes testados para a padronização da PCR para a caracterização do YFV.....	54
Tabela 7 - Condições de ciclagem usadas na padronização da reação para a caracterização do YFV	54
Tabela 8 - Concentração de reagentes da qPCR	57
Tabela 9 - Reações usadas na PCR convencional.....	58
Tabela 10 - Levantamento Bibliográfico sobre a detecção de DENV em roedores.	67

RESUMO

A ocorrência de doenças infecciosas emergentes (DIE) vem aumentando nos últimos anos, sendo essa emergência associada a determinantes sociais, econômicos e principalmente ambientais. A maioria dessas doenças é de origem zoonótica e dentre os fatores de risco associados a essa transmissão estão a oportunidade de contato e proximidade filogenética dos reservatórios e/ou hospedeiros animais com seres humanos. Pelo fato dos roedores e primatas não humanos (PNHs) serem amplificadores ou reservatórios de patógenos zoonóticos, e, em muitos locais, viverem em contato próximo com a população humana e animais domésticos, estes animais podem atuar como uma ponte entre o ambiente silvestre, o rural e o urbano. Em vista disso, esse projeto teve como hipótese investigar a circulação de *Dengue virus* (DENV) em roedores e primatas bem como a circulação de *Yellow fever virus* (YFV) em outros animais além dos primatas, sendo os roedores os potenciais candidatos. A dengue representa, atualmente, uma das doenças mais importantes em termos de morbidade, mortalidade e impacto econômico nacional. Em adição, o Brasil vivenciou recentemente um dos maiores surtos de febre amarela da sua história, com mais de 800 casos confirmados, uma taxa de letalidade superior a anos anteriores e ainda há um grande contingente populacional sem a devida cobertura vacinal. Tendo em vista esse cenário, este trabalho visou a prospecção de (DENV) e (YFV) em roedores e primatas não humanos coletados em ambientes de florestas, urbanos e rurais. Através da prospecção molecular e sorológica foram analisadas amostras clínicas de: pequenos roedores, grandes roedores como as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e amostras de primatas não humanos. Não foram detectadas amostras positivas de roedores para DENV e YFV, nem evidências da circulação de DENV em primatas. A ausência de detecção, comparada a outros estudos, pode ser atribuída à diferença do número amostral das coleções analisadas, às espécies analisadas e locais de coleta que poderiam estar refletindo diferentes condições ecológicas de cada área analisada. Em relação à prospecção molecular do vírus da febre amarela em primatas, foram detectados dois animais positivos. Ambos os animais são da espécie *Callicebus personatus* e foram coletados durante o surto de febre amarela no estado de Minas Gerais. Análises filogenéticas demonstraram que essas amostras se agrupam junto ao genótipo Sul Americano 1, sendo mais proximamente relacionadas com as amostras caracterizadas no último surto de febre amarela vivenciado no Brasil. Além disso, a necropsia de vários órgãos demonstrou alterações macroscópicas compatíveis com a infecção pelo YFV. Os dados moleculares associados aos dados macroscópicos contribuem para preencher algumas lacunas relacionadas à carência de informação no que diz respeito ao curso da infecção em primatas não humanos. Uma correlação espaço temporal entre casos

humanos e epizootias de YFV em Minas Gerais em 2017, demonstrou uma sobreposição de casos e que estes se agrupam em 2 clusters que ocorreram, principalmente, em regiões com baixa cobertura vacinal, apontando para uma necessidade de melhores ações de vigilância e políticas de prevenção. A prospecção sorológica de *Flavivirus* em primatas não humanos, evidenciou que um dos animais analisados apresentou anticorpos anti-flavivirus, indicando assim um contato prévio desse animal com vírus.

Palavras chave: Viroses emergentes, *Flavivirus*, *Dengue virus*, *Yellow fever virus*, Rodentia, Primatas não humanos.

ABSTRACT

The occurrence of emerging infectious diseases (EID) has been increasing in recent years, and this emergence is associated with social, economic, and mainly environmental determinants. Most of these diseases are of zoonotic origin and among the risk factors associated with this transmission are the opportunity for contact and phylogenetic proximity of reservoirs and / or animal hosts with humans. Rodents and non-human primates are amplifiers or reservoirs of zoonotic pathogens, and in many places live in close contact with the human population and domestic animals, these animals can act as a bridge between the wild, urban. In this way, this project hypothesized the circulation of DENV in rodents or primates as well as the circulation of yellow fever in other animals besides primates, with rodents being the candidate animals. Dengue is currently one of the most important diseases in terms of morbidity, mortality and national economic impact. In addition, Brazil has recently experienced one of the largest outbreaks of yellow fever in its history, with more than 1000 confirmed cases, a case fatality rate higher than previous years, and there is still a large population contingent without adequate vaccine coverage. Considering this scenario, this study aimed to prospect for *Dengue virus* (DENV) and *Yellow fever virus* (YFV) in rodentia and non-human primates collected in forest, urban and rural environments. Through molecular and serological prospecting of samples from small rodents, capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and samples of non-human primates were analyzed. No positive rodent samples were detected for DENV and YFV, and no evidence of DENV circulation in primates. The absence of detection, compared to other studies, can be attributed to the difference in the sample number of the analyzed collections, the species analyzed and the collection sites that could be reflecting different ecological conditions of each analyzed area. In relation to prospecting for yellow fever in primates, two positive animals were detected. Both animals are of the species *Callicebus personatus* and were collected during the outbreak of yellow fever in the state of Minas Gerais. Phylogenetic analyzes constructed through 205 bp of NS5 and 945 bp of the CprM region demonstrated that these samples are grouped together with the South American genotype 1, being more closely related to the samples characterized during the current outbreak of yellow fever experienced in Brazil. In addition, necropsy of several organs have shown macroscopic changes, compatible with YFV viral infection. The molecular data associated with macroscopic data contribute to fill some gaps related to the lack of information regarding the course of infection in non-human primates. A temporal correlation between human cases and YFV epizootics in Minas Gerais in 2017 demonstrated an overlap of cases and that these clusters are grouped in 2 clusters that occurred mainly in regions with low vaccination coverage, pointing to a

need for better surveillance and prevention policies. Serological survey of *Flavivirus* in non-human primates showed that one of the animals tested showed anti-flavivirus antibodies, thus indicating a previous contact of this animal with virus.

Keywords: Emerging viruses, *Flavivirus*, *Dengue virus*, *Yellow fever virus*, Rodentia, Non-human primates

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 AS DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES

A década de 1980 marcou o regresso das doenças infecciosas a um plano de destaque na saúde pública (Epstein, 1995; Morens *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2008). Estas constituem uma ameaça à saúde global, figurando como uma das principais causas de mortalidade de crianças e adultos em todo o mundo, sendo que, nos países em desenvolvimento, a situação é ainda mais grave, contrariando o que os notáveis avanços no âmbito das ciências médicas poderiam esperar (Berns e Rager, 2000; Bhutta *et al.*, 2014).

O comportamento epidemiológico das doenças infecciosas ao longo da história sempre foi marcado pela emergência e reemergência, mas foi após a Segunda Guerra Mundial, e de maneira mais evidente a partir de meados da década de 1970, que o fenômeno “doenças emergentes” passou a ser um motivo de preocupação global. A Segunda Guerra trouxe uma série de transformações políticas, econômicas e sociais em boa parte do mundo. Urbanização, crescimento demográfico, alterações de fronteiras e formação de blocos geopolíticos tiveram como consequências grandes obras, como a construção de rodovias, represas e sistemas de irrigação, o que impactou não somente o ecossistema, mas também os padrões de ocorrência e distribuição das doenças infecciosas (Silva e Angerami, 2008; Karesh *et al.*, 2012).

Poucos anos depois, em meados da década de 1980, a emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) figurou como um divisor de águas e atuou como um fator desencadeador da emergência de infecções de múltiplas naturezas, como micoses, parasitoses e infecções bacterianas diversas (Morens *et al.*, 2004).

As doenças infecciosas emergentes (DIEs) podem ser definidas como aquelas cuja incidência em humanos ou distribuição geográfica vem aumentando nos últimos anos (Jones *et al.*, 2008). Essas doenças podem ter como agente etiológico qualquer tipo de micro-organismo, mas as viroses merecem uma atenção diferenciada, não só pelo seu maior número e diversidade, mas também pela propriedade de muitos vírus terem elevadas taxas de mutações e, portanto, diversificarem-se numa intensidade maior do que bactérias e fungos (Silva e Angerami, 2008; Olival *et al.*, 2017).

Os patógenos virais destacam-se como a segunda maior causa de DIES no planeta e surgem como uma ameaça, principalmente os que apresentam genoma de RNA, por geralmente apresentarem alta taxa de mutação, maior variabilidade genética comum e consequente potencial para o surgimento de novas espécies ou aumento de virulência (Jones *et al.*, 2008; Colin & Fletcher 2012). Entretanto, do surgimento de uma variante viral à ocorrência de uma epidemia, há um longo processo. Ainda que explicações sejam sempre buscadas para a ocorrência desta ou daquela epidemia, a verdade é que, maioria das vezes, com a exceção eventual de pequenos surtos localizados, a disseminação de um patógeno é o resultado de um conjunto de fatores agindo em sinergia. As perturbações ecológicas quase sempre estão na raiz desses processos através da redução do *habitat* natural de diferentes espécies, que as força a um convívio mais próximo com humanos (Silva e Angerami, 2008; Karesh *et al.*, 2012). Dessa forma, há a alteração de muitos processos e serviços ecossistêmicos, que podem afetar a transmissão viral e a prevalência de doenças (Young *et al.*, 2014).

A maioria das doenças emergentes (60%) tem origem zoonótica, sendo a maior parte delas é associada à fauna silvestre (Olival *et al.*, 2017). O risco de transmissão viral varia de acordo com a espécie hospedeira, a susceptibilidade do hospedeiro ao agente patogênico, a oportunidade de contato e proximidade filogenética com humanos, além da propensão para exibir sinais clínicos e outros fatores que potencializam a disseminação do patógeno (Parrish *et al.*, 2008; Levinson *et al.*, 2013; Luis *et al.*, 2013; Hanet *et al.*, 2015).

Estima-se que ocorram anualmente mais de um bilhão de casos relacionados a doenças emergentes zoonóticas, o que resulta em centenas de bilhões de dólares em perdas econômicas (Kreuder Johnson *et al.*, 2015; Lindahl e Grace, 2015). Embora os fatores que levam à emergência de cada doença possam ser distintos e peculiares, eles sempre resultam da interação entre o patógeno, o hospedeiro e o ambiente, o que faz com que essa tríade deva ser analisada e entendida de maneira interligada (Aguirre e Tabor, 2008). Dessa maneira, está sendo cada vez mais reconhecido que uma abordagem “*One Health*” concentrando as interfaces homem-animal-ecossistema é necessária para a efetiva investigação, prevenção e o controle dessas doenças (Gibbs, 2014; Wang e Cramer, 2014; Coutts e Hahn, 2015; Destoumieux-Garzón *et al.*, 2018).

De forma geral, os esforços globais para reduzir os impactos das DIES são, basicamente, focados em ações paliativas ou de contenção após a ocorrência dos surtos, através de medidas como a quarentena, desenvolvimento de vacinas e medicamentos (Pike *et al.*, 2014). Em uma tentativa de reverter esse quadro, estudos de predição de riscos para ocorrência dessas doenças têm

sido desenvolvidos (Morse, 1995; Allen *et al.*, 2017; Olival *et al.*, 2017). Nesses estudos o Brasil destaca se como um *hotspot* para a emergência de de DIES, por possuir alta diversidade biológica, grande extensão territorial, contemplando vários biomas e aspectos climáticos (Jones *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2017; IBGE, 2017; Olival *et al.*, 2017; Nava *et al.*, 2017). Associado a isso, fatores como desigualdade social, sistema de saúde deficitário e pouco acesso a serviços sanitários podem ser citados como aspectos que favorecem essas ocorrências.

Em linhas gerais, associados à emergência das DIES estão contemplados fatores econômicos, demográficos, sociais, políticos, ambientais e também os relacionados à deficiência na saúde pública e aqueles intrínsecos do patógeno como as mutações e capacidade adaptativa dos micro-organismos (Figura 1) (Kilpatrick e Randolph, 2012; Morse *et al.*, 2012; Bhutta *et al.*, 2014; Mccloskey *et al.*, 2014; Tam *et al.*, 2016). A figura a seguir apresenta fatores de diversas naturezas que contribuem para a emergência das DIES. Inúmeros exemplos ilustram tal afirmativa como descrito a seguir.

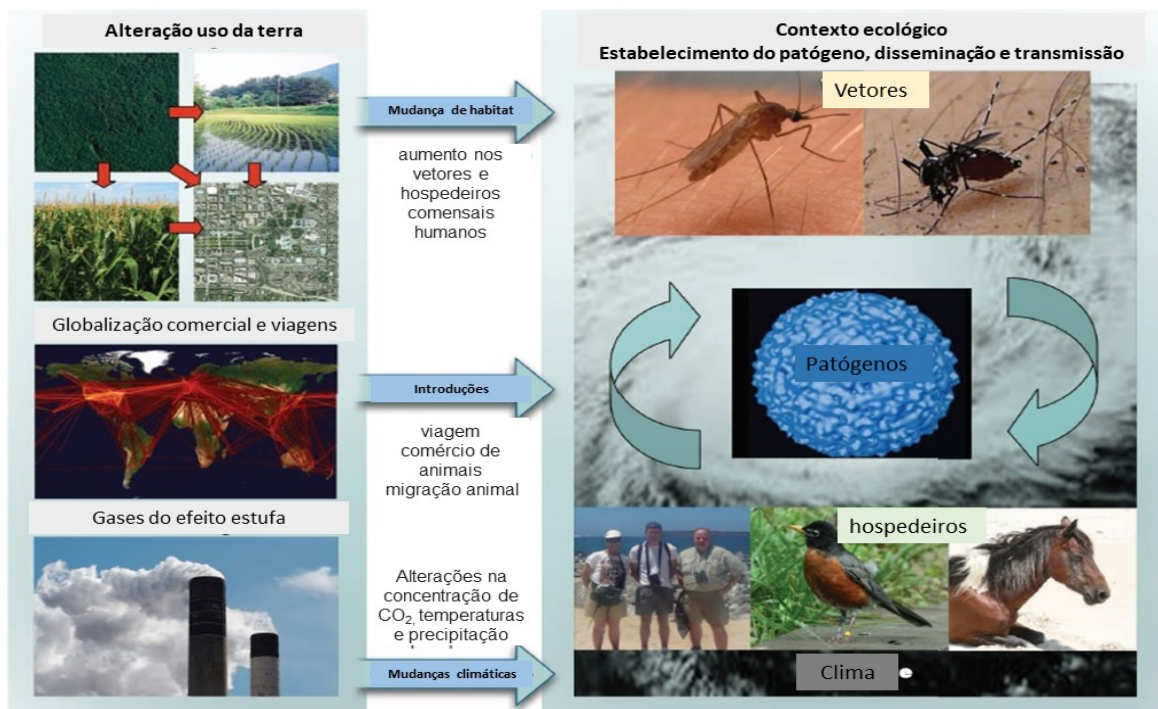


Figura 1- Fatores associados à emergência das DIES. Alterações ecológicas compreendem um dos fatores primordiais para o surgimento e estabelecimento de DIES. O comércio, viagens e circulação de animais contribuem para a introdução de novos patógenos em novas áreas. Fatores climáticos, a abundância e ecologia alimentar de vetores determinam o estabelecimento e intensidade de transmissão. O uso da terra modifica comunidades animais que servem como hospedeiros e vetores de patógenos; Fonte: (Figura adaptada de Kilpatrick, 2011).

As guerras e o incremento dos comércios nacional e internacional constituem fatores de estímulo às migrações (Cutler, 2016; Tam *et al.*, 2016). A reemergência da cólera na América do Sul, em 1990, foi relacionada à água de lastro de navios que faziam a rota Ásia-Peru (Morse,

1995). Relatos recentes, como a transmissão local de *Zika virus* por trabalhadores imigrantes em Cingapura, em 2016 e o resurgimento de casos de sarampo no Brasil em 2018 destacam a persistência dos perigos potenciais dos movimentos geográficos populacionais na disseminação das DIES (Tam *et al.*, 2016; Fannesbeck *et al.*, 2018).

A velocidade dos meios de transporte torna a disseminação dos agentes patogênicos mais rápida. Assim, caso as circunstâncias sejam favoráveis, uma nova infecção que emergir em qualquer ponto do mundo pode atravessar países e continentes inteiros em dias ou semanas, como ocorreu recentemente com o influenza H1N1, a síndrome respiratória aguda grave (SARS) e o *Zika virus* (Pérez *et al.*, 2015; Faria *et al.*, 2017; Rovesti *et al.*, 2017).

Os desenvolvimentos agrícola, tecnológico, industrial e econômico associados ao desmatamento e à poluição também influenciam fortemente esse processo. Hoje, é consenso que alterações ambientais podem gerar consequências drásticas, como mudanças climáticas em escalas nacional e mundial, que influenciam diretamente o ciclo de doenças transmitidas por vetores sensíveis às mudanças climáticas (Keesing *et al.*, 2010; Karesh *et al.*, 2012; Dennehy, 2017). Um exemplo clássico foi a emergência de hantavírus na região de *Four Corners* nos Estados Unidos, relacionado com a ocorrência do *El niño*, que aumentou a pluviosidade da região, o que levou ao aumento na população de roedores e consequente aumento da circulação viral (Hjelle e Glass, 2000). As alterações climáticas também geram desdobramentos na redistribuição de vários animais, incluindo a redistribuição de vetores artrópodes em países de clima temperado, o que levou, por exemplo, o aumento de casos de chikungunia na Europa (Higgs e Vanlandingham 2015; Bonebrake *et al.*, 2017).

Os fatores sócio-econômicos influenciam na distribuição geográfica das DIES, com a maior parte delas concentradas na África sub-sariana, Ásia e América Latina, nas áreas rurais de países com baixos índices de desenvolvimento humano e elevadas taxas de pobreza (Bhutta *et al.*, 2014). As populações afetadas, geralmente, apresentam menos recursos financeiros e limitado acesso à assistência em saúde ou ferramentas de prevenção de doenças, o que resulta em impactos adversos mais graves (Manderson *et al.*, 2009). Além disso, nessas regiões são observadas a sobreposição geográfica de doenças negligenciadas e altos níveis de co-infecções, tais como ocorre no Brasil (Bhutta *et al.*, 2014).

A urbanização, principalmente em países em desenvolvimento, pode levar à aglomeração intensa, que, associada a serviços de saneamento básico inadequado e à proliferação da fauna

sinantrópica, criam condições favoráveis para a disseminação de agentes, bem como de seus vetores e hospedeiros (Neiderud, 2015; Fournet *et al.*, 2016). A emergência da dengue e de outras flavivirose são os exemplos mais eloquentes desse processo (Fournet *et al.*, 2016). No Brasil, conforme discutido por Silva e Angerami (2008) a dengue surge como consequência da reintrodução do *Aedes aegypti*, em parte, por um lapso das ações de vigilância, mas também pelo crescimento desordenado das cidades brasileiras ao longo da segunda metade do século XX, crescimento este que impediu o controle efetivo do mosquito, apesar dos recursos despendidos. Hoje, a doença é um problema de saúde pública que afeta milhares de pessoas a cada ano gerando altos custos para o seu tratamento (Shepard *et al.*, 2013; Guzman *et al.*, 2016).

1.2 A ORDEM RODENTIA COMO HOSPEDEIROS DE ZOONOSES

Os roedores figuram como um dos mais importantes hospedeiros de uma série de vírus zoonóticos, com impactos significativos na saúde pública (Vasconcelos, 2003; Mills, 2006; Luis *et al.*, 2013; Olival *et al.*, 2017). A ordem Rodentia é a mais abundante e diversa dentre os mamíferos, com aproximadamente 2.200 espécies distribuídas em mais de 30 famílias, o que corresponde a aproximadamente 40% das espécies atuais de mamíferos, sendo que mais de 400 delas encontram-se na América do Sul (Reig, 1984; Huchon *et al.*, 2002; Wilson e Reeder, 2005).

Os roedores possuem como características distintivas um par de incisivos, com esmalte apenas na face anterior, o que faz com que eles fiquem continuamente afiados, além de um diastema entre os incisivos e pré-molares, decorrente da perda dos caninos e de outros dentes. Essa configuração básica permitiu que esses animais tivessem uma ampla dieta e explorassem quase todos os ambientes terrestres. Eles são especializados em viver no dossel de florestas, no chão e em ambientes desérticos e semiaquáticos (Rabelo, 2007). Esses animais possuem também uma ampla variedade de formas e tamanhos. O menor roedor atual é o camundongo-pigmeu africano (*Mus minutoides*), que possui cinco gramas, e o maior é a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que pode chegar a mais de 50 quilogramas (Alexander, 2003).

Em muitos lugares, os roedores vivem em contato próximo com a população humana e animais domésticos. Esses animais periurbanos oferecem uma ligação entre os animais silvestres e os humanos, expondo o homem a algumas zoonoses que circulam normalmente no ecossistema natural. Assim, são múltiplos os fatores envolvidos na transmissão de patógenos pelos roedores (Figura 2) (Meerburg *et al.*, 2009).

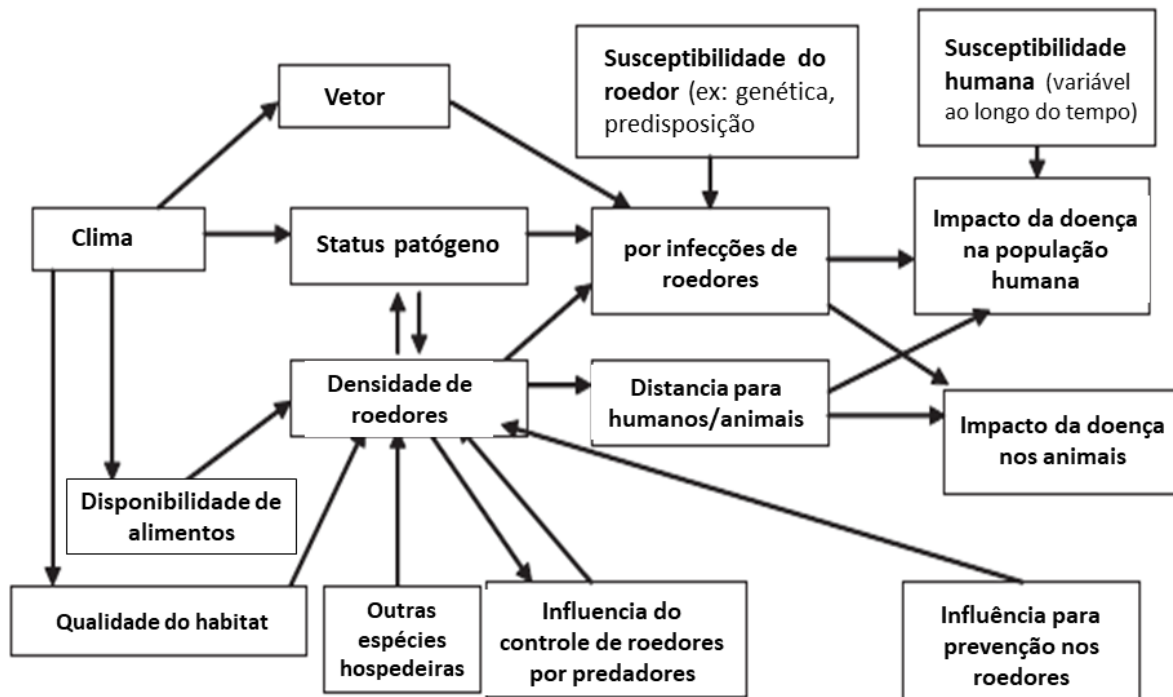


Figura 2– Fatores envolvidos na transmissão de patógenos pelos roedores. Figura adaptada de Meerburg *et al.*, 2009.

As alterações climáticas globais, os padrões de uso da terra e as variações nos regimes pluviométricos observados nos últimos anos parecem exercer uma influência direta sobre a distribuição de várias espécies, incluindo os roedores e os artrópodes. Como consequência, há mudanças no número de notificações de doenças associadas a esses animais (Githeko *et al.*, 2000; Klempa, 2009; Dearing e Disney, 2010).

Perturbações antropogênicas resultam na perda da diversidade, o que favorece espécies oportunistas em detrimento das espécies especialistas. Segundo a teoria da diluição, o favorecimento de espécies oportunistas resulta no aumento da densidade populacional dessas e na frequência de interações intraespecíficas, o que contribui para uma maior transmissão do vírus dentro de uma determinada população de roedores (Mills, 2006). Dessa forma, provavelmente, quanto maior a abundância de reservatórios roedores, maior a eliminação de agentes patogênicos e maior o risco para a população humana (Ostfeld e Holt, 2004).

As doenças transmitidas por roedores podem ser dispersas de forma direta ou indireta. Na rota direta, o patógeno é transmitido para humanos por meio de excretas (saliva, fezes e urina) de animais infectados. Como exemplo, há a transmissão do agente etiológico por meio da mordida do animal infectado ou do consumo de água ou de alimentos contaminados com fezes do roedor (Meerburg *et al.*, 2009). Além disso, os seres humanos podem entrar em contato com a água

contaminada com urina (ex. leptospirose) ou por meio da inalação de patógenos presentes em excretas (ex. hantavirose). Na rota indireta, os roedores podem atuar como amplificadores de patógenos. Por meio da picada de artrópodes vetores ectoparasitas (carrapatos, ácaros, pulgas), o agente etiológico é transmitido para outro roedor ou para humanos (Meerburg *et al.*, 2009).

Além disso, esses animais podem ajudar a manter a transmissão de patógenos em diversos ambientes, variando desde áreas urbanas densamente povoadas a ambientes rurais e desérticos (Meerburg *et al.*, 2009).

Atualmente, são conhecidas mais de 60 doenças em que há a participação de roedores no ciclo de transmissão dos agentes etiológicos virais. Esses vírus são das famílias *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Picornaviridae*, e com destaque para os *Flaviviridae* (Meerburg *et al.*, 2009; Phan *et al.*, 2011; Olival *et al.*, 2017). Considerando-se os *Flavivirus*, os roedores são conhecidos por participarem como hospedeiros ou com um papel ainda desconhecido no ciclo de transmissão de várias doenças, no qual maioria possui artrópodes como vetores (Tabela 1).

Tabela 1 - Flaviviroses associadas a roedores

Doença	Agente etiológico	Forma de transmissão	Papel do roedor	Localização	Sintomas	Referência
Febre hemorrágica de Omsk	<i>Omsk hemorrhagic fever virus</i>	Contato direto de seres humanos com animais infectados e picadas de carrapatos infectados	Reservatório	Endêmica da Sibéria	Doença hemorrágica. Caráter ocupacional	(Holbrook <i>et al.</i> , 2005)
Doença da floresta de Kyasanur	<i>Kyasanur Forest Disease Virus</i>	Picada de carrapato infectado	Reservatório	Índia	Febre hemorrágica	(Solomon e Mallewa, 2001)
Doença do Vírus Apoi	<i>Apoi Virus</i>	Não definida	Não definido	Japão	Febre, cefaleia, mialgia e artralgia	(Karabatsos, 1995)
Encefalite transmitida por carrapato	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>	Picada de carrapato infectado	Reservatório	Sibéria, Europa e China	Febre e meningoencefalite	(Gritsun <i>et al.</i> , 2003)
Encefalite de Powassan	<i>Powassan virus</i>	Picada de carrapato ou ácaro infectado	Reservatório	Eurasia, Canadá e EUA	Encefalite	(Piantadosi <i>et al.</i> , 2016)
Dengue	<i>Dengue virus</i>	Não definida	Não definido	Guiana Francesa	Não definido	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004, 2009)

Embora existam poucos dados disponíveis na literatura no que se refere à circulação de *Flavivirus* em roedores de ambientes silvestres e urbanos, De Thoisy (2009) demonstrou a circulação de quatro sorotipos de *Dengue virus* (DENV) em roedores silvestres da Guiana Francesa, coletados em regiões de floresta, rural e urbana entre 2001 e 2007 (De Thoisy *et al.*, 2009). Anticorpos neutralizantes para DENV1, DENV2, YFV e *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) também já foram detectados em roedores da América Central, coletados em área de floresta entre 1994 e 1995 (De Thoisy *et al.*, 2004). Além disso, também há evidências sorológicas da circulação de DENV2, YFV, SLEV, e *West Nile virus* (WNV) em roedores peridomésticos coletados entre 2011 e 2012 no México (Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016).

Além dos roedores de pequeno porte, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) também participam do ciclo de transmissão de várias doenças. Esses animais têm se adaptado aos ambientes antropizados devido ao acentuado avanço das cidades e das atividades humanas em direção ao ambiente silvestre. A proximidade das capivaras com áreas urbanas e rurais deve ser vista com preocupação, já que elas são reservatórios de agentes patogênicos, com destaque para as bactérias *Rickettsia rickettsia* e *Brucella*, que são causadoras da febre maculosa e da brucelose,

respectivamente (Nogueira e Cruz, 2007). Esses animais também podem ser reservatórios de várias viroses com potencial emergente, como do vírus da raiva (Bello *et al.*, 1974), do vírus da febre aftosa (Gomes e Rosenberg, 1984), do vírus da estomatite vesicular (Restrepo *et al.*, 1980), do vírus da leucose bovina (Milagre, 2004), do *Herpesvirus* bovino tipo 1 (Milagre, 2004) e *Coronavirus* (Catroxo *et al.*, 2010), o que demonstra o possível papel desses animais como reservatório de várias viroses com potencial emergente.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença de evidências moleculares da circulação do *Vaccinia virus* em amostras de fezes de capivaras coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil, com destaque para a região da Pampulha inserida na cidade de Belo Horizonte, um grande centro urbano (Dutra *et al.*, 2017). Outros estudos antigos (Moreira, 1955), ou mais recentes (Barbosa *et al.*, 2014) adicionalmente demonstraram a capacidade das capivaras de serem infectadas ou expostas ao *Vaccinia virus*.

1.3 A ORDEM PRIMATA COMO HOSPEDEIRO DE ZONÓSES

Como já mencionado, mais de 60% das doenças infecciosas humanas são causadas por patógenos que compartilhamos com animais domésticos e/ou silvestres. No que tange as viroses, inúmeras doenças emergentes são associadas recorrentemente com os mesmos tipos de animais como artrópodes vetores, morcegos, roedores e os primatas não humanos (PNHs) (Olival *et al.*, 2017). Os PNHs têm sido associados com a emergência de doenças em humanos figurando ou como reservatórios ou como amplificadores virais. Exemplos eloquentes incluem a ocorrência das febres hemorrágicas causadas por *Filovirus* na África, *Monkeypox* também na África e a ocorrência de febre amarela na África e no continente sul-americano (Gómez *et al.*, 2013; Gumusova *et al.*, 2015).

Os primatas do Novo Mundo ou *Platyrrhini* habitam a América Latina, podendo ser encontrados desde o sul do México até a região norte da Argentina. Eles são animais arborícolas e ocupam diferentes estratos das florestas tropicais. Atualmente, três famílias são descritas: *Atelidae*, *Cebidae* e *Pitheciidae* (Montenegro, 2011).

No campo da primatologia mundial, o Brasil é o país que possui a maior biodiversidade, com cerca de 21% de todos os táxons, sendo que, das espécies que vivem no território nacional, 56% são endêmicas (Montenegro, 2011). Essas espécies distribuem-se por praticamente todos os biomas brasileiros: 105 encontram-se na Amazônia; vinte e cinco, na Mata Atlântica; quatro, na

Caatinga; cinco, no Pantanal; quatro, no Cerrado; e dois, nos Pampas (Montenegro, 2011). Apesar disso, parte dessa diversidade está ameaçada de extinção, principalmente devido à fragmentação de habitats, à caça e ao tráfico de animais (Montenegro, 2011).

Espécies de primatas mais generalistas, como as dos gêneros *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix*, apresentam uma maior habilidade para encontrar alimentos no entorno de ambientes fragmentados, tendo, assim, melhores chances de sobrevivência sob essas condições (Fialho e Gonçalves, 2008). Entretanto, a aproximação durante a busca por alimentos contribui para a potencialização do risco de esses animais se infectarem ou transmitirem patógenos ao homem e aos animais domésticos (Montenegro, 2011).

Considerando-se que primatas e humanos podem compartilhar vários patógenos e que os estudos sobre a ocorrência de microorganismos nesses animais ainda são insuficientes, todo o esforço para ampliar o conhecimento nessa área representa um investimento em prol da saúde pública e da conservação das espécies (Chapman e Peres, 2001). Pesquisas nessa área podem revelar indícios sobre as origens, a evolução e a dinâmica de transmissão natural de alguns agentes patogênicos importantes, além de proporcionarem parâmetros para a utilização de primatas como sentinelas de doenças infecciosas emergentes (Wolfe *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 2007).

Esses animais podem ser considerados como ‘sentinelas naturais’ na vigilância de diversos patógenos por atuarem como hospedeiros no ciclo de várias zoonoses (Batista, 2012). O fato de poderem ser encontrados próximos a habitações humanas, serem sensíveis a determinados agentes patogênicos, responderem clinicamente de forma semelhante ao ser humano a alguns agentes infecciosos e, por fim, manifestarem sinais clínicos antes do homem são fatores que contribuem para que possam figurar como bons sentinelas (Wolfe *et al.*, 1998; Gubernot *et al.*, 2008). A importância disso reside no fato de que as ações de vigilância sentinela permitem a detecção precoce de agentes infecciosos, alertando sobre a sua circulação em determinado local e sinalizando possíveis riscos para a população humana.

As semelhanças nas características fisiológicas e genéticas compartilhadas entre os PNHs e os humanos favorecem a transmissão e o compartilhamento de agentes patogênicos entre essas espécies (Wolfe *et al.*, 2001; Davies e Pedersen, 2008; Kowalewski *et al.*, 2011). Em geral, tornou-se cada vez mais claro que de todos os vírus com potencial para saltar de um reservatório animal para humanos, entre os mais propensos a fazer o salto estão aqueles mantidos por nossos parentes mais próximos, os primatas não humanos (Rico-Hesse, 1990; Vasilakis *et al.*, 2007).

Conforme descrito, os PNH, por manifestarem sinais clínicos para várias viroses zoonóticas e atuam como bons sentinelas. Esses animais são os primeiros a manifestarem os sintomas da doença e atuam como sinalizadores da circulação viral naquele lugar. Dessa forma esses animais são importantes alertas para a vigilância epidemiológica de várias doenças, com destaque para a febre amarela. Nestes animais, alguns vírus, como, por exemplo, alguns arbovírus, se replicam em altas taxas, fazendo também com que atuem como bons amplificadores para várias arboviroses (Barrett e Higgs, 2007). Esses animais são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres coexistentes num dado ambiente. Dentre os fatores que contribuem para esta maior susceptibilidade à infecção por arbovírus, além do tropismo natural dos vírus, se destacam os seus hábitos diurnos e o fato de serem arborícolas (Loehle, 1995). O hábito arborícola facilita o contato com os vetores, uma vez que mosquitos preferem as camadas superiores da floresta onde se abrigam em ocos de árvores (Consoli e Oliveira, 1994).

Os PNHs são classicamente conhecidos por participarem do ciclo epidemiológico da febre amarela. No entanto, estudos recentes apontam também a participação desses animais na cadeia de transmissão de outras viroses. Evidências sorológicas de *Chikungunya virus* já foram detectadas em primatas no oeste da África (Eastwood *et al.*, 2017). Batista e colaboradores (2012) isolaram o vírus *Oropouche* a partir de uma amostra de fígado obtida de um primata do gênero *Callithrix* capturado em Minas Gerais (Batista, 2012). Foram detectadas evidências moleculares e sorológicas de *Apeu virus* em amostras de PNHs pertencentes à Amazônia brasileira (Oliveira *et al.*, 2016). Anticorpos contra *Saint Louis* foram detectados em primatas do Rio Grande do Sul entre os anos de 2002 e 2007 (Almeida, 2008). Outro estudo realizado em 2012 no mesmo estado detectou anticorpos contra o gênero *Flavivirus*, o vírus Mayaro e o Oropouche em PNHs (Batista, 2013).

1.4 FLAVIVIRUS

Os *Flavivirus* são vírus envelopados de forma esférica, tendo simetria icosaédrica com cerca de 60 nm de diâmetro. Eles têm o genoma constituído por RNA fita simples, polaridade positiva e cerca de 11.000 nucleotídeos, codificando aproximadamente 3.400 aminoácidos. O genoma é organizado em uma região 5' não codificadora (UTR) com aproximadamente 100 nucleotídeos, apresentando um "cap", seguida de uma janela aberta de leitura (ORF) e por uma

região terminal não codificadora 3' (UTR) com aproximadamente 450 nucleotídeos, e não possuem a cauda de poliadenilação (Figura 3) (Lindenbach, 2007; Cucunawangsih e Lugito, 2017).

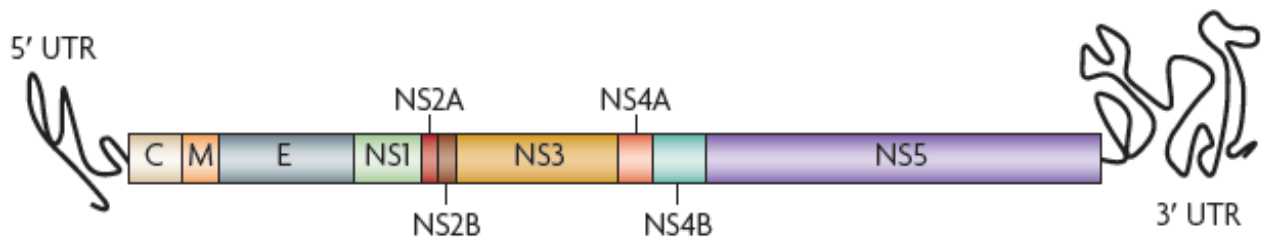


Figura 3 - Representação esquemática da organização gênica dos *Flavivirus*. Uma única janela aberta de leitura codifica três proteínas estruturais (capsídeo-C, membrana-M e glicoproteínas do envelope-E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Fonte:(Guzman *et al.*, 2010).

O genoma desses vírus codificam três proteínas estruturais: C, M (que é expressa como prM, precursora da M) e glicoproteína E; além de sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Lindenbach, 2007; Cucunawangsih e Lugito, 2017). A proteína E é uma glicoproteína de membrana sendo a principal proteína da superfície viral. Esta proteína participa de vários processos importantes como montagem do vírus, ligação ao receptor e fusão de membrana viral, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes. (Melino e Paci, 2007; Cucunawangsih e Lugito, 2017).

A família *Flaviviridae* contém, atualmente, cerca de 70 vírus, sendo a maior parte deles transmitida por artrópodes (Vasconcelos, 2003; Reiter, 2010). O gênero *Flavivirus* faz parte dessa família, com destaque para o *Dengue virus* e o *Yellow fever virus*; o gênero *Hepacivirus*, ao qual pertence o vírus da Hepatite C; os *Pestivirus*, que incluem o agente etiológico da diarreia bovina; e o *Pegivirus*, que infectam primatas e morcegos (ICTV, 2013) (Figura 4).

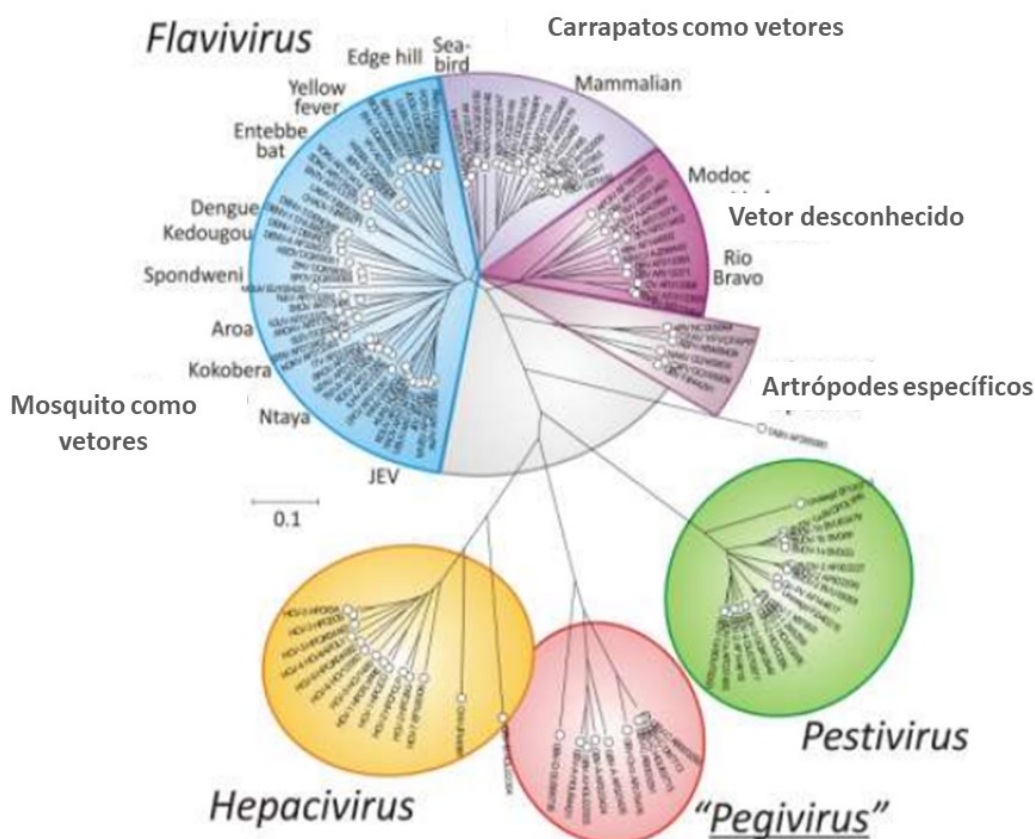


Figura 4 - Filogenia da família *Flaviviridae*. Árvore construída utilizando-se a região conservada da RNA polimerase RNA dependente (NS5). Foi utilizado o método *Neighbor Joining*. O gênero *Pegivirus* mais recentemente proposto encontra-se sublinhado. Fonte: Figura adaptada de <http://www.ictvonline.org/proposals/2012.011a-dV.A.v2.Pegivirus.pdf>.

Os vetores artrópodes, hospedeiros vertebrados e humanos fazem parte do ciclo epidemiológico dos *Flavivirus* (Heinz e Stiasny, 2012; Mota *et al.*, 2016; Mayer *et al.*, 2017; Weaver *et al.*, 2017). A partir do tipo de vetor, eles são classificados em três grandes grupos: o grupo dos vírus transmitidos por carrapatos, como o *Tickborne encephalitis virus* (TBEV); o grupo sem vetor artrópode conhecido como o *Modoc virus*; e o grupo dos vírus transmitidos por mosquitos, como o *Dengue virus* (DENV) eo *Yellow fever virus* (YFV) (Gubler *et al.*, 2007; Lindenbach, 2007).

O gênero *Flavivirus* é considerado o maior dentro da família *Flaviviridae*, sendo composto por 53 espécies de vírus. Os vírus que compõem esse gênero compartilham características comuns quanto à morfologia, aos determinantes antigênicos e à organização genômica (Gubler *et al.*, 2007). Os membros desse gênero podem ser subdivididos em complexos antigênicos, de acordo com critérios sorológicos (inibição de hemaglutinação e teste de neutralização), e em grupos, clados e espécies, com base em estudos filogenéticos. Valores de

similaridades de aminoácidos entre diferentes sorocomplexos variam de 40 a 53%. Já dentro de um mesmo sorocomplexo, os valores de similaridades variam de 62 a 98% (Mukhopadhyay et al., 2005).

1.4.1.1 *Dengue virus*

A dengue é, atualmente, uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas do mundo, representando um sério problema de saúde pública (Guzman *et al.*, 2016; Shepard *et al.*, 2016). Atualmente estima-se que essa doença seja endêmica em 128 países, afetando principalmente países em desenvolvimento, colocando em risco cerca de 3,97 bilhões de pessoas por ano (Brady et al., 2012; Bhatt et al., 2013; Khetarpal e Khanna, 2016).

Esse vírus apresenta quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, sendo a distinção entre eles feita por meio do gene E, que apresenta cerca de 60% a 70% de similaridade entre os sorotipos. Essa diferenciação também pode ser obtida por métodos imunológicos baseados na resposta à proteína E (Klungthong *et al.*, 2008). Dentro de um mesmo sorotipo, a similaridade nucleotídica é de 90% a 96% (Chu et al., 1989; Lewis et al., 1993; Lanciotti et al., 1994; Lanciotti et al., 1997; Goncalvez et al., 2002).

Estudos moleculares evidenciam a existência de grupos bem definidos dentro de cada sorotipo viral, que, baseados na diversidade genética e na distribuição geográfica, são classificados em genótipos (Vasilakis *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2009; Kukreti *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2012). Para o DENV-1 e o DENV-2, são descritos cinco e seis genótipos, respectivamente (Twiddy *et al.*, 2002; Villabona-Arenas e Zanutto, 2013). Para o DENV-3, são descritos cinco genótipos. E o DENV-4 tem sido subdividido em quatro genótipos (Lanciotti *et al.*, 1994; Lanciotti *et al.*, 1997; Araújo *et al.*, 2009; Weaver e Vasilakis, 2009; Villabona-Arenas e Zanutto, 2011).

Os genótipos também podem ser subdivididos em linhagem, cuja segregação é baseada em características genéticas e na distribuição espaço-temporal (Myat Thu *et al.*, 2005; Kukreti *et al.*, 2009; Mendez *et al.*, 2010; Barcelos Figueiredo *et al.*, 2014).

As infecções causadas pelo DENV apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo, atualmente, classificadas em dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (OMS, 2014). A infecção tem início a partir da inoculação viral através da picada de um mosquito infectado com o DENV. Em seguida, ocorre a replicação viral nas células musculares lisas,

estriadas e fibroblastos. Posteriormente, o vírus é disseminado para todo o organismo via corrente sanguínea e linfática, chegando a órgãos como fígado, baço, nódulos linfáticos e medula óssea, podendo atingir o pulmão, o coração e o trato gastrointestinal (Kurane e Ennis, 1992; Guzman *et al.*, 2016). Muitos pacientes também apresentam mialgias decorrentes da multiplicação viral no tecido muscular, e são acometidos, inclusive, músculos oculomotores, o que resulta em cefaleia retro-orbital (Kurane e Ennis, 1992; Guzman *et al.*, 2016; Cucunawangsih e Lugito, 2017).

A doença na forma mais branda é autolimitada, entretanto, a evolução para casos graves, como a dengue hemorrágica e o choque por dengue, ainda permanece incompreendida. Acredita-se que haja um conjunto de fatores envolvidos, dentre os quais podem ser citados os relacionados ao vírus, ao contato anterior com outros sorotipos de DENV que pode levar a uma exacerbação da infecção (*antibody dependent enhancement* – ADE), à existência de linhagens mais virulentas dentro dos sorotipos, à coinfeção por outro sorotipo e a fatores do hospedeiro, como o *status* imune, a idade e fatores genéticos (Kurane e Ennis, 1992; Guzman *et al.*, 2007; Kyle e Harris, 2008; Jiang *et al.*, 2012; Guzman *et al.*, 2016; Culshaw *et al.*, 2017).

1.4.1.1 FATORES ECOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DENV

O *Dengue virus* é mantido em dois ciclos ecologicamente distintos: o ciclo urbano e o ciclo silvestre. O ciclo silvestre envolve a participação de algumas espécies de primatas não humanos do velho mundo, como *Chlorocebus sabaus*, *Papio papio*, *Erythcebus patas*, *macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina* e *Prebytis spp* e mosquitos *Aedes* arbóreos como os *A. luteochcephalus*, *A. furcifer*, *A. niveus spp* (Vasilakis e Weaver, 2017). Até então, a ocorrência desse ciclo tem sido restrita ao Oeste Africano e Malásia.

No ciclo urbano da DENV há a participação dos vetores *A. aegypti*, *A. albopictus* peridomésticos e humanos, que atuam como hospedeiros amplificadores. Esse ciclo é predominantemente descrito em vários países tropicais, incluindo o Brasil. O *Aedes aegypti* está essencialmente adaptado ao ambiente urbano e doméstico sendo o vetor primário do DENV e também de outras arbovirus como *Chikungunya virus* e *Zika virus* em ambientes urbanos. Esse mosquito é uma espécie nativa do continente africano e disseminou se para diversas regiões do planeta, chegando ao Brasil durante o período colonial através do tráfico de escravos. Já o *Aedes albopictus* é considerado o vetor secundário da DENV e originou se no continente asiático de onde se disseminou para regiões temperadas, tropicais e subtropicais do planeta. Esse mosquito é

encontrado com maior frequência em ambientes silvestres como áreas de florestas, mas também em regiões urbanas, peri-urbanas e rurais (Bonizzoni et al., 2013)

Conectando os ciclos silvestres e urbanos há a zona de emergência, caracterizado por um ambiente rural, onde o vírus circulante em um ambiente silvestre entra em contato com populações humanas de forma acidental. Há relatos de ocorrência dessa zona na África e sudeste asiático. O vírus também pode ser mantido pela transmissão trans-ovarariana, em algumas espécies de mosquitos (Figura 5) (Mattingly, 1957; Vasilakis *et al.*, 2011; Vasilakis e Weaver, 2017).

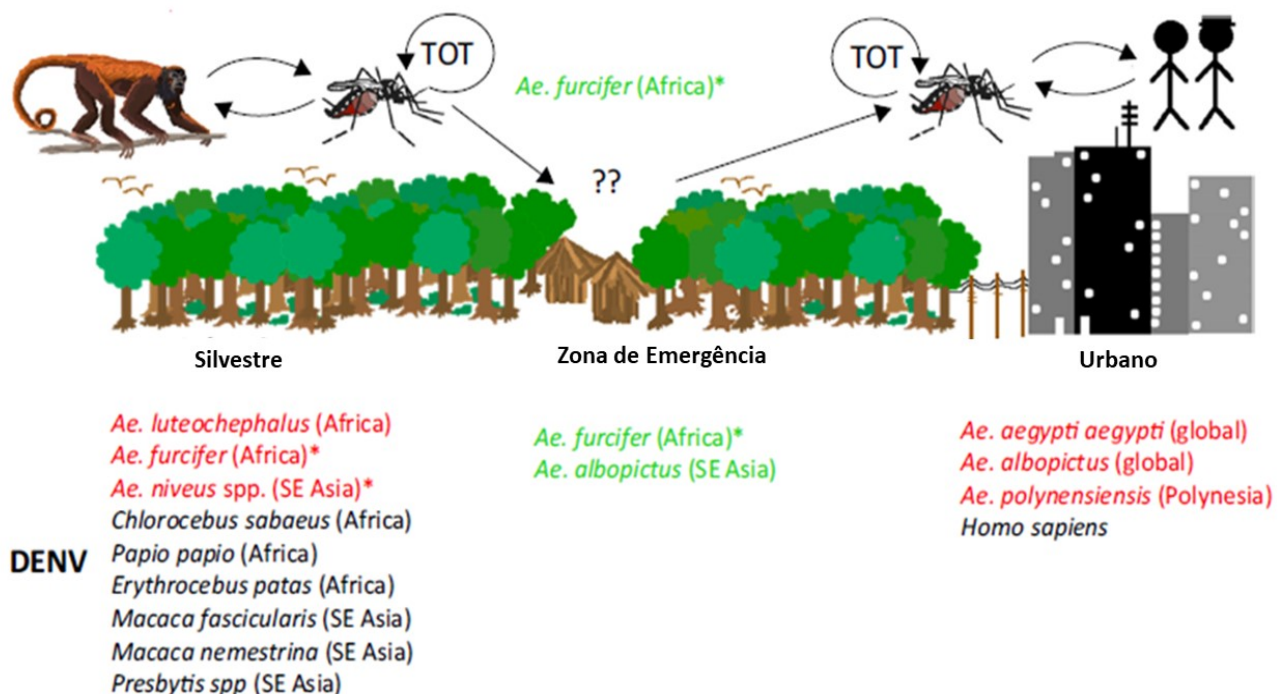


Figura 5 - Ciclo de manutenção do DENV. O vírus é mantido em dois ciclos: o silvestre e o urbano, sendo a zona de emergência a ligação entre esses ciclos. O vírus também pode ser mantido através da transmissão trans-ovarariana (TOT). Fonte: (Vasilakis e Weaver, 2017).

A cadeia epidemiológica do DENV é complexa e depende da interação entre o vetor, o vírus e os hospedeiros, associada a aspectos ecológicos e fatores climáticos (Kyle e Harris, 2008). Em relação ao vetor, a temperatura e a umidade influenciam na longevidade, fecundidade, viabilidade dos ovos, taxa de alimentação sanguínea e tamanho do animal (Rueda *et al.*, 1990; Gubler *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2010). Já o aumento da precipitação favorece a eclosão dos ovos e o desenvolvimento das formas imaturas: larvas e pupas (Stewart Ibarra *et al.*, 2013). Dessa forma, a flutuação sazonal da população de *Aedes* é fortemente influenciada pelas condições

climáticas, o que é condizente com o aumento de casos de dengue nas épocas mais quentes e chuvosas do ano em regiões urbanas (San Martín *et al.*, 2010; Descloux *et al.*, 2012).

O *Aedes* apresenta hábito diurno e possui maior atividade hematofágica ao amanhecer e no crepúsculo vespertino. O mosquito adulto se alimenta de substâncias açucaradas, como frutose, glicose e sacarose, além de sangue, no caso das fêmeas, para a maturação e o desenvolvimento dos ovócitos (Consoli, R. e Oliveira, R., 1994). Após o repasto sanguíneo, as fêmeas realizam a oviposição, mas podem apresentar discordância gonotrófica, ou seja, podem ter necessidade de realizar mais de um repasto sanguíneo para a postura de ovos viáveis. Várias alimentações por ciclo gonotrófico têm grande importância epidemiológica, por favorecer a transmissão de vários patógenos, uma vez que o *A. aegypti* é vetor de muitos arbovírus (Figueiredo, 2007; Guzman *et al.*, 2016).

As fêmeas do vetor, ao realizarem o repasto sanguíneo em indivíduo em pico de viremia, podem se infectar com o DENV. O mosquito infectado permanece nessa condição pelo resto da vida, que tem duração em torno de 42 dias (Trpis, 1986; Harrington *et al.*, 2008). Nesse animal, o vírus se multiplica em diversos órgãos, como no ovário, onde pode ocorrer uma elevada replicação viral, ocasionando a transmissão transovariana. Ao atingir a glândula salivar, o mosquito está apto a infectar o próximo hospedeiro durante a realização de um novo repasto sanguíneo. O período de replicação viral até atingir a glândula salivar é conhecido como o período de incubação extrínseca, e dura de oito a doze dias (Saude, 2009; Guzman *et al.*, 2016). Já o período de incubação intrínseco ocorre no homem e tem duração de três a quinze dias. A viremia humana começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o sexto dia da infecção. É nesse intervalo de tempo que ocorre a transmissão do vírus para o mosquito (Saude, 2009; Guzman *et al.*, 2016). Por causa da alta taxa virêmica, esses vírus são transmitidos de forma eficiente entre humanos e mosquitos sem a necessidade de um hospedeiro amplificador, o que caracteriza o ciclo urbano da doença.

Além de aspectos relacionados ao vetor, outros fatores são importantes e determinantes para a transmissão viral urbana do DENV, tais como os sociodemográficos e a densidade populacional humana, que favorecem o contato entre o vetor e o homem. A existência de imunidade prévia ao vírus também deve ser considerada (Kyle e Harris, 2008; Reiter, 2010; Banu *et al.*, 2011; Padmanabha *et al.*, 2012; Sallam *et al.*, 2017).

O ciclo silvestre do DENV tem sido descrito no oeste da África e na Malásia. Evidências sorológicas dessa circulação em populações não urbanas foram detectadas em indígenas na Bolívia em uma área desprovida de *A. aegypti*, sugerindo a ocorrência de um ciclo silvestre nesta região que envolveria outros vetores que não o *A. aegypti* (Roberts *et al.*, 1984). Apesar da importância desse ciclo, ele parece ter sido desconectado do ciclo urbano, mas essa ideia parece ser prematura à luz da escassez de mais informações sobre a ocorrência de ciclos silvestres fora do continente africano e algumas regiões da Ásia, o que ressalta a relevância de estudos para a sua compreensão (Vasilakis *et al.*, 2011).

Thoisy e colaboradores (2009) analisaram amostras de soro e fígado de roedores coletadas durante os anos de 2001 a 2007, período endêmico e inter-epidêmico de dengue na Guiana Francesa. Por meio de ferramentas moleculares, foi observada a presença de DENV em 33 dos 146 animais analisados. Foram detectados os DENV 1,2,3 e 4, sendo que a proporção dos sorotipos foi de 41%, 20%, 33% e 6%, respectivamente. As análises das seqüências da região CprM demonstraram que os DENV 1,2,3 e 4 detectados nesses animais tinham, respectivamente: 92,6%, 89%, 95% e 95,8% de identidade com as amostras circulantes na população humana durante os mesmos períodos. Nesse estudo também foram analisadas amostras de quirópteros e marsupiais. Dos animais positivos para o DENV, 4% eram quirópteros, 5% roedores e 7% marsupiais. Dessa forma, os autores especulam a possibilidade de alguns mamíferos atuarem como hospedeiros terminais ou desempenharem um papel na manutenção viral durante períodos inter-epidêmicos (De Thoisy *et al.*, 2009).

Um estudo recente prospectou flavivirus em roedores peridomésticos na região de Merida, México. Através de prospecção por soroneutralização, demonstrou-se que 3,4% (3/86) dos *mus musculus* e 2,6% (2/75) de *Rattus rattus* foram positivos para DENV-2 (Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016). Esses dados reforçam a circulação de DENV em roedores.

1.4.1.1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A dengue está se tornando um problema de saúde global. Observa-se um aumento na incidência da doença, assim como a expansão geográfica do vetor, que aumentou mais de trinta vezes nas últimas décadas (Messina *et al.*, 2014; Guzman e Harris, 2015; Guzman *et al.*, 2016). A maioria dos casos está concentrada, principalmente, em regiões hiperendêmicas, onde há a

circulação de múltiplos sorotipos virais (Suaya *et al.*, 2009; Gubler, 2012; WHO 2012; Murray *et al.*, 2013; Shepard *et al.*, 2013; Cucunawangsih e Lugito, 2017).

A primeira pandemia de dengue teve início na Ásia e no Pacífico durante ou após a Segunda Guerra Mundial (Gubler *et al.*, 2007). Todos os cinco continentes sofrem com surtos dessa doença e, atualmente, o vírus é considerado endêmico na África, nas Américas, no leste do Mediterrâneo, no sudeste Asiático e no oeste do Pacífico (Braga e Valle, 2007; Barcellos e Lowe, 2014). A distribuição geográfica viral envolve principalmente os países tropicais e subtropicais (Braga e Valle, 2007; Guzman *et al.*, 2016; Cucunawangsih e Lugito, 2017).

O continente americano convive com a dengue há mais de 200 anos. Nas décadas de 1950 e 1960, a maioria dos países das Américas Central e do Sul conseguiu erradicar o *A.aegypti*, porém, a diminuição nos esforços para manter essa erradicação, associada a fatores sociais, culminaram no ressurgimento da doença no final do século XX (Lindenbach, 2007). O programa de erradicação do vetor terminou no início da década de 1970 e, no final da década de 1990, o mosquito já infestava novamente vários locais, causando um aumento no número de epidemias nos anos de 1980 a 1990 (Rigau-Pérez *et al.*, 1998).

A primeira epidemia confirmada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982 em Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4 (Osanai *et al.*, 1983). Em 1986-1987, foram notificados casos de DENV-1 nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Alagoas, Ceará, Pernambuco e Bahia, dando início a uma intensa dispersão viral por todas as regiões brasileiras (Schatzmayr *et al.*, 1986; Figueiredo *et al.*, 1990).

Entre 1990 e 2002, foram notificados casos de DENV-1 em diversas localidades do território brasileiro (Vasconcelos *et al.*, 1995; Dos Santos *et al.*, 2002; Feres *et al.*, 2006). Em 1990-1991, ocorreu a primeira notificação do DENV-2 no Brasil, no estado do Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 1991). Já em 2001 o DENV-3 foi detectado e se dispersou rapidamente para outras partes do território nacional (Nogueira *et al.*, 1991; Feres *et al.*, 2006; De Araújo *et al.*, 2012).

Entre 2007 e 2009 o DENV-2 foi o responsável por várias epidemias em diversos locais do Brasil (Oliveira *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2010). Entretanto, já em 2008 foi observada a co-circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 em todo o país (Saúde, 2014). Também em 2008 foi feita a detecção do DENV-4, inicialmente, em Manaus e, posteriormente, se dispersando para outros estados brasileiros (Figueiredo *et al.*, 2008; De Souza *et al.*, 2011; Temporal *et al.*, 2011).

Na última grande epidemia nacional de dengue, em 2013, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação dos quatro sorotipos, sendo registrado o maior número de casos notificados da doença na história do país. Nesse período, o DENV- 4 foi o mais prevalente, seguido pelo DENV-1, sendo a maioria dos casos notificados em Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Espírito Santo (Saúde, 2014).

Em 2015 e 2016 o Brasil apresentou casos expressivos de dengue, com mais de 1.600.00 casos em 2015. Durante esse período DENV-1 o foi o sorotipo predominante no Brasil. Já em 2017 e 2018 o Brasil registou cerca de 200.00 casos anuais, sendo o DENV 2 o mais prevalente.

Atualmente, o Brasil caracteriza-se por uma ampla distribuição do DENV, com uma constante circulação viral no país, fato que destaca a importância da elucidação de mais aspectos sobre a cadeia de transmissão viral (Saúde, 2017a).

1.4.1.2 *Yellow fever virus*

Yellow fever virus (YFV) é o agente etiológico da febre amarela, uma doença infecciosa aguda, febril, hemorrágica e não contagiosa, que, desde o século XVII, dizima populações na América do Sul e na África (Ortiz-Martínez, 2017; Ortiz-Martínez *et al.*, 2017). A febre amarela apresenta uma notificação compulsória e, como tal, todos os casos suspeitos devem ser imediatamente notificados às autoridades sanitárias local, estadual ou nacional, as quais repassarão a informação a nível internacional (OMS; Brasil, 2008; OMS, 2017; Saúde., 2017).

Fazem parte do ciclo epidemiológico do YFV os PNHs e os mosquitos, que atuam como vetores. Os humanos participam de forma acidental na cadeia de transmissão viral (Vasilakis e Weaver, 2017). No homem, após a inoculação viral decorrente da picada do vetor, o vírus atinge os linfonodos regionais. Nos linfonodos, o vírus infecta, preferencialmente, os macrófagos e as células linfoides, realizando o ciclo de multiplicação. Posteriormente, as partículas virais são liberadas pelas células linfoides, iniciado, assim, o período de viremia, e, por essa mesma via, ele atinge o fígado (Monath e Barrett, 2003).O período virêmico coincide com o início do período prodrômico, em particular, com a febre, e constitui a fase em que o sangue humano pode se tornar infectante para os vetores (Monath, 2001).

O período de incubação viral é de três a seis dias, podendo se estender por até 15 dias (Johansson *et al.*, 2010). O período de infecção dura cerca de três dias, sendo essa etapa caracterizada por sintomas inespecíficos, como febre, calafrios e cefaleia. Em seguida, há a fase de remissão, caracterizada pelo declínio dos sintomas e pela sensação de melhora do indivíduo acometido. Alguns indivíduos podem desenvolver a forma mais grave da doença, dando início, então, ao período toxêmico, caracterizado por febre, diarreia e vômitos com aspecto de borra de café. Há também a insuficiência hepatorenal, caracterizada, principalmente, por icterícia e outras complicações, que associadas, podem resultarem óbito (Brasil, 2016).

Há sete genótipos do YFV, sendo que cinco circulam na África e dois na América do Sul (Figura 6) (Chang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Mutebi *et al.*, 2001; Bryant e Barrett, 2003; Stock *et al.*, 2013; Jorge *et al.*, 2017). Dentre os genótipos, a variação nucleotídica é maior ou igual a 9% (Chang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Mutebi *et al.*, 2001). Já a divergência de aminoácidos entre eles é de, no máximo, 7,6% (Von Lindern *et al.*, 2006). Inferências filogenéticas a partir de diferentes regiões genômicas fornecem resultados similares, sugerindo uma taxa evolutiva constante ao longo do genoma (Lepiniec *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Mutebi *et al.*, 2001; Mutebi *et al.*, 2004; Bryant *et al.*, 2007; Auguste *et al.*, 2010).

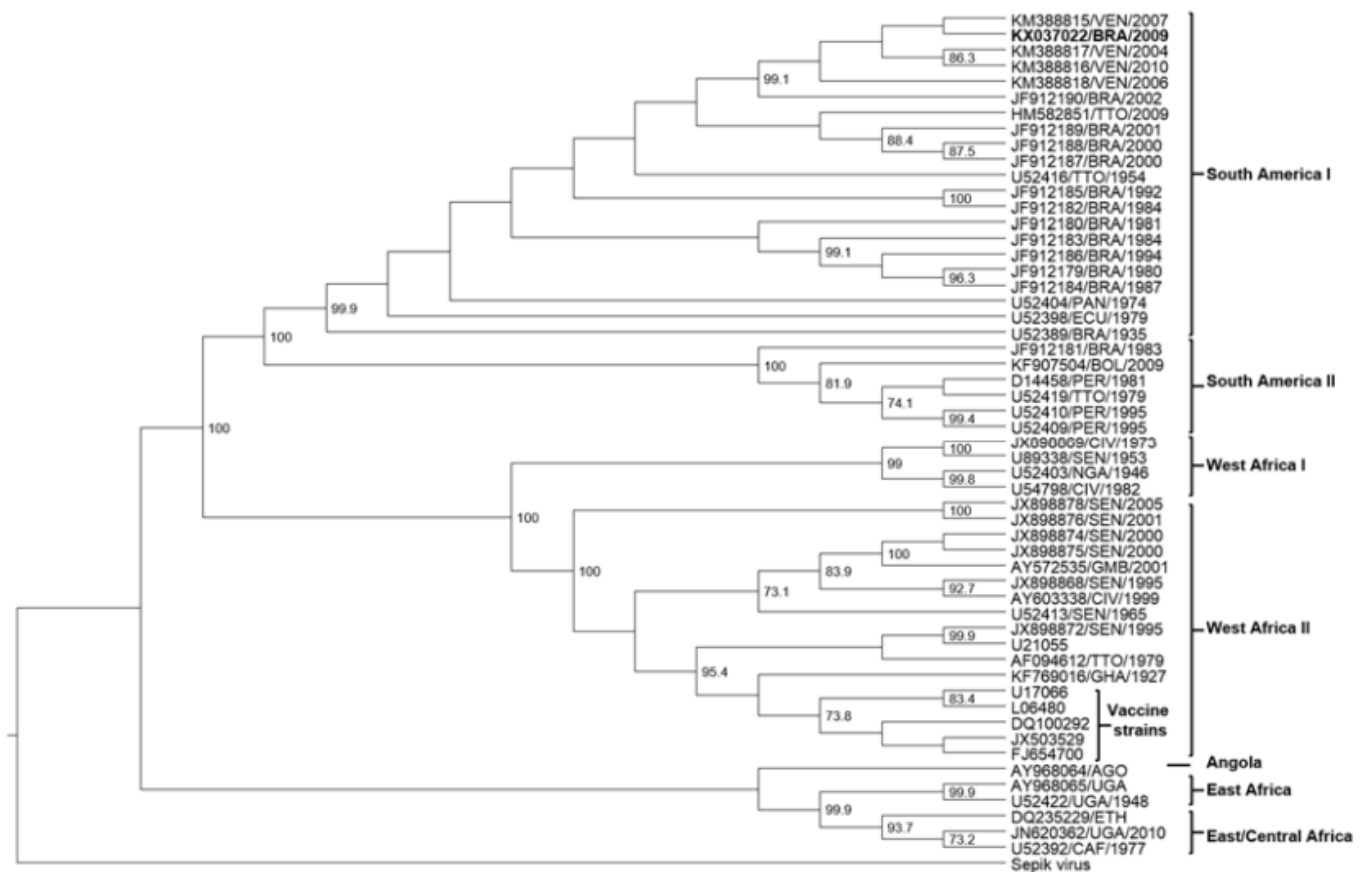


Figura 6 - Árvore filogenética representativa dos genótipos virais do YFV. Filogenia construída a partir de seqüências de 861 nucleotídios da região C/prM, usando o modelo de *maximum likelihood algorithm*. Fonte: Jorge *et al.*, 2017.

Uma característica notória do YFV é a marcante distribuição espacial dos genótipos. Estudos demonstram que vírus de regiões diferentes e não relacionadas epidemiologicamente são geneticamente distintos (Figura 7) (Deubel *et al.*, 1986; Lepiniec *et al.*, 1994). Análises filogenéticas separam as amostras do oeste africano de outros clados, contendo seqüências mais divergentes das partes leste e central africanas. Esse padrão sugere que o YFV teve sua origem na África Oriental ou Central, onde surgiram os genótipos Angola, Leste/África Central e África Oriental, e, posteriormente, se espalhou para a África Ocidental, dando origem aos genótipos I e II da África Ocidental (Chang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Mutebi *et al.*, 2001).

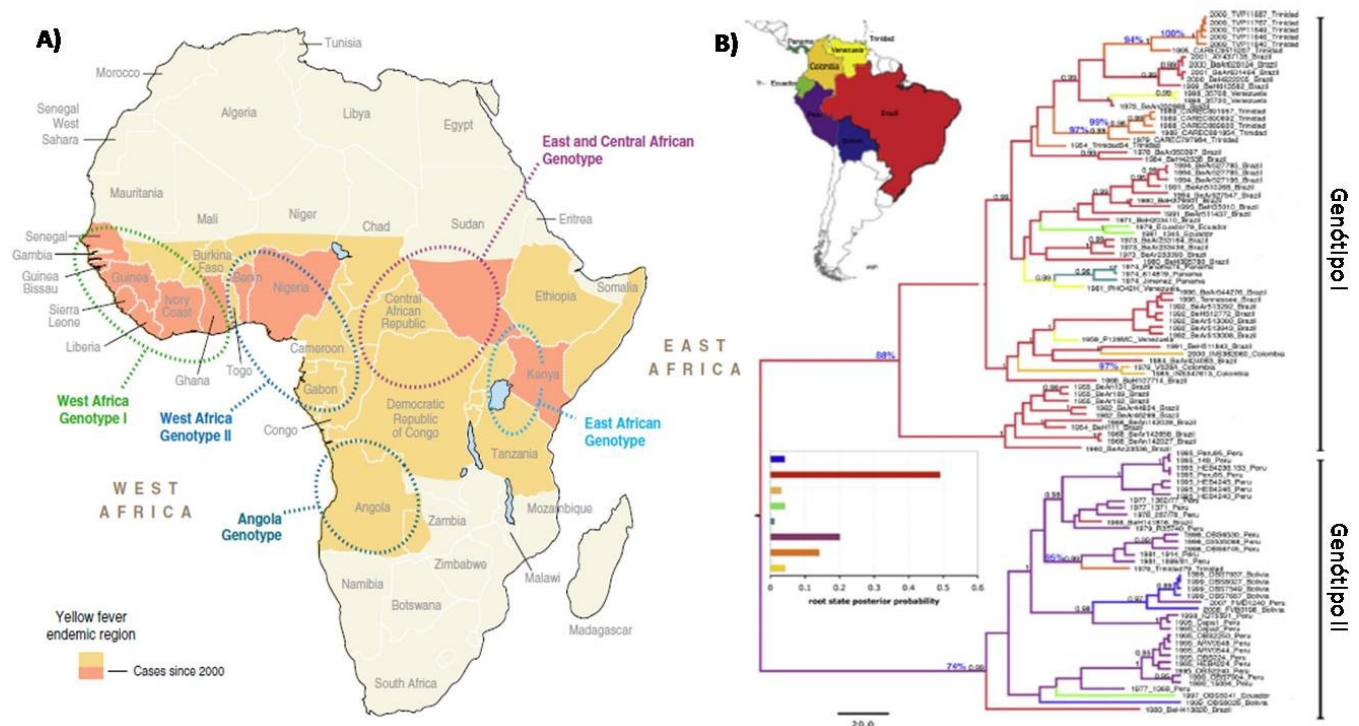


Figura 7 - Distribuição espacial dos genótipos virais de YFV. Distribuição dos genótipos africanos (A) e dos circulantes na América do Sul (B). Fonte: Figuras adaptadas de Barrett e Higgs (2007) e de Carrington e Auguste (2013).

Os genótipos circulantes na América do Sul têm origem monofilética, tendo surgido de um ancestral comum compartilhado da África Ocidental durante o tráfico negreiro (Chang *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Hoje, o YFV nas Américas existe como dois genótipos geograficamente definidos: o genótipo I, que circula, principalmente, no Brasil e nos países que se encontram mais ao norte da América do Sul -Trinidad, Venezuela, Equador, Panamá e Colômbia (Nunes *et al.*, 2012; Auguste *et al.*, 2015); e o genótipo II, que é detectado, principalmente, nos países andinos, mais ao leste do continente sul-americano – Peru e Bolívia –, sendo, também detectado no Brasil, Equador e Trinidad (Bryant e Barrett, 2003; Auguste *et al.*, 2010).

1.4.1.2.1 FATORES ECOLÓGICOS ASSOCIADOS AO YFV

Fatores ecológicos associados à febre amarela, tais como as características dos reservatórios, vetores e hospedeiros, bem como as alterações ecológicas, são importantes para se compreender a origem dos surtos e a dinâmica de dispersão viral (Hamrick *et al.*, 2017).

Existem três padrões epidemiológicos distintos de transmissão desse vírus: o ciclo silvestre, o ciclo de savana ou intermediário e o ciclo urbano (Figura 8) (Monath, 2001; Barrett e

Higgs, 2007; Vasilakis e Weaver, 2017). Entre eles não existem diferenças dos pontos de vista etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico tendo a doença as mesmas características. As únicas diferenças referem-se aos elementos que compõem o ciclo de manutenção, ou seja, o tipo de hospedeiro e espécies de vetores envolvidos (Brasil, 2005; Vasilakis e Weaver, 2017).

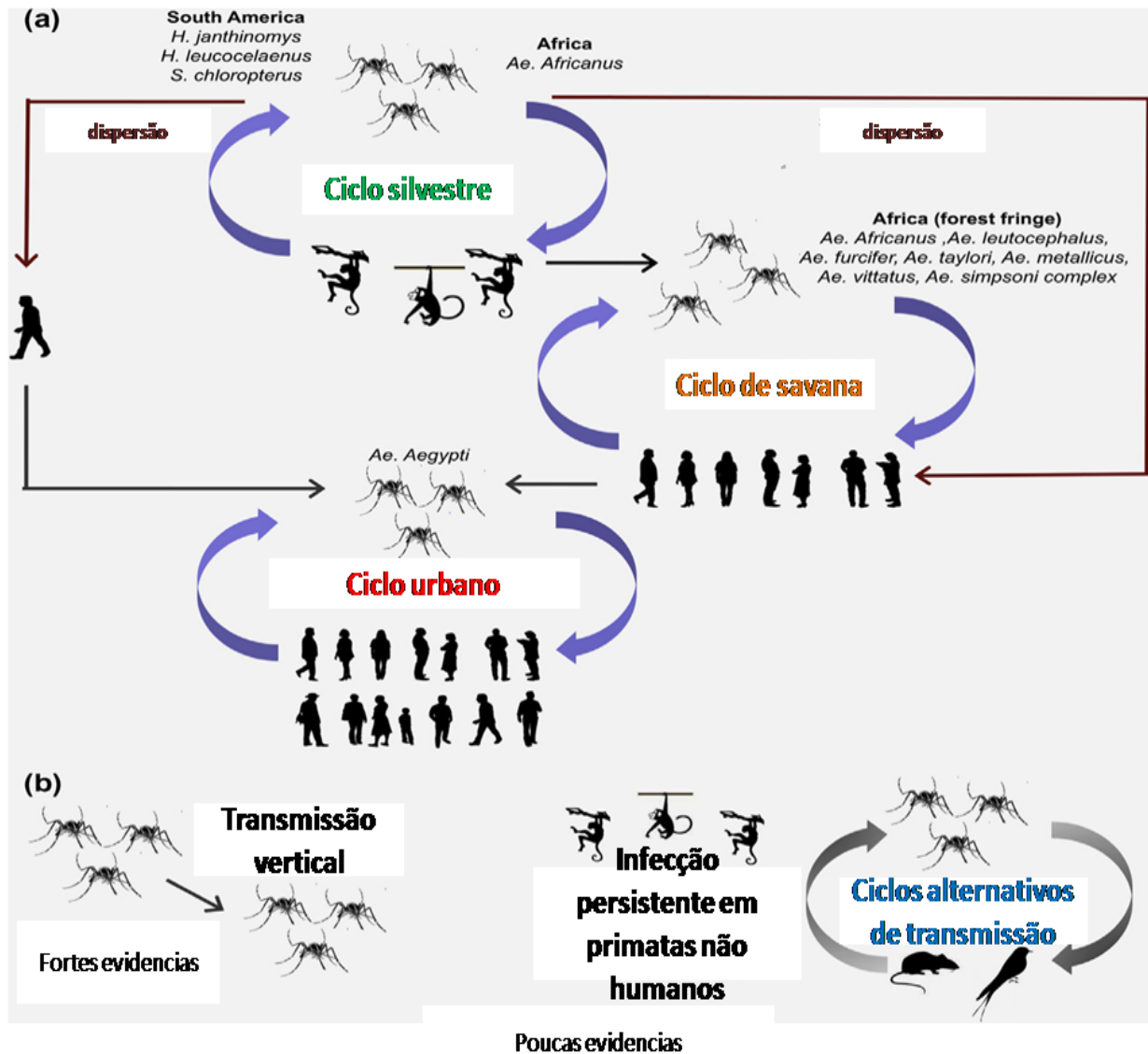


Figura 8 - Ciclos epidemiológicos do YFV. O YFV é mantido primariamente no ciclo silvestre, no qual participam primatas não humanos e mosquitos (*Haemagogus spp.* e *Sabethes chloropterus* na América do Sul e *Ae. africanus* na África) (a). A dispersão do vírus pode ocorrer quando pessoas não vacinadas entram em contato com mosquitos do ciclo silvestre infectados. Se essa pessoa, em fase virêmica, for picada por *Aedes aegypti*, pode desencadear o início de um ciclo urbano viral. Na África existe um terceiro ciclo, o ciclo de savana, que é mantido por *Aedes* e humanos. Há também fortes evidências que sugerem a manutenção viral através da transmissão vertical (transovariana) em mosquitos. Poucas evidências sugerem a manutenção do YFV através da infecção persistente em PNH e através de um ciclo alternativo, com a participação de mosquitos, roedores e aves. (Figura adaptada de Carrington *et al.*, 2013).

O ciclo de Savana é restrito às savanas da África, onde o vírus circula esporadicamente entre humanos e diversas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, que podem transmitir o vírus de PNH infectados para humanos que residem em regiões de savana úmida nas margens de florestas, também referidas como zonas de emergência (Monath, 2001; Barrett e Higgs, 2007; Brasil, 2016). Os surtos resultantes desse ciclo, geralmente, ocorrem de maneira mais localizada e em pequena escala (Carrington e Auguste, 2013).

O ciclo urbano envolve a transmissão do YFV entre os seres humanos e os vetores urbanos infectados, com destaque para o *Aedes aegypti* (Vasilakis e Weaver, 2017). Essa transmissão é sustentada pelo fato de o vírus ser capaz de causar viremia com altos títulos em humanos, associada à capacidade viral de infecção e disseminação no vetor, fazendo com que o vírus possa ser transmitido através da saliva do mosquito (Barrett e Higgs, 2007). Dentre os três ciclos, o urbano reveste-se da maior importância epidemiológica, pelo elevado potencial de disseminação (Cavalcante e Tauil, 2017; Couto-Lima *et al.*, 2017).

O último surto urbano reportado de febre amarela no Brasil ocorreu na região amazônica, precisamente no Acre em 1942 (Franco, 1969). Desde então, todos os surtos descritos no Brasil são relacionados ao ciclo silvestre da doença.

O ciclo silvestre é caracterizado pela participação dos primatas não humanos como principais hospedeiros e amplificadores virais. O homem participa como um hospedeiro acidental ao entrar em contato com o ambiente de mata. Esse ciclo é mantido entre os primatas não humanos e os mosquitos com hábitos silvestres. Na América Latina, os mais importantes são os pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (Monath, 2001; Vasilakis e Weaver, 2017). No Brasil, as espécies *Haemagogus janthinomys* e *H. leucocelaenus* também participam desse ciclo. Outras espécies, como o *Haemagogus albomaculatus*, o *Sabethes glaucodaemon*, o *Sabethes chloropterus*, o *Sabethes cyaneus* e o *Sabethes operi*, já foram descritas naturalmente infectadas com YFV e, possivelmente, participam de forma secundária na transmissão viral. Há relatos de YFV em *Aedes serratus*, *Aedes scapularis* e *Psorophora ferox*, mas ainda não se sabe a importância dessas espécies no ciclo epidemiológico da doença (Brasil, 2016). A transmissão viral transovariana em *Aedes* já foi demonstrada, mas a importância dessa rota de transmissão na manutenção do ciclo silvestre do YFV é desconhecida (Beaty *et al.*, 1980; Barrett e Higgs, 2007).

De maneira geral, o processo e a dinâmica da infecção e da multiplicação do YFV no vetor são similares aos que ocorrem na maioria dos vírus transmitidos por mosquitos (Hardy *et al.*,

1983; Kramer e Ebel, 2003). A relação vírus-vetor consiste em várias etapas, sendo que, primeiro, o mosquito deve alimentar-se de um hospedeiro com uma taxa de viremia suficiente para que o vírus atinja o intestino médio do mosquito, onde ocorre a multiplicação viral. Em seguida, o vírus deve se disseminar até a hemocele, infectar as glândulas salivares e ser secretado pela saliva durante o repasto sanguíneo. Essas etapas podem ser influenciadas por fatores vetoriais, virais e ambientais (Barrett e Higgs, 2007; Johansson *et al.*, 2010).

A forma como o vírus é mantido entre os surtos ainda permanece não compreendida. Algumas possibilidades são levantadas: 1) infecção persistente em primatas; 2) transmissão transovariana e 3) existência de um ciclo alternativo envolvendo outros mamíferos (De Thoisy *et al.*, 2004; Carrington e Auguste, 2013).

A infecção persistente é considerada pouco provável, quando consideramos os ciclos ocorrendo nas Américas, uma vez que a maioria dos primatas do Novo Mundo infectados morrem, embora haja relatos de desenvolvimento de resposta imune efetiva contra o vírus (Barrett e Monath, 2003 ; Lima *et al.*, 2010). Laboratorialmente, a infecção persistente já foi relatada em níveis viremicos baixos, sendo provavelmente, insuficientes para infecção dos vetores (Penna e Bittencourt, 1943). A transmissão viral transovariana em *Aedes* também já foi demonstrada, mas a importância dessa rota de transmissão na manutenção do ciclo silvestre do YFV é ainda desconhecida (Beaty *et al.*, 1980; Barrett e Higgs, 2007). Existem evidências de que outros animais possam agir como hospedeiros durante ou após grandes epizootias que esgotem a população sítima suscetível.

Reforçam a existência de um ciclo alternativo de transmissão o isolamento do vírus a partir de morcegos (Andral *et al.*, 1968). O vírus também já foi detectado em um marsupial, *Metachirus nudicaudatus*, onde foi capaz de desencadear níveis virêmicos suficientes para infectar mosquitos *Haemogogus* (Bates e Roca-Garcia, 1946). Em adição, anticorpos contra YFV já foram detectados em várias ordens de mamíferos, com destaque para os roedores (Tabela 2).

Tabela 2 - Detecção de YFV em diversas ordens de mamíferos

Ordem	Espécie	Teste	Referência
Artiodactila	<i>Tayassu tajacu</i>	PRNT	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004)
Carnivora	<i>Eira barbara</i>	PRNT	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004)
Marsupial	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	teste laboratorial	(Bates e Roca-Garcia, 1946)
quirópteros	-----	isolamento	(Andral <i>et al.</i> , 1968)
Rodentia	<i>Coendou spp.</i>	PRNT	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004)
Rodentia	<i>Dasyprocta leporina</i>	PRNT	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004)
Xenarthra	<i>Choloepus didactylus</i>	PRNT	(De Thoisy <i>et al.</i> , 2004)

Dessa forma, a capacidade do YFV de infectar um amplo espectro de hospedeiros, bem como a capacidade de infectar várias espécies de mosquitos são características que potencialmente contribuem para a manutenção interepidêmica do vírus e também para sua emergência em ambientes antropizados (Monath, 1994; De Thoisy *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2014).

No Brasil, a febre amarela tem caráter sazonal, ocorrendo principalmente entre os meses de dezembro a abril, quando fatores ambientais, como o maior índice pluviométrico e altas temperaturas, propiciam a maior taxa reprodutiva dos vetores (Vasconcelos, Travassos Da Rosa, *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2010; Romano *et al.*, 2011; Hamrick *et al.*, 2017). Os surtos silvestres costumam ocorrer em intervalos cíclicos de cinco a sete anos, decorrentes de epizootias em macacos, nos quais a doença distribui-se periodicamente em intervalos suficientes para o surgimento de novas populações suscetíveis (Brasil, 1999, 2014; Vasconcelos, 2003). Assim, os primatas não humanos têm um papel fundamental no controle da febre amarela por atuarem como sentinelas, tendo uma função sinalizadora de riscos da circulação viral em uma dada região (Costa *et al.*, 2011).

Existe uma grande lacuna no que diz respeito ao entendimento da evolução clínica da infecção em PNH nas Américas, no entanto, estudos mais antigos relatam que a viremia dura cerca de três a quatro dias, com a morte podendo ocorrer entre três a sete dias. Os sintomas mais comuns são: febre, icterícia, apatia, desidratação, anorexia, hemorragia bucal e intestinal, insuficiência hepática e renal, degeneração gordurosa do fígado com necrose extensa e acúmulo de lipídios (Brasil, 2005). Um estudo recente analisou alterações histopatológicas de PNHs oriundos do último surto ocorrido no Brasil e demonstrou a presença de necrose, corpos apoptóticos, esteatose e pouca inflamação celular, similar ao que ocorre classicamente em humanos (Fernandes *et al.*, 2017). No entanto, é plausível considerar que os PNHs do Novo Mundo possam apresentar cursos clínicos distintos para a infecção pelo YFV visto que Thoisy e colaboradores detectaram uma soroprevalência de 18% de anticorpos neutralizantes anti-YFV em primatas não humanos

capturados na Guiana Francesa entre os anos de 94-95 mesmo na ausência de sinais clínicos compatíveis com a doença (De Thoisy *et al.*, 2004).

No continente africano, esses animais parecem ser mais resistentes ao vírus, já que, apesar de desenvolverem a doença, raramente morrem (Vasconcelos, 2003). Por outro lado, todos os gêneros de macacos do Novo Mundo são susceptíveis ao YFV e podem, portanto, atuar como hospedeiros. Isso é justificado, basicamente, por serem arborícolas e habitarem o mesmo extrato arbóreo que o mosquito vetor. Os gêneros que mais têm sido associados à ocorrência de epizootias no Brasil são *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix* (Brasil, 2005; Moreno *et al.*, 2013). Esses animais se distribuem por todos os biomas brasileiros, concentrando se principalmente na Amazônia e Mata Atlântica (Figura 9).

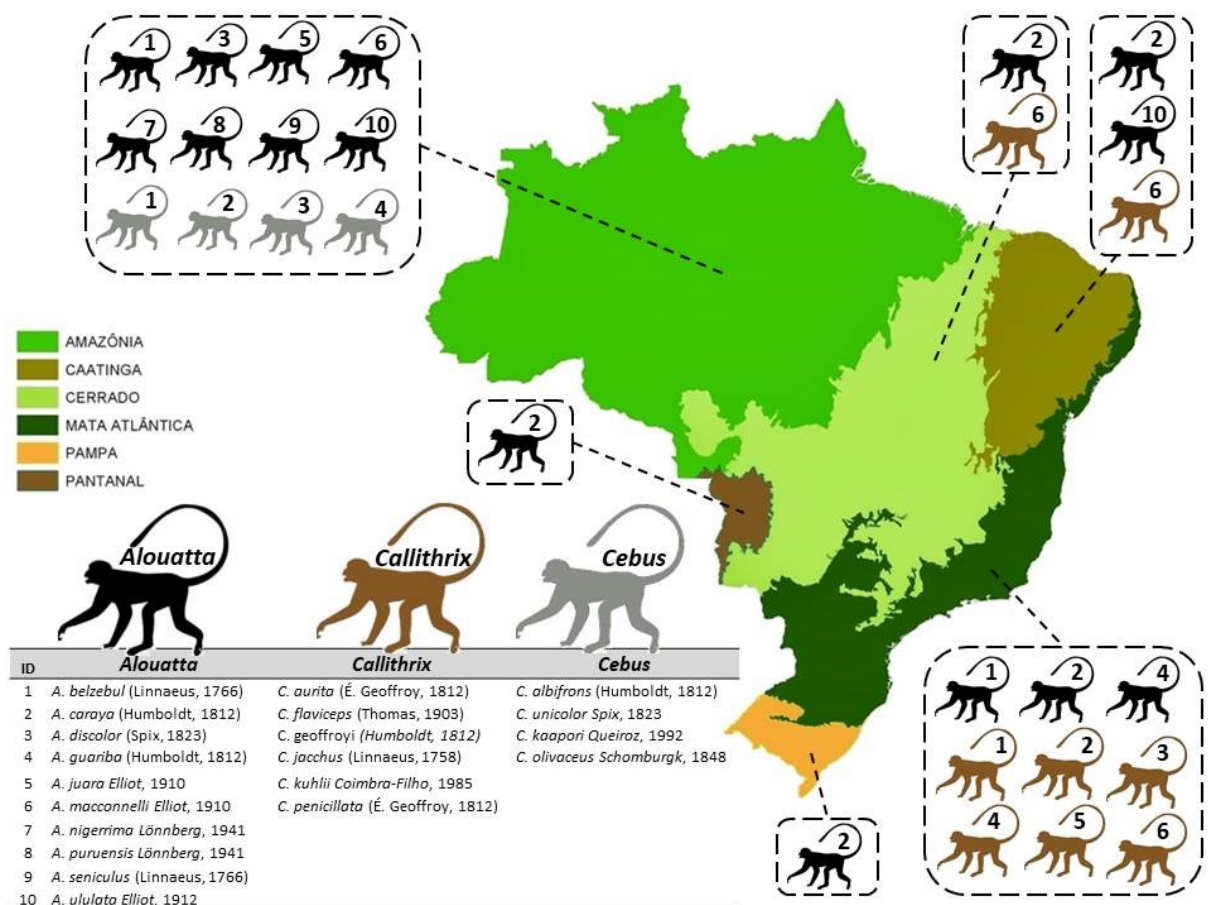


Figura 9- Distribuição geográfica das espécies de PNH mais relacionadas a febre amarela no Brasil. Mapa de biomas do Brasil mostrando a distribuição geográfica dos gêneros *Alouatta* (pretos), *Callithrix* (marrom) e *Cebus* (cinza). O número acima de cada animal corresponde à espécie descrita na tabela. Fonte: produzido pela autora com dados baseando em Paglia., 2012.

A resposta à infecção viral varia de acordo com a espécie, mas, geralmente, os primatas não humanos desenvolvem a doença com alta mortalidade, principalmente as espécies do gênero

Alouatta. A circulação epizootica do vírus pode representar, inclusive, uma preocupação em relação à conservação da espécie (Holzmann *et al.*, 2010; De Almeida *et al.*, 2012).

No Brasil, populações de *Alouattas* têm sido afetadas pela febre amarela. Relatos desse impacto em outras espécies neotropicais são escassos (Marques e Freitas, 2010). Sabe-se que os macacos guigós (*Callicebus personatus* e *C. Geoffroy*) são espécies vulneráveis à doença, mas eles são considerados mais resistentes do que as espécies do gênero *Alouatta* (Brasil, 2005). Os primatas do gênero *Cebus* parecem ser mais resistentes, visto que anticorpos neutralizantes já foram detectados em indivíduos que sobreviveram à infecção (Lima *et al.*, 2010).

A maioria das espécies de PNHs da região sudeste do Brasil tem um deslocamento diário restrito e, geralmente, não usam o solo e áreas desmatadas para migrar de um local para outro, assim é pouco provável que esses animais carreguem o vírus por longas distâncias (Jung *et al.*, 2015). Por outro lado, mosquitos infectados e humanos podem dispersar o vírus por grandes distâncias (Causey *et al.*, 1950; Vasconcelos, 2010; Mir *et al.*, 2017). Os *Haemagogus* podem se deslocar por 5 a 11 quilômetros em poucos dias, já o *Sabethes* tem um vôo geralmente restrito a florestas e arredores próximos (Causey *et al.*, 1950; Pinheiro *et al.*, 1981; Forattini, 2002). Dessa forma, a rápida dispersão viral do YFV no surto de 2016-2018 pode ser mais bem atribuída ao deslocamento de seres humanos e mosquitos infectados e uma reduzida contribuição dos PNHs .

1.4.1.2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Segundo a Organização Mundial da Saúde, atualmente, 47 países – sendo 34 da África e 13 das Américas Central e do Sul – são endêmicos ou têm regiões endêmicas para a febre amarela. Um estudo baseado em dados do continente africano estimou que, durante o ano de 2013, ocorreram de 84.000 a 170.000 casos graves e de 29.000 a 60.000 óbitos causados pela doença (WHO, 2016).

Em regiões africanas com circulação persistente de YFV, as populações mais susceptíveis são crianças e bebês, por não terem adquirido imunidade contra o vírus (Gershman e Staples, 2017). Os surtos mais recentes na África ocorreram em Angola e tiveram início em dezembro de 2015, com duração até julho de 2016, com mais de 2.420 casos suspeitos e aproximadamente 300 mortes (Ahmed e Memish, 2017). Por meio de viajantes infectados, o YFV também se disseminou para a República Democrática do Congo, para o Kenya e para a Mauritania. Há indícios de que, em Angola e no Congo, ocorreu a forma de transmissão urbana do vírus (Barrett, 2016; Chan,

2016; Green, 2016). Devido à magnitude desses surtos o YFV foi colocado na lista das principais ameaças de arbovirus pelo observatório de doenças globais do *Centers for Disease Control and Prevention* (Christian *et al.*, 2017).

Ao contrário do que ocorre na África, no Brasil, devido ao calendário de imunização infantil, a febre amarela ocorre de forma mais frequente em jovens e adultos que não foram imunizados e que têm contato com áreas rurais e de mata, como lenhadores, seringueiros, vaqueiros, garimpeiros, caçadores, indígenas e ribeirinhos. Mais de 80% dos casos acometem indivíduos do sexo masculino, na faixa etária entre 14 e 55 anos. Essa predisposição deve à maior exposição, não à maior susceptibilidade ao vírus (Vasconcelos, Costa, *et al.*, 2001; Vasconcelos, 2003; Gershman e Staples, 2017; Saúde, 2017, Saúde 2018).

A taxa de mortalidade da febre amarela no Brasil é de 5% a 10% dos casos. As formas graves, caracterizadas por febre e icterícia, estão entre 10% e 20%. As formas leves e moderadas, caracterizadas por febre e cefaleia, estão entre 20% e 30% dos casos. E de 40% a 65% dos casos são assintomáticos (Vasconcelos, 2003). A doença é observada com maior frequência nos meses de janeiro a abril, quando há elevados índices pluviométricos e de densidade vetorial, associados ao período de grande atividade agrícola no país (Vasconcelos, 2003; Brasil, 2005; Hamrick *et al.*, 2017, Saúde., 2018 a e b).

Desde 1942, todos os surtos de febre amarela ocorridos no Brasil são de origem silvestre (Brasil, 2005; Jentes *et al.*, 2011). De 1970 a 1999, foram relatados 706 casos no país, o que corresponde a 16% das notificações na América Latina, o que fez do Brasil o terceiro país como maior número de casos durante esse período nessa região (Vasconcelos, 2002). Até 1999, os focos endêmicos estavam situados nos estados das regiões Norte e Centro-Oeste, bem como a área pré-amazônica do Maranhão, além de casos esporádicos em Minas Gerais (Vasconcelos, Costa, *et al.*, 2001). Já em 2008 houve a dispersão viral para as regiões Leste e Sul do país, com a detecção em áreas ainda não notificadas naquela época (Brasil, 2009).

Entre 2001 e 2006, ocorreram 120 casos e 59 óbitos no Brasil, com maior número de ocorrências em 2003 (64 casos). Grande parte das notificações – 88% (n=120) – ocorreram entre março e dezembro, sendo Minas Gerais o estado com o maior número de casos e óbitos. No primeiro trimestre de 2001, foram confirmados 27 casos na região centro-oeste mineira. Em 2003, houve 54 notificações nas regiões de Diamantina e Serro (Pessanha., 2009).

O YFV voltou a emergir no Brasil em 2014 na região Centro-Oeste. Posteriormente, foi observada a dispersão da transmissão nos sentidos sul e sudeste do país, quando afetou o estado de Minas Gerais, com registro de cinco epizootias em primatas não humanos. Entre julho de 2014 e dezembro de 2016, um novo episódio de reemergência do vírus da febre amarela na região extra-amazônica, foi confirmado um total de 15 casos humanos, sendo nove em Goiás, dois no Pará, um no Mato Grosso do Sul, dois em São Paulo e um no Amazonas. Durante esse período, foram confirmados 49 epizootias em primatas não humanos, sendo 16 em São Paulo, 12 em Goiás, oito no Distrito Federal, sete no Tocantins, cinco em Minas Gerais e um no Pará (Gráfico 1) (Saúde., 2017).

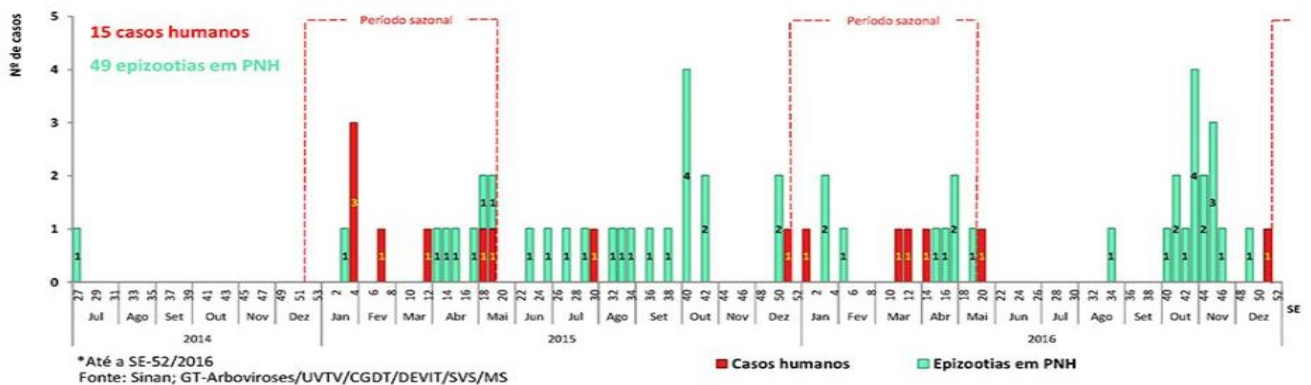


Gráfico 1- Correlação de casos humanos e epizootias de YFV no Brasil entre julho de 2014 e dezembro de 2016. Fonte: Saúde (2017c).

A última epidemia no Brasil teve início em dezembro de 2016 e até Outubro de 2018 foram confirmados 1.376 casos de febre amarela (Saúde., 2018b). Minas Gerais foi o epicentro dos casos, com cerca de 60% deles, seguido de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. De acordo com o provável sítio de infecção, os casos foram relatados em 188 municípios, dos quais 49,4% estão em Minas Gerais, seguido do Espírito Santo (93), São Paulo (quatro) e Rio de Janeiro (dois) (Brasil, 2017d; P.A.H.O, 2017). Além disso, do que se tem registro, 7.064 animais foram afetados (Figura 10) (Brasil, 2017d).

Análises genômicas demonstraram uma única introdução do YFV na região sudeste e uma circulação viral silenciosa antes do início dos surtos em 2016. Análises evolutivas associadas a registros epidemiológicos suportam a ideia de que o vírus circulante no surto de 2016-2018 foi provavelmente introduzido do Centro-Oeste para a região Sudeste. Além disso, houve a

persistência do YFV na região Sudeste, causando epidemias de 2016 a 2018, sugerindo que esta região apresenta condições ecológicas e climáticas adequadas para a manutenção desse vírus durante períodos epidêmicos e interepidêmicos (Rezende et al., 2017).

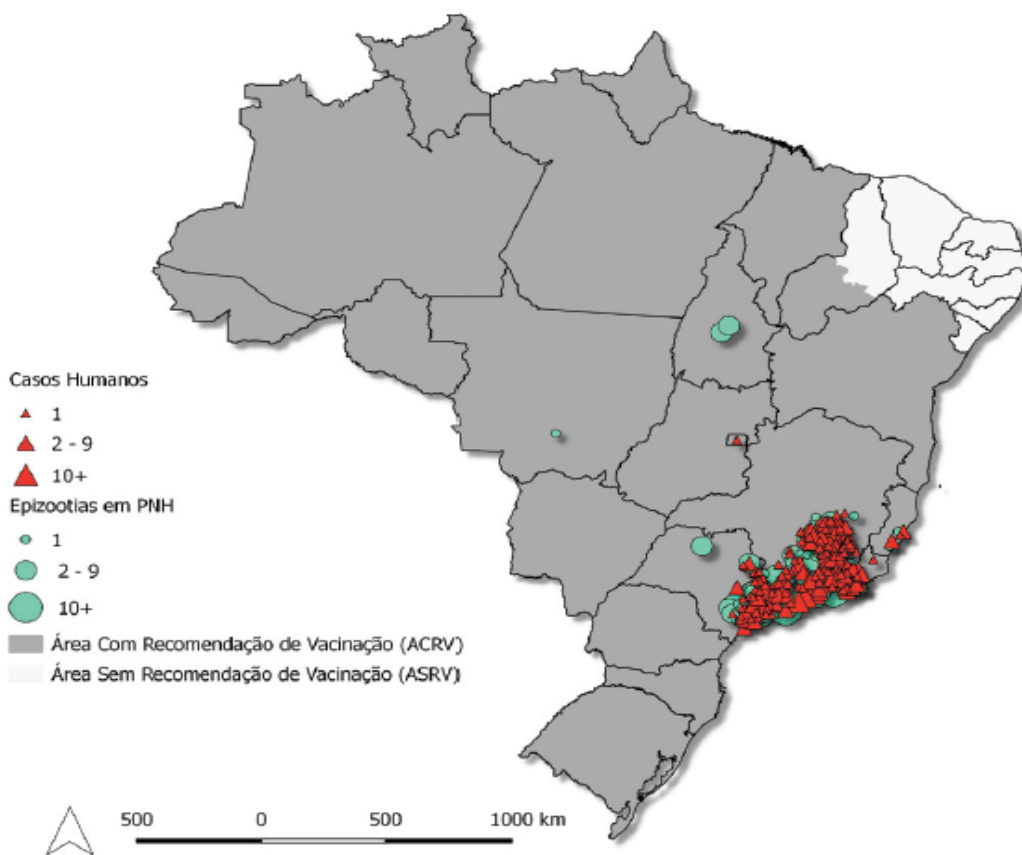


Figura 10 - Distribuição geográfica dos Casos de epizootias e humanos de YFV entre 2016/2018. Fonte:Saúde, 2018b.

Em uma análise histórica, entre 1980 e 2018, foram registrados 3.026 casos humanos de febre amarela (Gráfico 2). Durante esse período, observa-se a irregularidade das ocorrências, marcada por períodos endêmicos, caracterizados por casos isolados em indivíduos não vacinados (geralmente, na região amazônica), intercalados por períodos epizooticos e/ou epidêmicos, quando o vírus afeta principalmente populações de áreas com baixas coberturas vacinais, comumente, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (Saúde, 2018b).

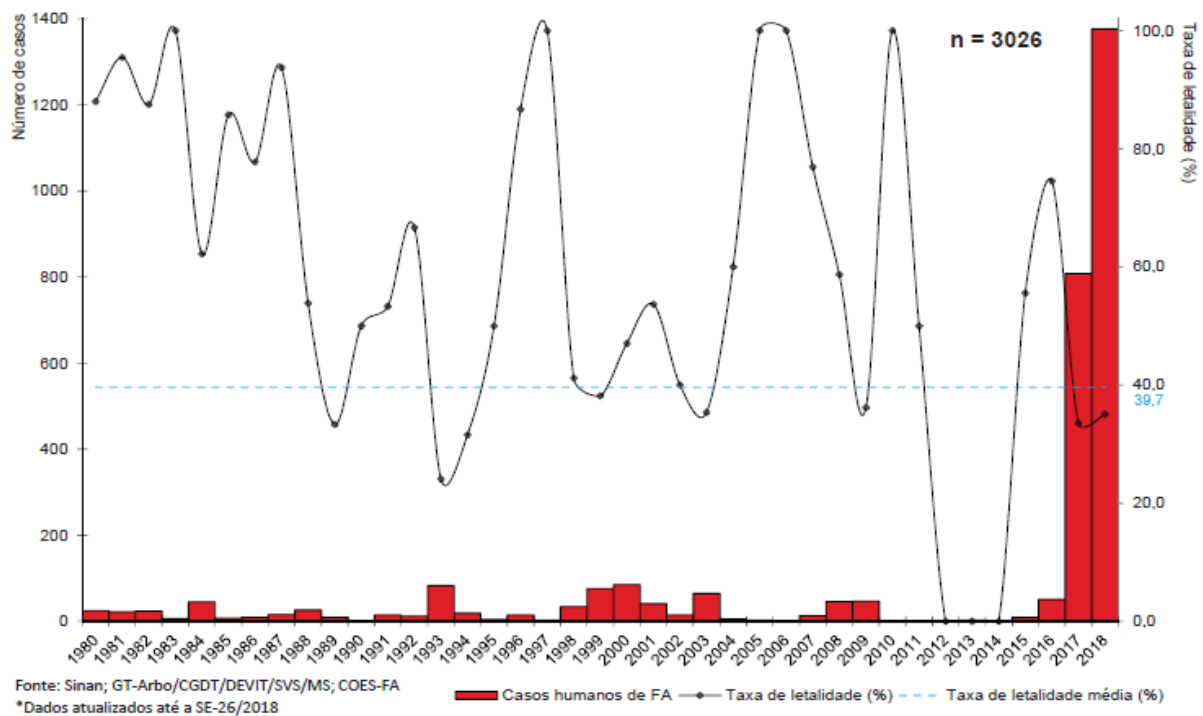


Gráfico 2 - Série histórica de YFV no Brasil. Número de casos humanos confirmados de febre amarela silvestre e a letalidade no Brasil entre 1980 e 2018. Fonte: Saúde, 2018b.

1.4.1.2.3 VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA

A vacina contra a febre amarela é altamente imunogênica e capaz de conferir imunidade em 95% a 99% dos vacinados (Brasil, 2008). Ela é constituída por vírus atenuado e foi desenvolvida por Max Theiler e colaboradores na década de 1930, passando a ser usada a partir de 1937(Garske *et al.*, 2014; Barrett, 2016).

A vacina é produzida em ovos de galinha embrionados e utiliza, basicamente, a mesma tecnologia desde a década de 1940. Existem três subtipos da amostra viral vacinal 17D: 17D-204, 17DD e 17D-213, sendo todas derivadas da amostra Asibi, primeira isolada de um caso clínico, e atenuadas em tecidos de galinha (Barrett, 2017). O subtipo 17D-204 foi derivado a partir de 204 passagens da amostra Asibi; o subtipo 17DD foi derivado após 195 passagens; o subtipo 17D-213 foi derivado do subtipo 17D-204, na passagem 235, pelo Instituto Robert Koch na Alemanha (Barrett, 2017). Os subtipos vacinais apresentam diferenças moleculares e fenotípicas, entretanto, não há evidências de que as diferenças moleculares impliquem em diferenças na imunogenicidade vacinal (Hahn *et al.*, 1987; Dos Santos *et al.*, 1995; Pfister *et al.*, 2005; Roy Chowdhury *et al.*, 2015).

A vacina é um produto liofilizado, reconstituída em dose única de 0,5 ml e administrada por via subcutânea ou intramuscular. Cada dose deve conter pelo menos 1.000 unidades internacionais (UI) e não existe uma quantidade máxima de vírus por dose. Em média, uma dose contém entre 4.000 e 1 milhão de IUs (Barrett, 2017). Embora estudos indicassem que 99% dos adultos vacinados adquirem anticorpos neutralizantes 30 dias após a vacinação, em crianças, essa taxa é menor do que 90%, de modo que doses de reforços eram preconizadas (Belmusto-Worn *et al.*, 2005; Vaccine, 2015). Entretanto, em julho de 2016, a Organização Mundial da Saúde recomendou a eliminação dessa dose reforço, por haver evidências recentes de que apenas uma dose vacinal fornece imunidade por toda a vida (WHO, 2016 b). No Brasil, essa medida entrou em vigor em abril de 2017 (Saúde, M. D., 2017).

A decisão de assumir que uma única dose vacinal de YFV seja suficiente para fornecer uma proteção duradoura e efetiva por toda a vida é polêmica e arriscada, tendo em vista a rápida dispersão viral e curso clínico da doença. Estudos conduzidos por Niedrig *et al.* (1999), demonstraram que pelo menos 25% dos indivíduos que receberam uma única dose vacinal não apresentaram anticorpos neutralizantes após 10 anos, sugerindo que uma dose reforço seja necessária para manter os níveis de proteção contra o vírus. Em adição, estudos recentes conduzidos em populações brasileiras detectaram uma drástica queda de anticorpos neutralizantes em crianças e adultos 4 e 8 anos, respectivamente, após a primeira vacinação (Caldas *et al.*, 2014; Campi *et al.*, 2016).

Apesar de ser considerada segura, a vacina pode induzir efeitos adversos. Os sintomas leves incluem dor local, inflamação, cefaleia de fraca intensidade, mialgia e dor lombar, ocorrendo em cerca de 4% dos vacinados (Brasil, 2008). Dentre os efeitos graves estão o desenvolvimento de doenças neurotrópicas e viscerotrópicas (Brasil, 2016). A doença neurotrópica desenvolve-se devido à neuroinvasão viral, causando um quadro de encefalite grave. Já o quadro viscerotrópico causa uma infecção sistêmica, com taxas de 60% de letalidade (Barrett e Teuwen, 2009). Casos de encefalite têm uma frequência de 1 caso a cada 22 milhões de doses. O desenvolvimento de doença viscerotrópica ocorre com uma frequência menor do que 1 caso a cada 450.000 doses (Brasil, 2008). Análises moleculares evidenciam que os vírus recuperados de pessoas que tiveram efeitos adversos são idênticos aos vírus vacinais correspondentes, sugerindo, assim, que os efeitos graves estão mais relacionados à resposta do indivíduo do que a mutações no vírus vacinal (Hayes, 2010).

Alguns grupos de pessoas têm sido identificados como de maior risco para eventos adversos graves após a vacinação, tais como as portadoras de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, e os idosos com mais de 70 anos que recebem a primeira vacinação. Ademais, a vacinação é indicada para toda a população a partir dos nove meses de idade, sendo indispensável para as pessoas que viajam ou residam em área de risco para a doença (Brasil, 2016).

A cobertura vacinal preconizada para YFV pelo Ministério da saúde é de 95%, entretanto verifica se que essa cobertura é heterogênea no Brasil, até mesmo em áreas de risco (Brasil, 2017c). Em uma tentativa de contenção do último surto de febre amarela, foram distribuídas cerca de 27 milhões de doses vacinais, sendo essa distribuição concentrada, principalmente, nos estados de Minas Gerais (8,5 milhões), Espírito Santo (3,6 milhões), São Paulo (6 milhões), Rio de Janeiro (7,3 milhões) e Bahia (2,2 milhões). Entretanto, mesmo após esses esforços, esses estados ainda não atingiram 95% de cobertura vacinal. Minas Gerais apresenta uma taxa global de 76% de cobertura, o Espírito Santo de 85%, já o Rio de Janeiro, São Paulo e Bahia possuem 31%, 56% e 52%, respectivamente (Brasil, 2017d). A evolução histórica das áreas de vacinação no país é demonstrada na figura a seguir (Figura 11).

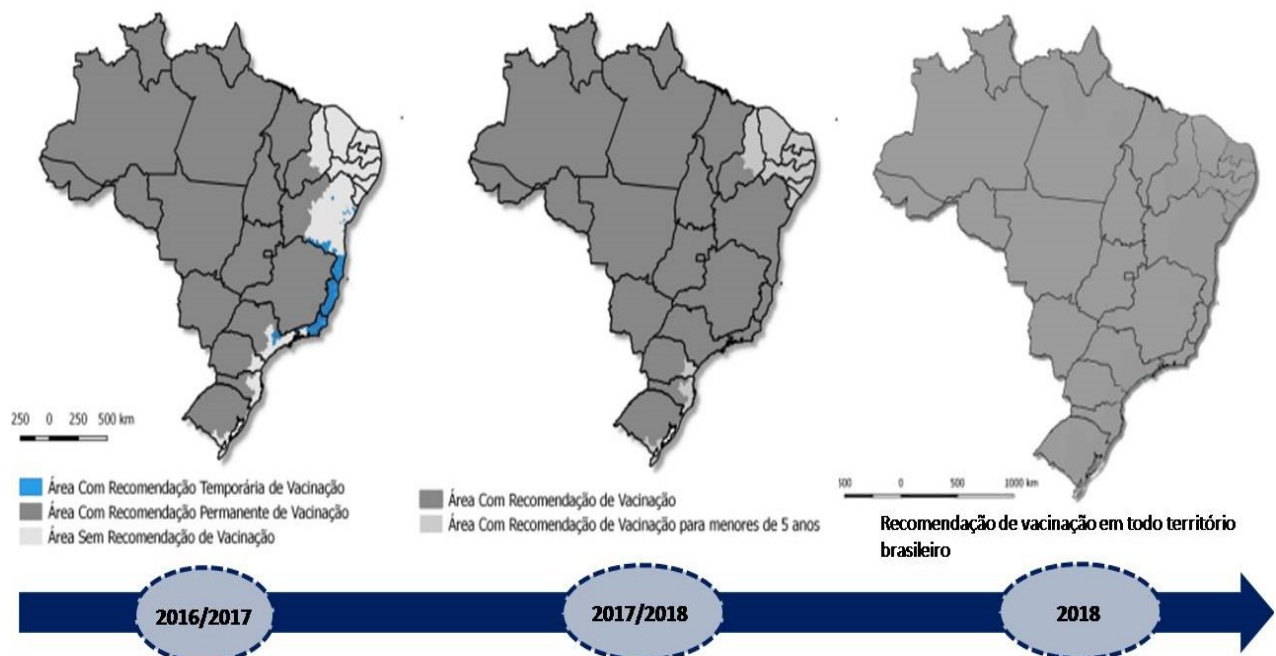


Figura 11 - Áreas brasileiras com recomendação de vacina para YFV. Áreas em cinza escuro indicam áreas com recomendação permanente de vacinação, áreas em cinza claro são áreas sem recomendação de vacina e áreas em azul são as de recomendação temporária de vacinação. Fonte: adaptado de Ministério da Saúde., 2018a.

2.0 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de doenças infecciosas emergentes tem aumentado nos últimos anos, causando grandes impactos, principalmente a nível econômico e de saúde pública. A partir da compilação de dados de surtos anteriores e de análises de predição de risco, é possível estabelecer um padrão de fatores, que, em conjunto, favorecem essas ocorrências.

Em relação à localização geográfica, essas doenças se distribuem de forma desigual no planeta, concentrando-se principalmente em países não desenvolvidos e em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina. Nesses países, também se localizam a maioria das doenças negligenciadas, com uma frequente sobreposição de DIES, tal como ocorre no Brasil.

Os agentes virais figuram como a segunda maior causa das DIES. Destacam-se também as DIES de caráter zoonótico, principalmente as associadas à vida silvestre. Dentre os animais, os mais associados a elas estão os quirópteros, os mosquitos, os primatas e os roedores, que podem atuar como reservatórios ou participantes da cadeia de transmissão viral de muitas doenças que afetam humanos.

Atualmente, as flaviviroses destacam-se por serem responsáveis pelas duas maiores DIES do Brasil: a febre amarela e a dengue, ambas ocorrendo em forma de surtos epidêmicos, sendo a primeira mais associada a áreas rurais e, a segunda, a áreas urbanas e peri-urbanas. O Brasil enfrenta surtos anuais de dengue, com uma incidência de 700 a 1.000 casos por 100.000 habitantes. Além disso, o Brasil é globalmente um dos países com os maiores custos por paciente para o tratamento dessa doença. Em adição, entre os anos de 2016 e 2018, o país vivenciou a maior epidemia nacional de febre amarela, com mais de 1300 casos confirmados e taxa de letalidade de 32%, que é significativamente maior do que a dos surtos anteriores (10-15%). Além dos gastos econômicos e das consideráveis consequências para a saúde pública, a febre amarela é também responsável por dizimar centenas de animais de populações de primatas não humanos, causando impactos significativos e desdobramentos imprevisíveis e incalculáveis para o equilíbrio ecológico.

Apesar de todas as implicações causadas pela DENV e pelo YFV, ainda há lacunas acerca da compreensão do ciclo silvestre desses vírus, o que levanta a possibilidade de outros animais participarem como hospedeiros ou reservatórios na manutenção desses ciclos. Considerando que o Brasil é considerado um dos *hotspots* globais para a emergência de doenças

infecciosas e apresenta uma das maiores biodiversidades de primatas não humanos e roedores, o presente trabalho teve como hipótese a circulação de *Dengue virus* em roedores e primatas não humanos, bem como a circulação de YFV em outros animais além dos primatas, sendo os roedores um grupo dos animais candidatos a isso.

A identificação das espécies que possam atuar como hospedeiros e a caracterização molecular das variantes virais identificadas contribuirão para o mapeamento da distribuição e da biodiversidade desses vírus nas regiões de estudo.

A correlação da vigilância de hospedeiros proposta neste estudo, associada às características ambientais dos respectivos locais de coleta dos animais, permitirão um melhor entendimento da ecoepidemiologia da dengue e da febre amarela, contribuindo para a elucidação de aspectos ainda pouco explorados relacionados à circulação e manutenção dos vírus em ambientes silvestres.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a circulação de *Dengue virus* e *Yellow fever vírus* em primatas não humanos e roedores oriundos de ambientes urbanos, rurais e silvestres obtidos em diferentes regiões do Brasil buscando correlacionar os dados de detecção com aspectos ambientais das áreas coletadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospectação da circulação de DENV e o YFV em coleções de amostras de roedores e primatas não humanos coletados em diferentes regiões do Brasil a partir de abordagens moleculares e sorológicas;
- Estabelecer inferências filogenéticas das amostras positivas para DENV e /ou YFV;
- Fazer a correlação geográfica dos casos de epizootia, casos humanos e cobertura vacinal para YFV em Minas Gerais;

4.0 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

A seguinte estratégia de trabalho foi utilizada (Figura 12):

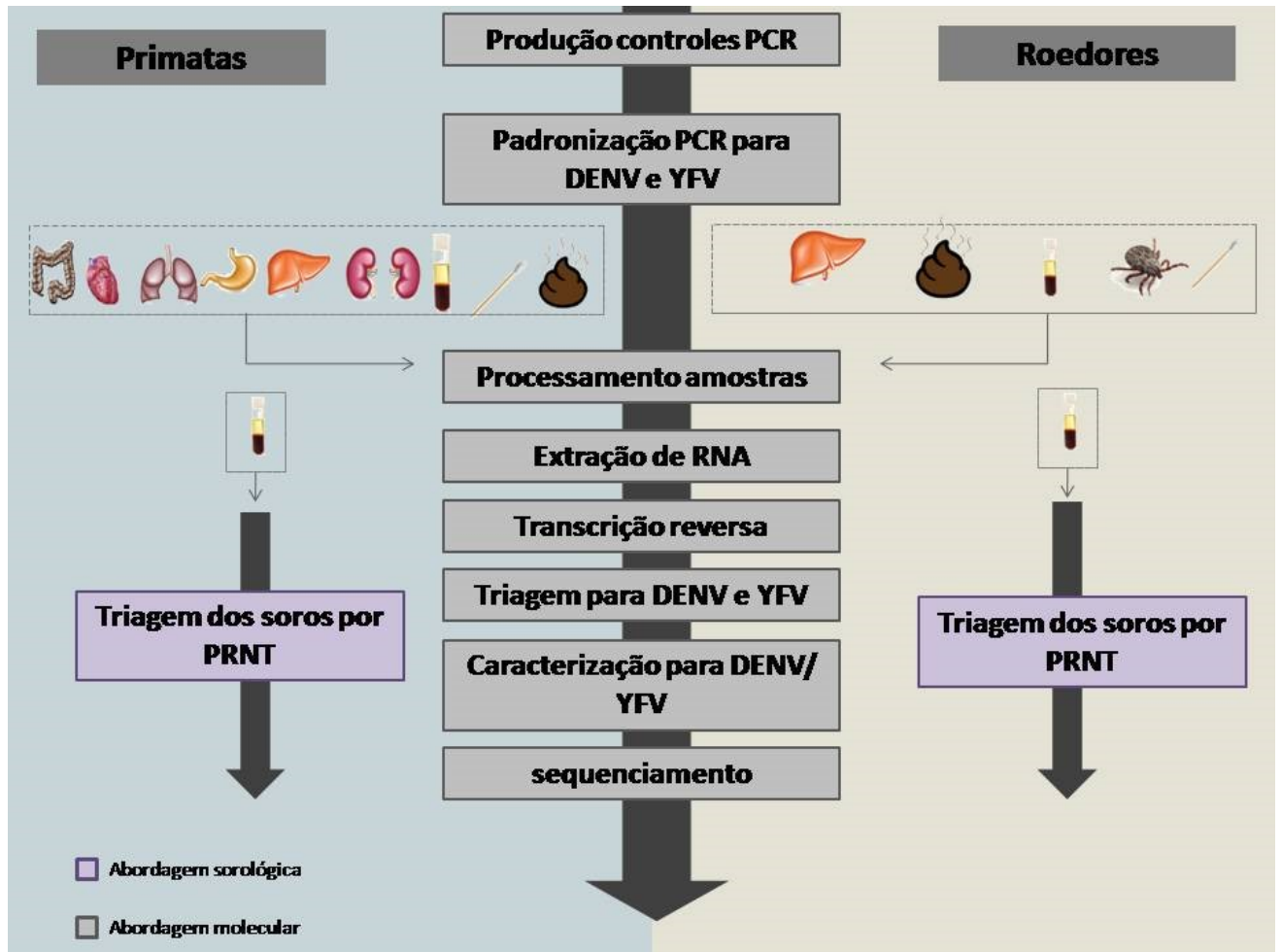


Figura 12– Fluxograma de trabalho.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E ÁREA DE ESTUDO

O banco de dados analisado neste projeto é composto por amostras de primatas e roedores coletadas nos estados de Minas Gerais, Goiás e Tocantins (Tabela 3).

Tabela 3 - Banco de amostras de primatas não humanos e roedores analisados neste projeto.

Ordem	Grupos	Local de coleta	Período de coleta	Gêneros / espécie	Tipos de amostras analisadas	Quantidade	Total
Rodentia	Pequenos roedores	Sabará(MG)	Maio 2011 a Janeiro de 2012	<i>Cerradomys, Necromys, Mus, Cerradomys, Nectomys,</i>	Soro e fígado	121	240
		Serro (MG)	Setembro 2012 a Setembro 2013	<i>Oligoryzomys, Trinomys, Calomys, Oecomys</i>	Soro e fígado	49	
		Contagem(MG)	Novembro de 2011	<i>Mus spp.</i>	Soro e fígado	7	
		Ouro Preto (MG)	Novembro de 2011	<i>Mus spp.</i>	Soro e fígado	7	
		Serra do Caraça (MG)	2016	<i>Akodon, Cerradomys, Necromys, Oligorizomys, Marmosops e Guerlinguetus</i>	Fígado	45	
Rodentia	Capivaras	Belo Horizonte (MG)	Agosto de 2015	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Fezes	1	11
		Goiás	Outubro de 2016	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Soro, sangue, swab anal, swab oral, carrapato e fezes	10	
Primates	Primates não humanos	Região Amazonica-Tocantis	2001-2002	<i>Cebus apella</i>	Soro	50	69
		Conceição do Mato Dentro	Janeiro e Agosto 2017	<i>Callicebus personatus</i>	Coração, baço, pulmão, fígado, rins, bexiga, estômago e intestino	4	
		Conceição do Mato Dentro	Março de 2017	<i>Alouatta guariba</i>	Sangue e coágulo	2	
		Conceição do Mato Dentro	Maio de 2017	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Sangue, coágulo, swab e fezes	5	
		Belo Horizonte (MG)	Fevereiro de 2018	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Fígado, sangue, estômago, pulmão	8	
Total							320

Essas amostras abrangeram tanto ambientes de floresta e urbanos, como ambientes rurais, incluindo as áreas peri-domiciliares de fazendas e de mata (Figura 13).

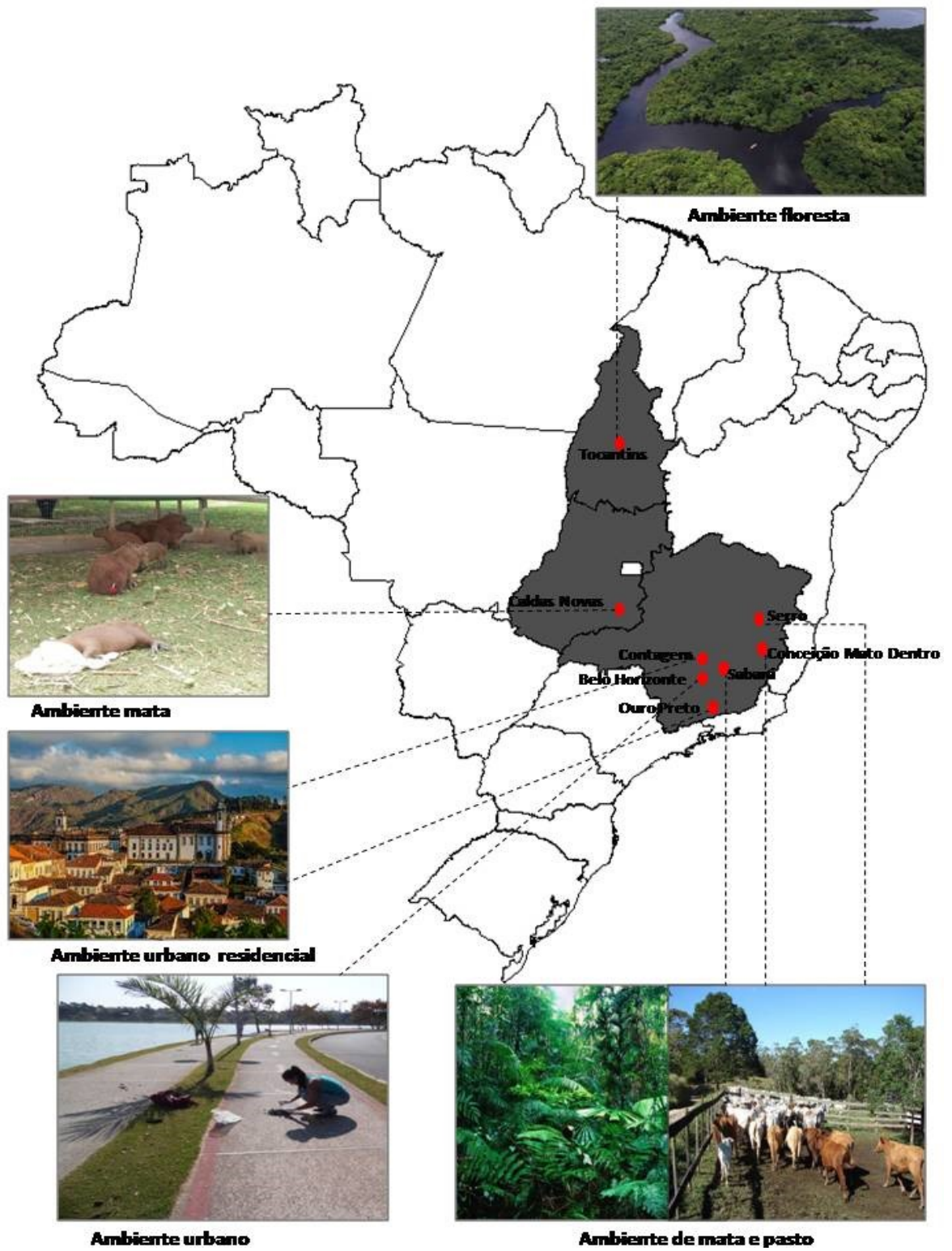


Figura 13- Mapa de localização das amostras utilizadas neste trabalho

Além disso, essa coleção é composta por animais que apresentam diferentes formas de locomoção, dieta e que se distribuem por diferentes biomas brasileiros (tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Características ecológicas dos roedores desta coleção

Coleção de roedores					
Família	Gênero	Locomoção	Dieta	Distribuição nos biomas brasileiros	Referência
<i>Cricetidae</i>	<i>Cerradomys</i>	Terrestre	Frugívoro/ Granívoro	Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal	Paglia., 2012
<i>Cricetidae</i>	<i>Necomys</i>	Terrestre	Frugívoro/onívoro	Amazonia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa	Paglia., 2012
<i>Muridae</i>	<i>Mus</i>	Terrestre	onívoro	Amazonia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa	Schwartz., 1943
<i>Cricetidae</i>	<i>Oligoryzomys</i>	Escansorial	Frugívoro/ Granívoro	Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa	Paglia., 2012
<i>Echimyidae</i>	<i>Trinomys</i>	Terrestre	Frugívoro/ Granívoro	Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga	Paglia., 2012
<i>Cricetidae</i>	<i>Calomys</i>	Terrestre	Frugívoro/ Granívoro	Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa	Paglia., 2012
<i>Cricetidae</i>	<i>Oecomys</i>	Arborícola	Frugívoro/Predador de sementes	Amazonia, Cerrado, Caatinga, Pantanal	Paglia., 2012
<i>Cricetidae</i>	<i>Akodon</i>	Terrestre	Insetívoro/Onívoro	Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa	Paglia., 2012
<i>Sciuridae</i>	<i>Guerlinguetus</i>	Escansorial	Frugívoro/ Granívoro/Onívoro	Amazonia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pampa	Paglia., 2012
<i>Caviidae</i>	<i>Hydrochoerus</i>	Semi-aquático	Herbívoro pastador	Amazonia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Pampa	Paglia., 2012

Tabela 5 - Características ecológicas dos primatas desta coleção

Coleção de Primatas					
Gênero	Espécie	Locomoção	Dieta	Distribuição nos biomas brasileiros	Referência
<i>Sapajus</i>	<i>Cebus/ Sapajus apella</i>	Arborícola	Frugívoro/Onívoro	Amazonia	Paglia., 2012
<i>Callicebus</i>	<i>Callicebus personatus</i>	Arborícola	Frugívoro/Folívoro	Mata Atlântica	Paglia., 2012
<i>Alouatta</i>	<i>Alouatta guariba</i>	Arborícola	Frugívoro/Folívoro	Mata Atlântica	Paglia., 2012
<i>Callithrix</i>	<i>Callithrix geoffroyi</i>	Arborícola	Frugívoro, insetívoro, gomívoro	Mata Atlântica	Paglia., 2012
<i>Leontopithecus</i>	<i>Leontopithecus rosalia</i>	Arborícola	Frugívoro/Insetívoro	Mata Atlântica	Paglia., 2012

4.1.1 AMOSTRAS DE PEQUENOS ROEDORES

O banco de dados de roedores é constituído por amostras de fígado e soros, que são matrizes de prospecção estratégicas pra viroses sistêmicas, como as causadas por DENV e YFV. As amostras de roedores pertencem a coleções do Laboratório de Vírus e foram coletadas pela equipe ECOVIR no Serro, Sabará, Ouro Preto e Região Metropolitana de Belo Horizonte (MG). As capturas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente/SISBIO, licença nº20807–2. Além disso, amostras também foram coletadas na Serra do Caraça (MG).

Uma das áreas de coleta foi o município de Sabará, situado na Região Metropolitana de Belo Horizonte, em um ambiente de transição entre os biomas de Mata Atlântica e de Cerrado, com grande influência antropogênica (Figura 14). Sabará possui aproximadamente 134 mil habitantes e suas principais atividades econômicas são a metalurgia, a extração de minérios e o turismo (Gerais, 2017e; IBGE, 2017). A captura de pequenos mamíferos foi realizada em uma área denominada Unidade Fazendinha (19°53'19.30"S 43°50'18.31"O), onde funcionou uma escola até o ano de 2012. Os arredores da Unidade Fazendinha possuem ocupação humana intensa e, dentro da Unidade, é observada a presença de trilhas, além de perturbação antropogênica, como

caça e presença de animais domésticos. As coletas foram realizadas mensalmente ao longo de 2011 em áreas de mata e pasto. A coleção oriunda do município de Sabará já havia sido previamente testada para a prospecção de DENV, usando os iniciadores descritos por Lanciotte (1992) pela Dra. Tatiana Mingote Ázara. Esta coleção foi retestada neste trabalho com o intuito de analisar o comportamento das reações do protocolo de PCR frente às diferentes amostras de roedores sem prejuízo do gasto de amostras de outras coleções cujos resultados serão exclusivos deste projeto.

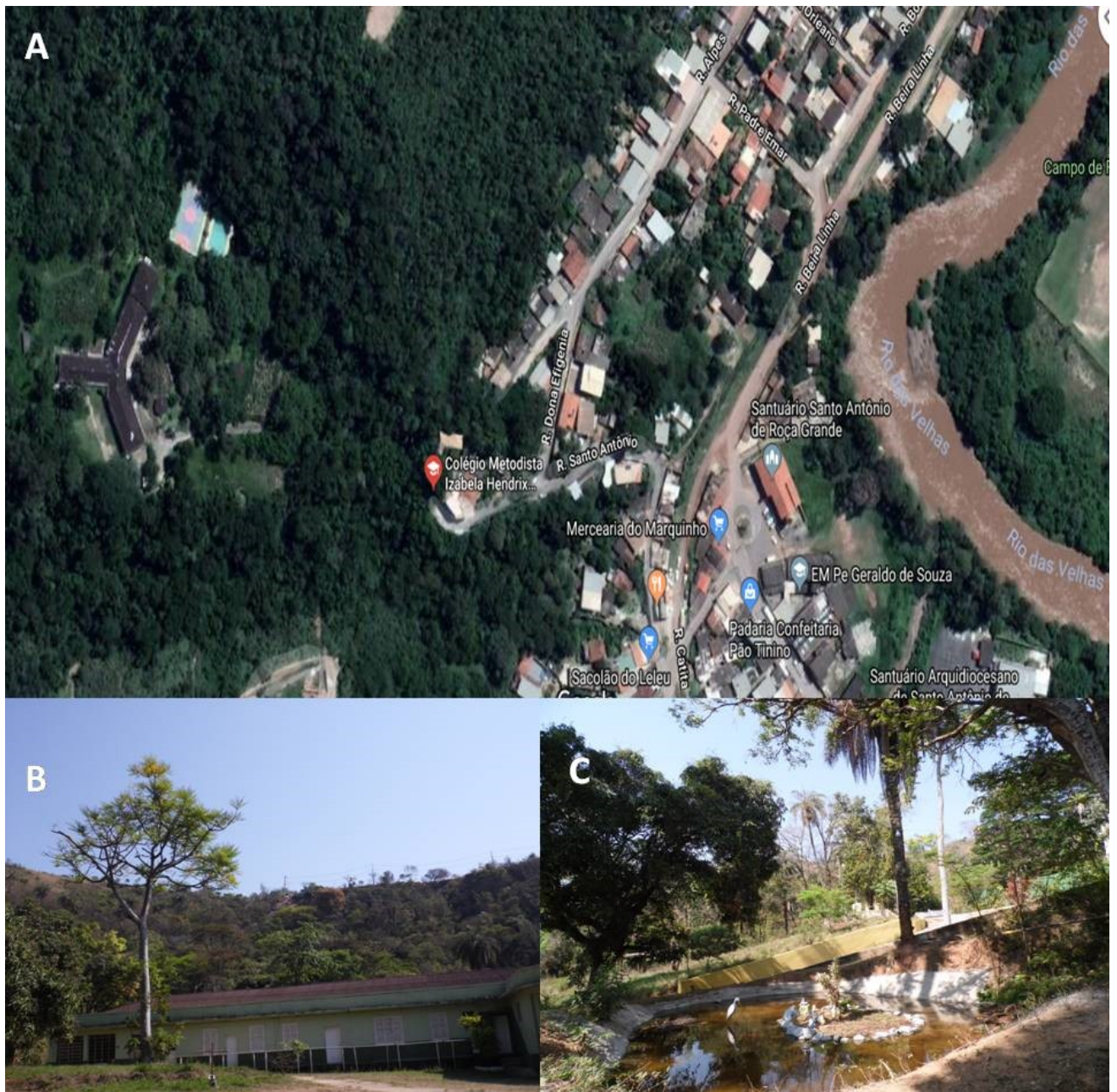


Figura 14 - Vista panorâmica do local de coleta dos pequenos roedores em Sabará. (A) Vista panorâmica indicando o local de coleta das amostras; Fotos do local de coleta (B e C). Fonte: Google maps (2018) e arquivo pessoal.

A cidade do Serro localiza-se no Vale do Jequitinhonha, região central de Minas Gerais, e está inserida em uma área de transição entre a Mata Atlântica e o Cerrado (Gerais, 2017f; IBGE, 2017). A economia da cidade divide-se em agricultura familiar, movimentação financeira gerada por serviços públicos e fabricação e comercialização de queijo (Gerais, 2017f). Como áreas de estudo, foram escolhidas duas fazendas (19°53'15.0"S 43°49'55.9"O 19°53'19.4"S 43°50'18.4"O) que têm como principal atividade a produção de leite para a fabricação de queijo (Figura 15). As duas propriedades apresentavam áreas de mata, pastagem e construções (currais e outras edificações). A coleta foi realizada bimestralmente durante o ano de 2013 em áreas de mata, pasto e nas proximidades do curral.

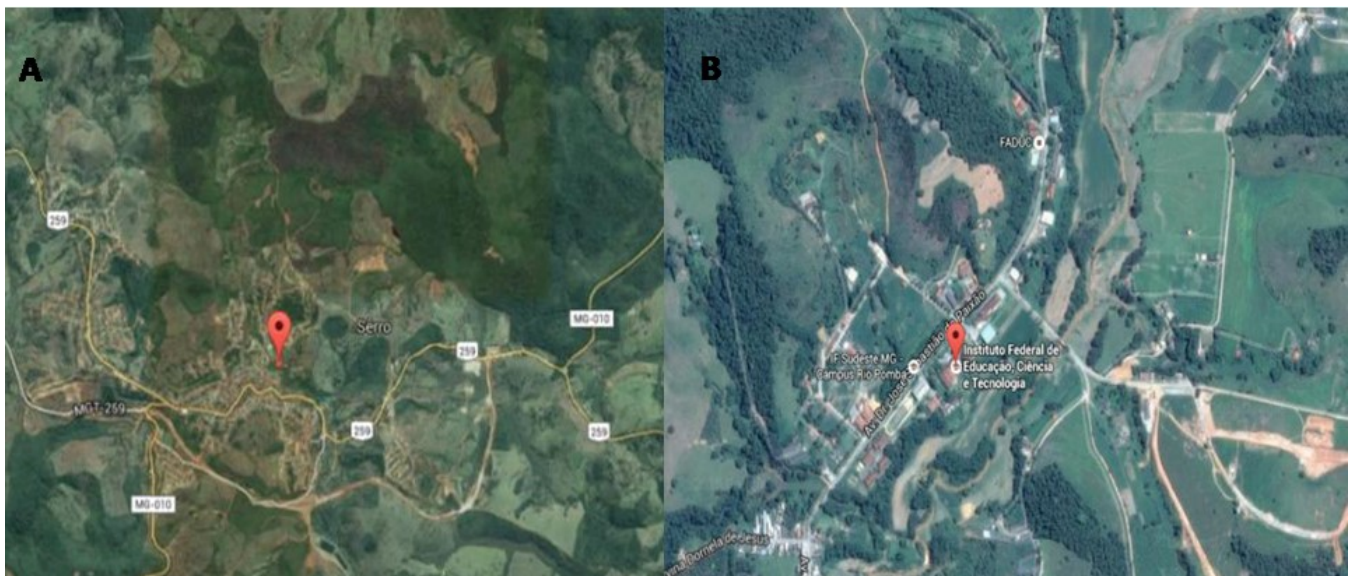


Figura 15 - Vista panorâmica dos locais de coleta das amostras de roedores no Serro. Nas figuras A e B, estão identificadas as duas fazendas onde as amostras foram coletas. Fonte: Google Maps (2017).

Amostras também foram coletadas em Contagem (19°53'15.0"S 43°49'56.1"O), que é parte da área metropolitana de Belo Horizonte (MG) e possui cerca de 650 mil habitantes, destacando-se como polo industrial na região (Figura 16) (Gerais, 2017c; IBGE 2017). Além disso, Contagem tem bioma de transição entre Mata Atlântica e Cerrado, com grande impacto antropogênico (IBGE, 2017). As capturas dos roedores foram realizadas em novembro de 2011 em ambientes que apresentavam acúmulo de lixo.

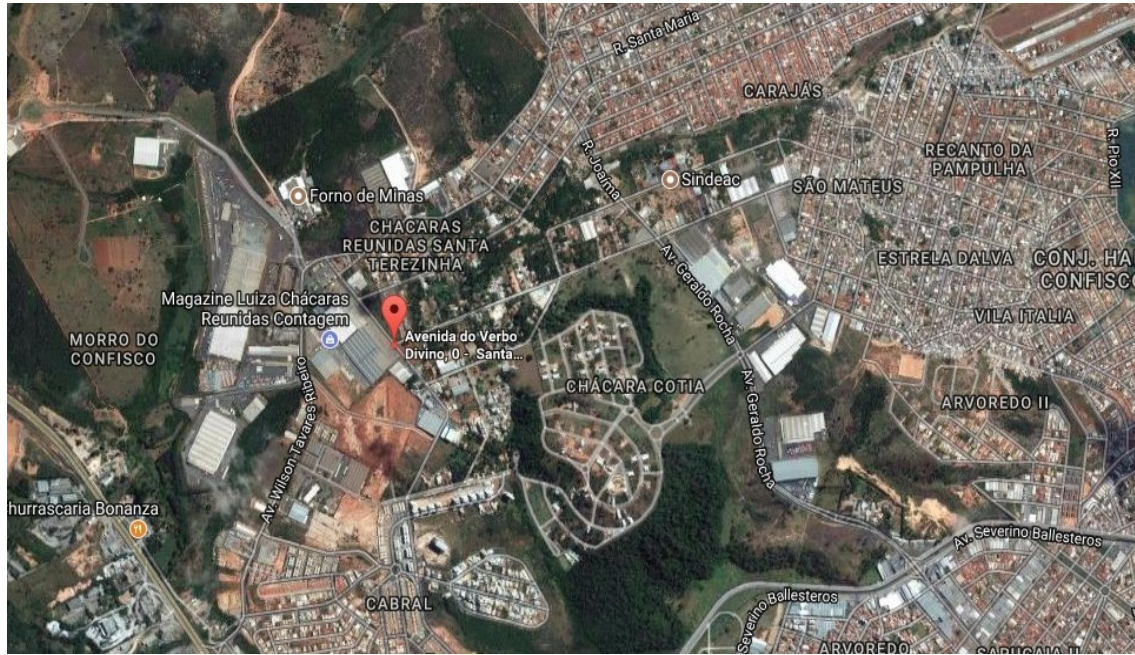


Figura 16 - Vista panorâmica dos locais de coleta das amostras de roedores em Contagem.Fonte: Google Maps (2017).

Ouro Preto ($20^{\circ}22'44.9''S$ $43^{\circ}30'40.9''W$) é uma cidade histórica de Minas Gerais, localizada na Serra do Espinhaço e inserida na zona metalúrgica do estado (Figura 17) (Gerais, 2017d). Essa cidade possui uma população aproximada de 70 mil habitantes e sua economia baseia-se em atividades de mineração (IBGE, 2017). O bioma característico dessa região é a Mata Atlântica (IBGE, 2017).

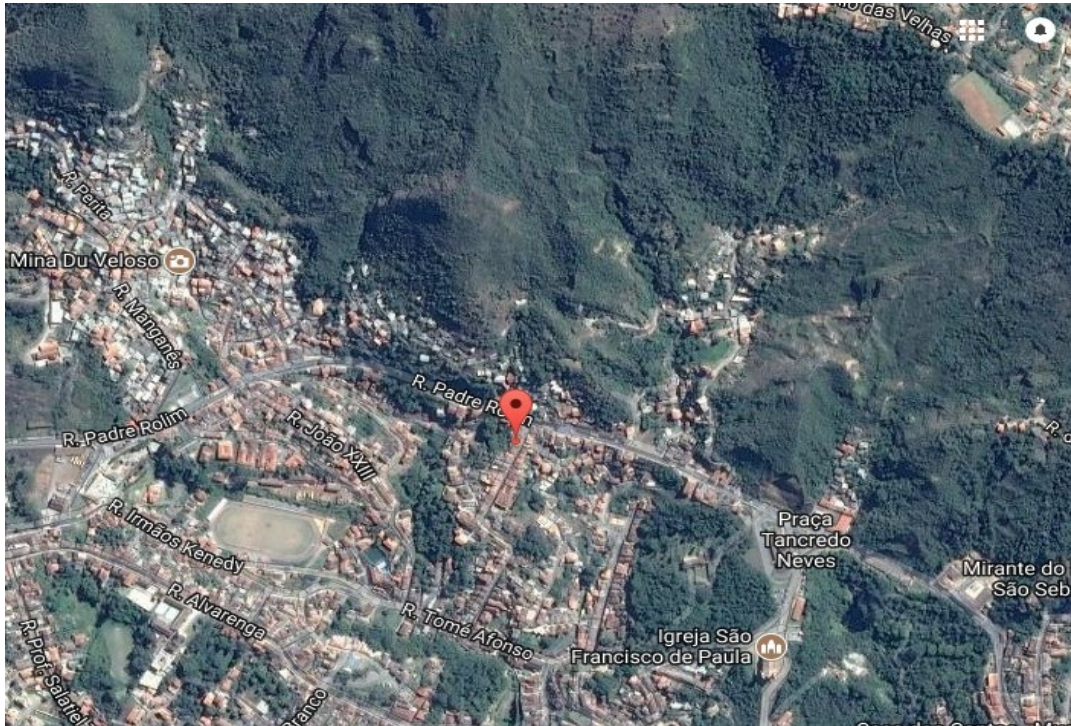


Figura 17 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de roedores em Ouro Preto.
Fonte: Google Maps (2017).

Por fim, também foram analisadas amostras de fígado roedores provenientes da Serra do Caraça, local turístico, classificado como uma reserva particular do patrimônio natural (RPPN), de 10.187 hectares, localizada na Serra do Espinhaço, em Minas Gerais (Figura 18) (Minas Gerais, 2018). A Reserva do Caraça apresenta vegetação predominante de Mata Atlântica, com áreas de Cerrado e os Campos de Altitude (predominante a partir dos 1300m de altitude) (Minas Gerais, 2018). As amostras foram coletadas em 2016 pelo grupo de pesquisa de imunologia de doenças virais do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz e foram gentilmente cedidas pelo Doutor Pedro Augusto Alves.

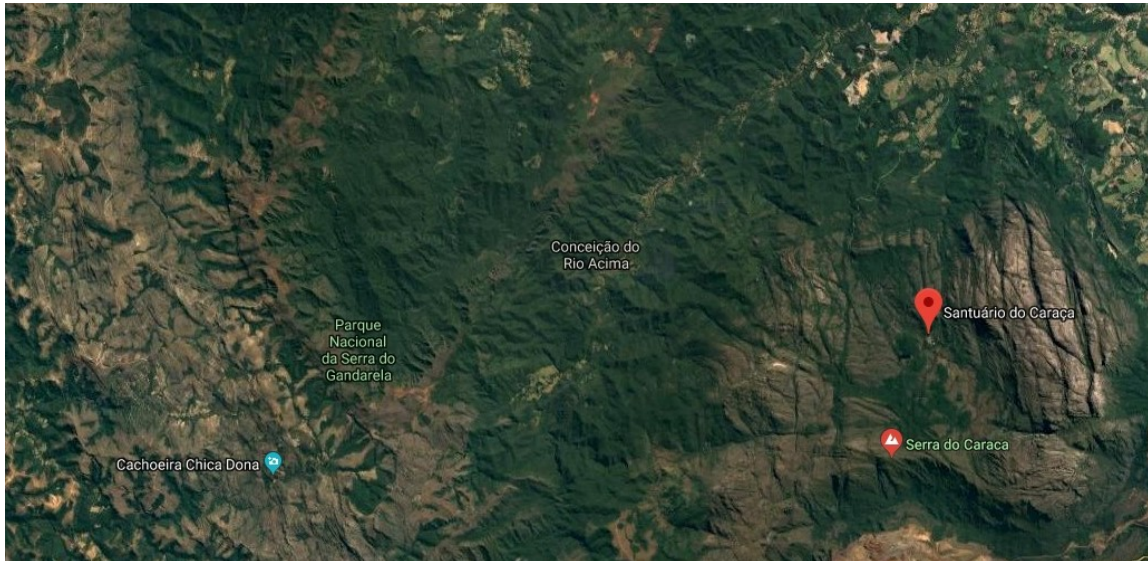


Figura 18 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de roedores na Serra do Caraça (MG). Fonte: Google Maps (2018).

O sangue de cada animal capturado foi coletado após a anestesia geral, via punção cardíaca com seringa e agulha estéreis e tubos de microcentrífuga sem coagulante. Quando o animal foi mantido vivo, foi permitida a coleta de, no máximo, 10% do volume total de sangue. Para cada campanha, foram sacrificados, no máximo, três animais de cada gênero, salvo os casos de óbito acidental, conforme estipulado pelo professor e ecólogo responsável Dr. Adriano Paglia, colaborador do projeto e docente do Departamento de Biologia Geral da UFMG. Dos animais sacrificados, foram coletados vários tipos de amostras, sendo que os de interesse deste projeto foram o fígado e o soro. Durante a coleta do material biológico, os fígados foram retirados, fracionados em três pedaços e armazenados em tubos criogênicos. Em um desses tubos, foram adicionados RNA later (Ambion, E.U.A) para preservação do material genético que foi armazenado imediatamente em nitrogênio líquido (-196°C) (Kohl *et al.*, 2017). Todas as amostras foram mantidas a -70°C no laboratório.

As coletas foram realizadas por profissionais capacitados e devidamente licenciados pelos órgãos competentes, segundo determinações estabelecidas na Instrução Normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). As coletas foram realizadas em concordância com os parâmetros de segurança para a coleta de roedores, preconizados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (MILLS *et al.*, 1995).

4.1.2 AMOSTRAS DE GRANDES ROEDORES (CAPIVARAS)

As amostras de fezes de capivaras foram coletadas em abril de 2016, na orla da Lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte (MG), pela equipe ECOVIR. A Lagoa da Pampulha está localizada em uma região urbana (Figura 19) (Gerais, 2017a). As fezes foram coletas em tubo falcon de 50 μ L estéreis e processadas no Laboratório de Vírus da UFMG.

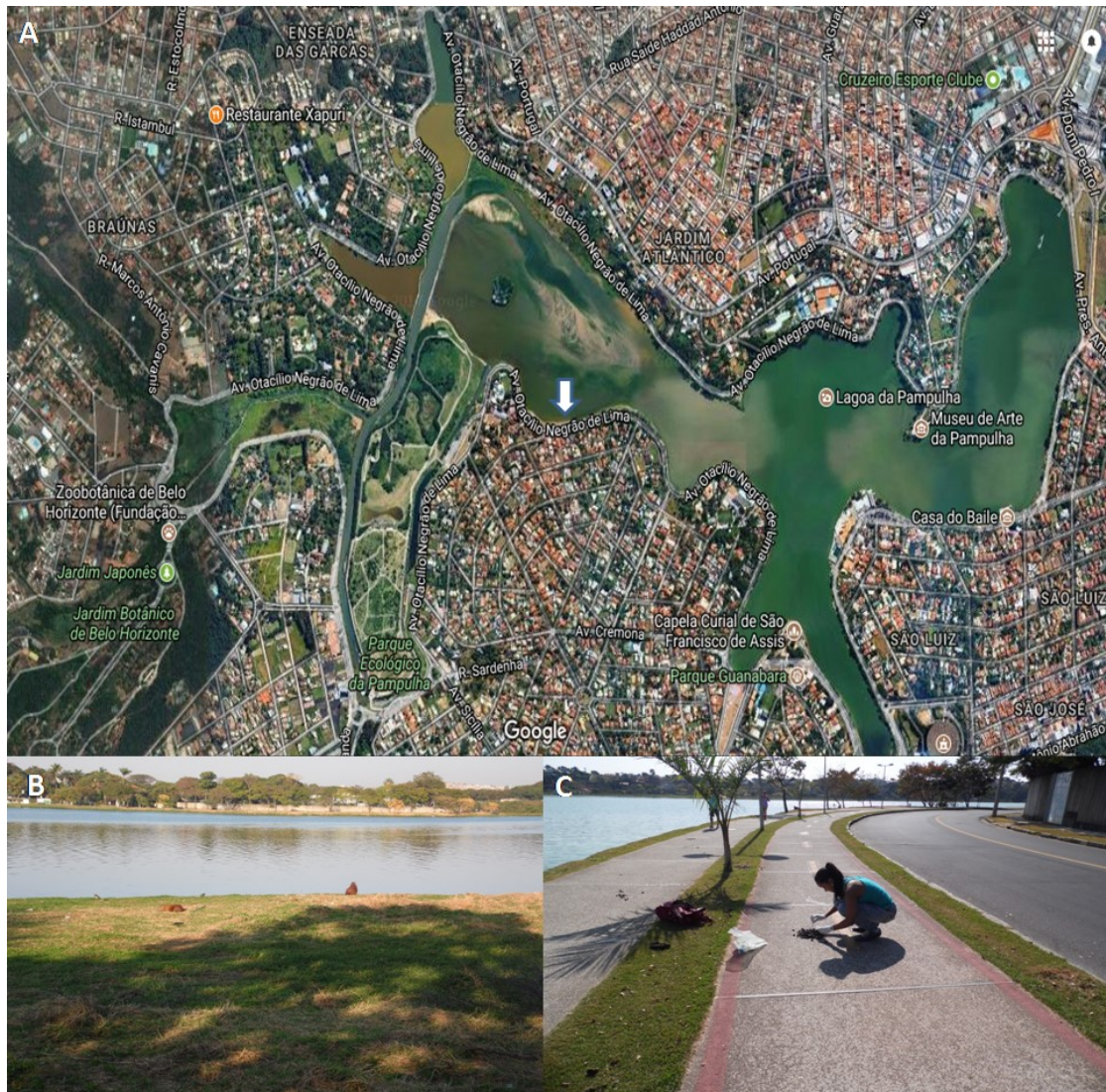


Figura 19 - Vista panorâmica do local de coleta das amostras de capivaras na Lagoa da Pampulha. (A) Vista da lagoa indicando o ponto de coleta; (B e C) Local de coleta. Fonte: Google Maps (2017) e arquivo pessoal.

Amostras de capivaras também foram coletadas no SESC de Caldas Novas, em Goiás (Figura 20). Caldas Novas tem o bioma predominante de Cerrado e o local de coleta está inserido em uma região urbana, cercada por fragmentos de mata. As amostras foram obtidas em parceria

com a clínica veterinária especializada em animais silvestres Zoovet Clínica e Consultoria LTDA, sendo as coletas realizadas pelo médico veterinário Dr. Pablo Pezoa, através da licença SISBIO nº111.019/2016. Foram coletadas amostras de soro, sangue, *swab* anal, *swab* oral, fezes e carrapatos que parasitavam as capivaras no momento da coleta, em outubro de 2016.



Figura 20 -Vista panorâmica do local de coleta das amostras de capivaras em Goiás. (A)Vista local indicando o ponto de coleta; (B e C). Local de coleta. Fonte: Google Maps (2017) e imagens cedidas pelo Dr. Pablo Pezoa.

4.1.3 AMOSTRAS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

As amostras de primatas não humanos foram coletadas em Conceição do Mato Dentro (MG), Belo Horizonte (MG) e em Tocantins (TO). Conceição do Mato Dentro fica a 167 km de Belo Horizonte e integra o circuito da Estrada Real e da Serra do Cipó. A cidade insere-se no

bioma de transição entre o Cerrado e a Mata Atlântica, sendo conhecida como a “capital mineira do ecoturismo”. Sua economia é baseada, principalmente, no turismo e na pecuária (Gerais, 2017b; IBGE, 2017). As amostras foram obtidas no período de janeiro a agosto de 2017, em parceria com a clínica veterinária especializada em animais silvestres Zoovet Clínica e Consultoria LTDA, sendo as coletas e as necropsias realizadas pelo médico veterinário Dr. Pablo Pezoa, através da licença SISBIO nº111.019/2016. Foram obtidas amostras oriundas de carcaças e de animais mantidos em quarentena.

No momento da necropsia, foram feitas coletas de fragmentos de diversos órgãos e vísceras. As amostras foram armazenadas em álcool, formol ou sem conservantes, e mantidas a -20°C ou à temperatura ambiente. As amostras da espécie *Alouatta guariba* foram coletadas de animais vivos, mantidos em quarentena, sem sinais clínicos e aparentemente saudáveis, de modo que foram coletados desses indivíduos apenas sangue e *swabs*.

No município de Belo Horizonte foram obtidas amostras de várias órgãos e sangue de um mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) pertencente ao Zoológico de Belo Horizonte e que foi a óbito no contexto de surto de febre amarela em Minas Gerais. As amostras foram armazenadas em álcool, formol e sem conservantes e foram enviadas pelos veterinários da Fundação Zoobotânica ao Laboratório de Vírus em Fevereiro de 2018, para diagnóstico de febre amarela.

As amostras de soros provenientes de Tocantins foram coletadas no contexto de captura de fauna para a construção de uma hidrelétrica, entre os anos de 2001 e 2002. O local de coleta insere-se em uma região de floresta Amazônica, uma área de vegetação nativa e sem efeitos antrópicos. Essas amostras fazem parte do acervo do Laboratório de Vírus, ficam armazenadas a -20°C e já foram anteriormente testadas em outros estudos para *Poxvirus*, *Mimivirus* e *Bunyavirus*, sendo positivas em todos eles (Abrahão *et al.*, 2010; Dornas *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016).

5.0 METODOLOGIA

5.1 PRODUÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

Neste estudo, foram utilizadas as seguintes amostras de *Flavivirus* pertencentes ao estoque do Laboratório de Vírus: DENV1, amostra Moshizuki; DENV2, amostra Piauí59, (genótipo Americano-Asiático); DENV3, amostra MG20/375 (genótipo Americano-Asiático I); DENV4, amostra Boa vista (genótipo II); e Vacina para YFV, subtipo 17DD. Todos os vírus,

excetuando-se o DENV 4, estavam estocados em freezer -80°C apresentando título suficiente para serem utilizados em todos os experimentos.

5.1.1 MULTIPLICAÇÃO E TITULAÇÃO DE DENV-4

O DENV-4 utilizado foi obtido a partir de amostra clínica de Boa Vista cedida pelo Professor Dr. Mauricio Nogueira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo (FAMERP). Para a multiplicação viral, frascos de cultura de células de C6/36 de 75 cm^2 , contendo monocamada de aproximadamente 80% de confluência, foram preparados 24 horas antes, sendo, então, infectados com multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 do estoque viral de vírus semente de DENV-4. A adsorção foi realizada por 1 hora e 30 minutos, em estufa incubadora do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D), sendo as garrafas homogeneizadas a cada 10 minutos. Após o tempo de adsorção, foram adicionados 12 mL de meio L15 suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) nas garrafas, que foram incubadas em estufa incubadora B.O.D. a 28°C , sendo observadas diariamente em microscópio óptico para verificação da formação de efeito citopático característico: formações de sincícios. Após a visualização do efeito citopático em aproximadamente 90% das células, o meio das garrafas foi centrifugado por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e congelado a -70°C .

Para a titulação, células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/poços) e incubadas a 37°C por 24 horas. Essas placas foram infectadas com $400\mu\text{L}$ de diluições seriadas do vírus na base 10 (10^{-1} a 10^{-7}). Após 1 hora de adsorção a 37°C , com homogeneização das placas a cada 15 minutos, o meio foi desprezado e foi adicionado 3 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram incubadas por sete dias em estufa contendo 5% de CO_2 e, após esse tempo, foram fixadas com formol 10% *overnight*, seguido por coloração com cristal violeta 1% por 20 minutos. Logo após, as placas foram lavadas e colocadas para secar, sendo contadas a olho nu as placas de lise formadas. Foram contadas as placas obtidas no poço contendo a diluição do vírus, que apresentou entre 50 e 100 placas de lise, sendo o título viral expresso em unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL).

O título foi calculado pela fórmula $T = \text{NPL} \times \text{ID} \times V$, em que T corresponde ao título viral; NPL, ao número de placas de lise; ID, ao inverso da diluição em que foram contadas as placas; e V, ao volume utilizado para a adsorção corrigido para mL.

5.2 DETECÇÃO MOLECULAR

5.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES PARA DENV

Para a análise das performances da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na matriz de fígado de roedores, foi feita a contaminação deliberada de 20 µg de fígados de camundongos BALB/c com DENV-4, amostra Boa Vista, nas concentrações de 10^3 a 10^0 pfu/µL. Fígado com PBS 1x foi usado como controle negativo. Em seguida, o material foi processado conforme descrito nos tópicos 5.4, 5.5 e 5.6.

Para a comparação da eficiência das reações, as amostras foram submetidas a PCR, com os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.* (2005) e Lanciotti *et al.* (1992). As reações descritas por Bronzoni *et al.* (2005) têm como alvo a região NS5 e produzem fragmentos com tamanhos distintos para cada DENV sendo: DENV-1 (472pb), DENV-2 (316pb), DENV-3 (659pb) e DENV-4 (222pb). A reação de Lanciotti *et al.* (1992) tem como alvo a região CprM e também produz fragmentos com tamanhos distintos para cada vírus, sendo: DENV-1(492pb), DENV-2 (119pb), DENV-3 (290pb) e DENV-4 (392pb). Após a amplificação, o material foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, conforme descrito no tópico 5.9.

5.2.2 PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE YFV

Para a detecção do YFV, foi utilizado o par de iniciadores dirigidos contra a região da CprM, de acordo com Jorge *et al.* (2007). Duas variáveis foram testadas: a PCR com reagentes caseiros; e a PCR com o Kit GoTaq Hot Start colorless Master Mix (Promega, Madison, WF, EUA) e com diferentes condições de ciclagem, conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7, abaixo.

Os reagentes foram usados nas seguintes concentrações:

Tabela 6 - Concentrações dos reagentes testados para a padronização da PCR para a caracterização do YFV

	PCR caseira	PCR Go taq Hot Start
	Reagentes	
Tampão 10x	5µL	10 µL
Primer senso	10pMol	10pMol
Primer antisenso	10pMol	10pMol
MgCl ₂	50nM	-
dNTP	2,5mM	-
Taq	2U	-
cDNA	5µL	2µL
Água	qsp 50 µL	qsp 25 µL
Volume final	50µL	25µL

As seguintes ciclagens foram testadas com a PCR caseira e com o KitGo Taq Hot start:

Tabela 7 - Condições de ciclagem usadas na padronização da reação para a caracterização do YFV

	Condição 1		Condição 2	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Aquecimento inicial	94°C	3 min	94°C	5 min
Desnaturação	94°C	30 seg	94°C	45 seg
Pareamento	50°C	30 seg	53°C	45 seg
Extensão	72°C	2 min	72°C	1 min 10 seg
Extensão final	72°C	10 min	72°C	10 min
Número de ciclos	40		30	

5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O processo de lise tecidual das amostras de fígado de roedores foi feito por maceração em graal de porcelana pela adição de nitrogênio líquido. Já as amostras de órgão provenientes dos PNHs e dos carrapatos das capivaras foram trituradas em *bead beater* (BioSpec, SoniBeast™ Cell Disrupter), usando cinco esferas por eppendorf por 60 segundos. Foram utilizados 20 µg de cada amostra, sendo o material suspenso novamente em 600 µL do tampão de lise do kit de extração KitQIamp total RNA (QIAGEN, U.S.A).

O processamento das amostras fecais foi feito a partir de 20 µg de fezes, que foram diluídas 1:10 p/v em solução salina tamponada (PBS 1x). Para a clarificação, 200 ml das amostras diluídas foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com filtros

de 0,45 mm (Millipore) para remoção de bactérias e partículas maiores do que os poros do filtro. Em seguida, foi feita a extração de RNA viral.

As amostras de *swab* e sangue foram diluídas 1:100 em PBS 1x, sendo usados 200µL dessa diluição para a extração de RNA.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração de RNA a partir de soro, *swab* e sangue, foi utilizado o Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, USA), e para as vísceras e órgãos, o kitQIamp total RNA (QIAGEN, U.S.A.).

Cerca de 140 µL das amostras foram lisados pela solução tampão AVL. Após a lise, as amostras foram aplicadas a uma coluna com afinidade para o RNA e submetidas a uma centrifugação de 8.000 x g por 1 minuto. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes: a primeira, com a solução tampão AW1; e a segunda, com a solução tampão AW2. Após o processo de lavagem, o RNA foi eluído da coluna pela solução AVE e estocado a -70°C.

A extração das amostras fecais foi realizada pelo método de Trizol (TriReagent®Sigma). As amostras foram incubadas em reagente Trizol a 37°C por 5 minutos, sendo adicionados 50 µL de clorofórmio em seguida. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 3 minutos e centrifugada a 4°C, 12.000 g por 15 minutos. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo, sendo adicionados 250 µL de isopropanol. Ao término da homogeneização e incubação por 10 minutos a 37°C, o microtubo foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi lavado com 1µL de etanol 75% e, após centrifugação a 7.500 g por 5 minutos, o etanol foi descartado e o microtubo deixado aberto para secagem do sedimento. O RNA foi homogeneizado em 30 µL de água livre de RNAses e estocado em freezer a -70°C.

5.5 TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA extraído foi usado como molde para a produção de uma cadeia complementar de DNA (cDNA). Para isso, aproximadamente 5 µg do RNA foi incubado com iniciadores randômicos (hexâmeros - Promega Corporation -EUA) a 70°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4,0µL de tampão de RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl₂ a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 2,0µL de dNTP (10mM) e 1,0µL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/µL) (Promega Corporation - EUA). Essa mistura foi incubada por 1hora a 37°C. O cDNA produzido foi usado para a amplificação do material genético por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) e por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

5.6 PCR EM TEMPO REAL

Como objetivo de avaliar a qualidade do processo de extração de ácidos nucleicos as amostras de capivaras e PNHs foram submetidas à qPCR utilizando iniciadores para a detecção do gene da β-actina murina e humana, respectivamente. Para as amostras de primatas foram utilizados os iniciadores descritos por Oliveira, 2015 (não publicado) e para as de capivaras os descritos por (Santos *et al.*, 2014). As coleções de pequenos roedores são compartilhadas com outros estudantes, e, portanto, já haviam sido testadas para a β-actina.

Todas as amostras que compõem a coleção deste projeto foram triadas para YFV por uma reação genérica de qPCR para a detecção de *Pan-Flavivirus*, descrita por Patel *et al.*, 2013. Essa reação amplifica 260 pb da região NS5 e permite a distinção entre os *Flavivirus* por meio de pequenas variações na temperatura de dissociação.

Para todas as reações foi utilizado o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) nas seguintes concentrações e volumes de reagentes (Tabela 8):

Tabela 8 - Concentração de reagentes da qPCR

Concentração dos reagentes	
Master mix	5 μ L
Primer F	1 μ M
Primer R	1 μ M
Amostra	1 μ L
Água q.s.p	10 μ L

A ciclagem da qPCR tem uma temperatura inicial de 95°C, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 minutos, pareamento 60°C por 60 minutos e extensão 60°C por 60 minutos. Todas as reações foram amplificadas no termociclador *StepOne*®, da Applied Biosystems, e os dados analisados pelo *software StepOne*®, versão 2.1, da Applied Biosystems.

Como controles positivos das reações para detecção de β -actina murina foi usado cDNA de fígado de camundongos e para a humana o cDNA de células Vero. Como controle para as reações de detecção de YFV foi usado o cDNA da amostra vacinal subtipo 17DD. Água de injeção foi utilizada como controle negativo em todas as reações.

Foram consideradas somente as reações em que não houve amplificação específica no controle negativo. As amostras que tiveram a temperatura de dissociação igual à do controle positivo foram classificadas como positivas; as amostras que não amplificaram foram classificadas como negativas.

5.7 PCR CONVENCIONAL

As seguintes reações foram usadas na PCR (Tabela 9):

Tabela 9 - Reações usadas na PCR convencional

Vírus	Região alvo	Tamanho do amplicon	Referência
DENV1	NS5	472 pb	(De Moraes Bronzoni <i>et al.</i> , 2005)
DENV2	NS5	316 pb	(De Moraes Bronzoni <i>et al.</i> , 2005)
DENV3	NS5	659 pb	(De Moraes Bronzoni <i>et al.</i> , 2005)
DENV4	NS5	222 pb	(De Moraes Bronzoni <i>et al.</i> , 2005)
DENV1	CprM	482 pb	(Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)
DENV2	CprM	119 pb	(Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)
DENV3	CprM	290 pb	(Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)
DENV4	CprM	392 pb	(Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)
YFV	CprM	978 pb	(Jorge <i>et al.</i> , 2017)

Para triagem, as amostras de roedores foram agrupadas em pool, sendo cada pool composto por três amostras. Como critérios de agrupamento foram usadas amostras da mesma espécie ou mesmo gênero dentro de uma mesma coleção. As amostras de PNH foram triadas separadamente, exceto os soros provenientes de Tocantins, que também foram triados em pool, sendo cada pool composto por três amostras de animais da mesma espécie.

Para a detecção de DENV, foram usados os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.* (2005). As amostras que foram suspeitas nessa reação também foram submetidas à PCR descrita por Lanciotti *et al.* (1992).

Os iniciadores descritos por Jorge *et al.* (2017) foram usados somente para a caracterização das amostras previamente positivas para o YFV na qPCR descrita por Patel *et al.* (2013).

5.8 FRACIONAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Os produtos da PCR foram fracionados em gel de poliacrilamida 8% (1,86 mL de acrilamida/bisacrilamida, na proporção de 29:1, 1,40 mL de Tris Borato Ácido etilenodiamino tetracético (TBE), 10% de persulfato de amônio, 7 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 3,74 mL de H₂O). O fracionamento foi feito a 100 V, em tampão de corrida TBE 1X (0,089M tris-acetato, 0,089M ácido bórico, 0,002M ácido etilenodiaminotetracético). Para a coloração, foi empregado o método com nitrato de prata, conforme protocolo descrito pelo fabricante

(BIORAD): os géis foram fixados em solução fixadora A (40% metanol, 10% ácido acético, v/v) e em solução fixadora B (10% etanol, 5% ácido acético v/v). Em seguida, foi feita incubação com solução oxidante (bicromato de potássio 0,034 M, ácido nítrico 0,032 M) por 5 minutos. Os géis foram corados com nitrato de prata (0,6 g/300 ml de água) por 20 minutos e lavados com água deionizada por 1 minuto, acrescentando-se, posteriormente, a solução reveladora (5,9 gramas de carbonato de sódio e 0,1 grama de paraformaldeído em 200mL de água) por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido acético 5%.

5.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos das reações de PCR foram purificados pelo uso do Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA). Para cada 45µL de produto de PCR, foram adicionados 11,25 µL de EDTA (125mM, pH 8.0) e 135 µL de etanol absoluto. Essa mistura foi centrifugada a 16.000g, por 25 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 120 µL de etanol 70% foi adicionado ao tubo, que novamente foi centrifugado a 16.000g por 10 minutos. Após o sobrenadante ser completamente descartado e evaporado, 10 µL de água foram usados para eluir o material purificado. Para otimizar essa etapa, o material foi deixado em banho-maria por 15 minutos a 37°C.

5.10 SEQUENCIAMENTO E INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS

Os fragmentos obtidos foram sequenciados pelo método de didesoxirribonucleotideo (Sanger, 1977), em sequenciador automático capilar ABI 3130, utilizando-se o KitBig Dye terminator (Applied Biosystems) e obedecendo-se às condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Cada fragmento foi sequenciado duas vezes, sendo uma vez em cada orientação. As sequências obtidas do mesmo fragmento foram sobrepostas para gerar uma única sequência consenso, utilizando-se a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2010). Cada sequência consenso foi comparada à sequência depositada no banco de dados do *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI), utilizando-se a plataforma Blast 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>). Para a análise das sequências nucleotídicas, foi utilizado o algoritmo BlastN.

Para a realização das análises filogenéticas, cada uma das sequências consenso foi alinhada às sequências do *Genbank*, que atenderam a valores satisfatórios de cobertura,

similaridade, *e-value* e *score*. Para a seleção do melhor modelo filogenético foi utilizado o programa jModelTest. Por fim, a árvore filogenética foi construída utilizando-se o Programa MEGA 7.0, método de Maximum likelihood, com 1,000 bootstrap e parâmetro Tamura-2.

5.11 CONSTRUÇÃO DO MAPA PARA CORRELAÇÃO GEOGRÁFICA DE EPIZOOTIAS E CASOS HUMANOS DE YFV

Para a construção de um mapa de correlação geográfica de casos humanos de febre amarela e epizootias foram utilizados os dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2017a). Essas informações referem-se à localização geográfica da ocorrência de surtos no estado de Minas Gerais entre dezembro de 2016 e abril de 2017, época de coleta das amostras de primatas positivos neste estudo. Esses dados foram compilados em uma planilha no formato *Comma-Separated Values* (CSV).

Para a cobertura vacinal foram usados os dados fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais (Brasil, 2017b). Estas informações também foram compiladas em uma planilha no formato CSV.

Em seguida as planilhas no formato CSV foram inseridas separadamente no programa TabWin-DATASUS (datasus.saude.gov.br/mapas) para a confecção dos mapas. Os mapas de cobertura e localização geográficas foram gerados separadamente, sendo a sobreposição das imagens realizada de forma manual, utilizando os recursos do *Power-Point* (pacote Office do Windows 2007).

5.12 ENSAIO DE SORONEUTRALIZAÇÃO (*PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST- PRNT*)

Para a detecção de anticorpos neutralizantes contra *Flavivirus* foi realizado o teste de PRNT. Para os soros em que não havia quantidades suficientes, foram testados em pools de no máximo de três amostras da mesma espécie e região geográfica.

O teste foi padronizado segundo protocolos de Carvalho (2015), Maeda e Maeda (2013) e WHO (2007) com adaptações. Os soros foram testados em uma diluição seriada de 1:40 até 1:320. Essa diluição foi realizada em meio MEM sem adição de SFB e adicionado de igual volume de MEM contendo 300 unidades formadoras de placa (PFU) de YFV. Antes da diluição, as proteínas

do sistema do complemento foram desnaturadas através da incubação do soro em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para o controle de vírus, o mesmo processo foi adotado exceto pelo soro diluído, o qual foi substituído por SFB. As soluções de soro e vírus foram homogeneizadas e incubadas por aproximadamente 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Essas soluções foram então inoculadas em placas de seis poços com monocamadas de células VERO com aproximadamente 80% de confluência para adsorção. Durante esse processo, as placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ e homogeneizadas a cada dez minutos durante uma hora. Decorrida a adsorção, o sobrenadante foi retirado e meio semi-sólido (CMC 1%, Meio 199 2X, 1% SFB) foi adicionado a cada um dos poços com um volume suficiente para que as placas ficassem por cinco dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Decorridos os cinco dias de incubação, o meio semi-sólido foi retirado e as placas fixadas com solução de formalina a 10% por 30 minutos e coradas com solução de cristal violeta a 1% por 30 minutos. As placas de lise viral foram visualizadas e contadas. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução maior ou igual a 70% em relação ao controle de vírus para as amostras de roedores e 50% de redução para as amostras de PNHs.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DOS VÍRUS CONTROLES

O estoque viral de DENV4, multiplicado em células C6/36, foi produzido para ser utilizado como controle das reações de PCR. Obteve-se um título de $1,5 \times 10^7$ pfu/mL em células Vero. Já havia estoques trabalho de DENV 1, 2 e 3 no Laboratório de Vírus, por isso esses vírus não foram produzidos durante a execução deste projeto (descrição no tópico 5.1). Como controle para o YFV foi usada diretamente a extração viral do frasco vacinal 17DD.

6.2 PADRONIZAÇÕES

6.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES PARA A DETECÇÃO DE DENV

Sabendo-se que os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.*(2005) e Lanciotti *et al.*(1992) foram desenhados para a detecção de DENV em amostras humanas, fez-se necessário analisar a especificidade e a sensibilidade dessas reações para a detecção de DENV a partir de amostras de roedores. Para isso, fígados de camundongos BALB/c foram contaminados deliberadamente com DENV4 e, em seguida, amplificados com esses iniciadores. Ambas as reações apresentaram um limiar de detecção de 10^2 pfu/mL (Figura 21).

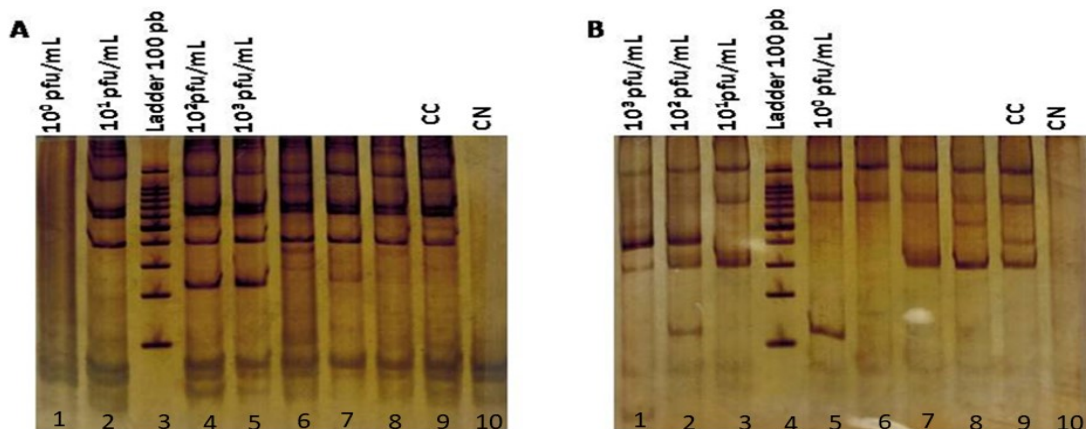


Figura 21 - Comparação da sensibilidade entre as reações descritas por Bronzoni *et al.*(2005) e Lanciotti *et al.*(1992) para a detecção de DENV4 a partir da matriz de fígado de roedor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. (A) Produtos da PCR obtidos com os iniciadores de Bronzoni *et al.*(2005); (B) Produto da PCR com os iniciadores descritos por Lanciotti *et al.*(1992), que apresentam fragmentos de 222pb e 392 pb, respectivamente. Acima das canaletas estão indicadas as quantidades virais usadas para a contaminação inicial das amostras e abaixo o número de cada canaletas. Foram usadas como controle de matriz (CM) amostras de fígado de camundongos contaminados com PBS. Água de injeção foi usada como controle negativo (CN). Marcador de tamanho molecular de 100pb (Kasvi). As canaletas 6,7 e 8 de ambos os géis referem-se a outras amostras que não participam deste experimento.

Apesar das reações com os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.* (2005) apresentarem uma quantidade maior de reações inespecíficas, os fragmentos específicos apresentaram bandas de maior intensidade, sendo, portanto, a reação de escolha para a triagem das amostras.

6.2.2 PADRONIZAÇÃO DE INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE YFV

Para analisar a eficiência dos iniciadores descritos por Jorge *et al.* (2017), que amplificam um produto de 978 pb da região CprM do genoma do YFV, foi avaliado o desempenho da PCR com reagentes caseiros e com o Kit Go taq Hot Start. Além disso, foram avaliadas duas condições de ciclagens da reação: condição 1: 95°C 10'; 94°C 30'; 50°C 30'; 72°C 2'; 12°C 10'; 40 ciclos; e condição 2: 95°C 10'; 94°C 45'; 53°C 45'; 72°C 1'10'; 72°C 10'; 30 ciclos. Para o teste, foram usadas duas amostras positivas para o YFV na qPCR, que tem como alvo 260pb da região NS5, descrita por Patel *et al.*(2013).

Em todas as condições testadas, ampliações só foram visualizadas com a reação produzida com o Kit Go taq hot start (Figura 22). A condição 1 de ciclagem da reação mostrou melhor resultado do que a condição 2, sendo, portanto, a condição estabelecida para essa PCR.

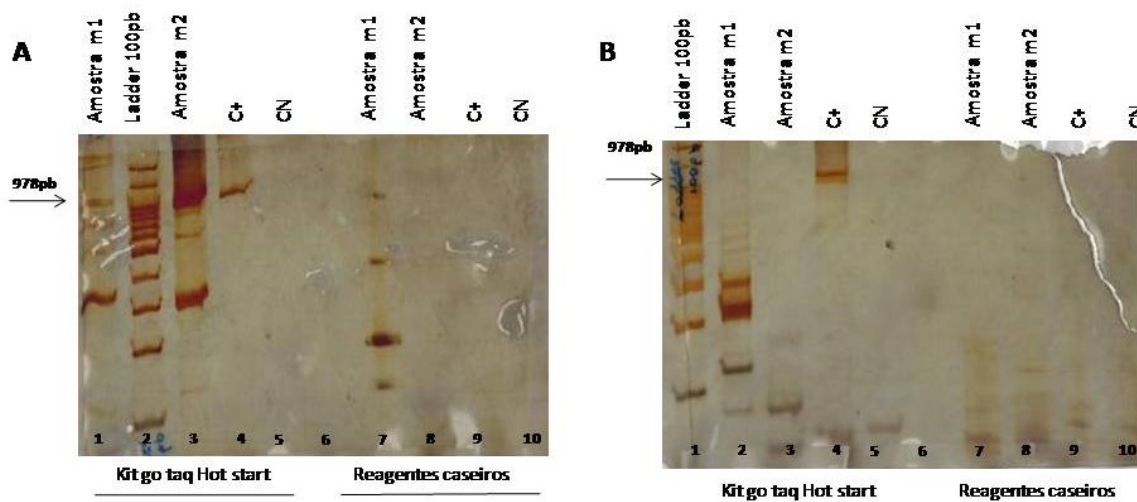


Figura 22 – Padronização PCR convencional para a detecção de YFV. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Produtos das reações que seguiram o protocolo de Jorge *et al.*(2017) com o Kit Go taq hot start e reagentes caseiros. (A) Produto da PCR com condição 1, com reagentes caseiros e Kit Gohot start. (B) Produtos da reação usando a condição 2 com reagentes caseiros e Kit Go taq hot start. Acima das canaletas estão indicadas as amostras testadas e, abaixo, o tipo de reagente usado e a numeração das canaletas. Foram utilizadas duas amostras (m1 e m2) de cDNA de fígado de primatas da espécie *Callicebus personatus*. Foram usados como controle negativo (CN) e positivo (C+) água de injeção e cDNA da amostra vacinal 17DD, respectivamente. Marcador de tamanho molecular de 100pb (Kasvi).

6.3 PROSPECÇÃO DE *FLAVIVIRUS*

6.3.1 PROSPECÇÃO VIRAL NA ORDEM RODENTIA

6.3.1.1 PROSPECÇÃO MOLECULAR DE DENV EM ROEDORES

Para a prospecção de DENV1-4, foram testadas amostras de soro e de fígado de roedores. Das capivaras foram testados: o *swab*, o soro e os carrapatos. Usou-se os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.*(2005), que têm como alvo a região NS5 e amplifica fragmentos que variam de 222 pb a 472 pb. Para a triagem, as amostras foram agrupadas em pools, sendo cada pool composto por três amostras de mesmo gênero ou espécie por coleção.

Alguns pools testados após a separação do material por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% apresentaram amplicons condizentes com os tamanhos estimados para o DENV. A figura a seguir exemplifica o perfil de amplificação das amostras (Figura 23). Essas amostras foram submetidas a uma nova PCR com cada amostra do pool separadamente, usando-se um par de iniciadores por reação. Em paralelo, elas também foram submetidas à PCR descrita por Lanciotti *et al.*(1992). Os produtos das reações que apresentaram novamente fragmentos com tamanhos condizentes com o DENV, em qualquer uma dessas duas reações, foram enviados para sequenciamento. A análise das sequências confirmou que os produtos gerados pela PCR eram ampliações inespecíficas.

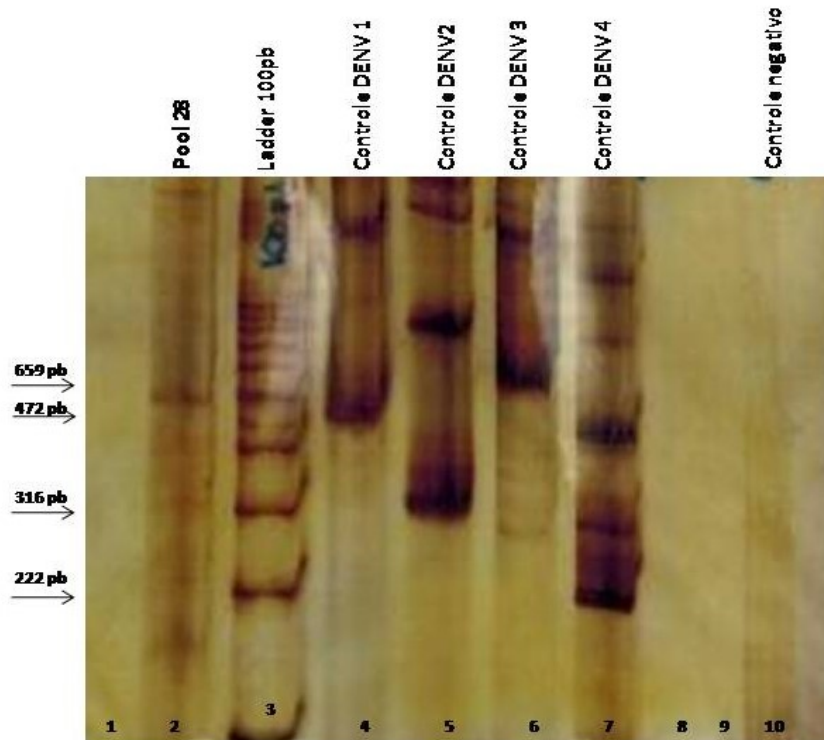


Figura 23 - Gel representativo da reação de PCR de uma amostra de roedor apresentando amplificação suspeita para DENV1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Produtos das reações segundo protocolo de Bronzoni *et al.* 2005, Na canaleta 2 está localizado um pool de amostras de roedores que apresentou amplificação condizente com DENV 2. Como controles das reações foram usados DENV1 (472 pb), DENV 2 (316 pb), DENV 3 (659 pb) e DENV 4 (222 pb). Foi utilizado como controle negativo a água de injeção. Marcador de tamanho molecular de 100pb (Kasvi).

Além disso, os soro, o sangue, os *swab* anal e oral e os carrapatos das capivaras foram submetidos à triagem para DENV, usando-se os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.*, 2005. Não foram detectadas amostras positivas (Figura 24).

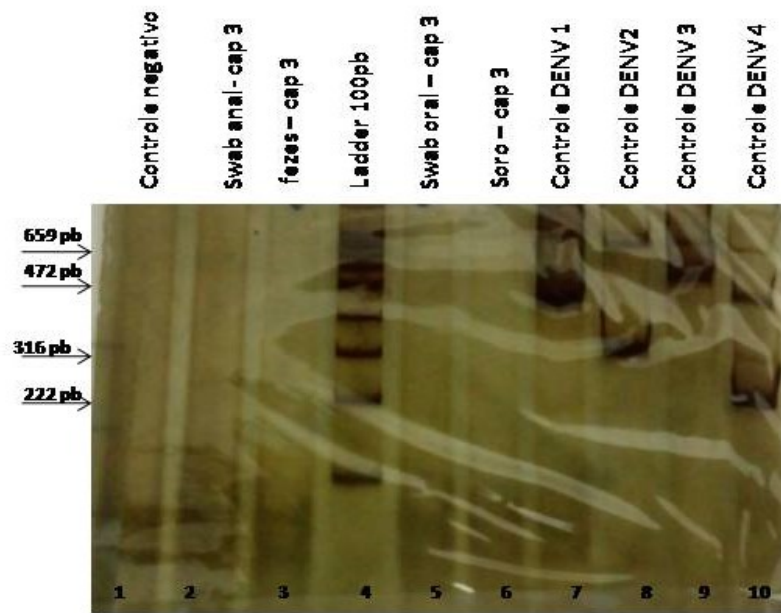


Figura 24- Geral representativo do perfil das PCRs das amostras de capivaras para prospecção de DENV. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Produtos das ampliações de amostras de capivaras utilizando os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.*, 2005. Nas canaletas 1, 2, 3, 5 e 6 estão localizadas os produtos da reação de PCR. Como controles foram usados DENV1 (472 pb), DENV 2 (316 pb), DENV 3 (659 pb) e DENV 4 (222 pb). Foi utilizado como controle negativo, água de injeção. Marcador de tamanho molecular de 100pb (Kasvi).

Apesar de já haver dados sobre a detecção molecular e sorológica de DENV em roedores descritos na literatura, nesse estudo não foram detectadas evidências da circulação de DENV nesses animais (De Thoisy *et al.*, 2004; De Thoisy *et al.*, 2009; Ázara, 2013). Para facilitar a comparação e a interpretação desses dados à luz de outros estudos, a tabela a seguir (Tabela 10) demonstra a compilação dos resultados de estudos anteriores sobre prospecção de DENV em roedores.

Tabela 10 - Levantamento Bibliográfico sobre a detecção de DENV em roedores.

Detecção de DENV em roedores - Levantamento Bibliográfico							
Origem	Espécie/ Gênero	N	ELISA	PRNT	PCR	Similaridade c/ DENV humano	Dados de coleta
Estudos realizados no Brasil	<i>Akodon</i>	1	0	0	0		Local de coleta Sabará (MG)
	<i>Cerradomys</i>	11	3	2	3 (D1 e D2)	não sequenciado	Tipo de ambiente urbano
	<i>Necomys</i>	31	1	0	na		Data coleta 2011-2012
	<i>Oligoryzomys</i>	4	1	0	na		Tipo de amostra soro Referência: Ázara, TMF. 2013 (tese)
	<i>Calomys tener</i>	55					
	<i>Calomys sp</i>	20			1		Local de coleta Rio Pomba (MG)
	<i>Akodon cursor</i>	18					Tipo de ambiente área rural
	<i>Akodon sp</i>	31					Data coleta 2012/2013
	<i>Necomys lasiurus</i>	18					Tipo de amostra soro e fígado
	<i>Oligoryzomys sp</i>	7					Referência: Rezende et al., 2015
	<i>Juliomys sp</i>	2					
	<i>Nectomys squampis</i>	1					
<i>Gerlinguetus ingrami</i>	1						
Estudos realizados em outros países	<i>Myoprocta acouchy</i>	29		0			Local de coleta Guiana Francesa
	<i>Dasyprocta leporina</i>	29		1			Tipo de ambiente área de floresta
	<i>Coendou spp.</i>	42		2			Data coleta 1994-1995
	<i>Agouti paca</i>	17		0			Tipo de amostra soro
	<i>Proechimys sp.</i>	18		0			Referência: Thoisy., 2004
	<i>Echimys spp.</i>	21		0			
	<i>Dasyprocta leporina</i>	1			0		
	<i>Holochilus sciureus</i>	2			0		
	<i>Makalata didelphoides</i>	6			0		
	<i>Mesomys hispidus</i>	5			1 (D3)		Local de coleta Guiana Francesa
	<i>Neacomys paracou</i>	1			0	DENV 1 = 92,6%	Tipo de ambiente Floresta, rural e urbano
	<i>Oecomys spp</i>	26			13 (12D1; 1D2)	DENV 2 = 89%	Data coleta 2001-2007
	<i>Oryzomys megacephalus</i>	8			1 (D1)	DENV 3 = 95%	Tipo de amostra fígado e soro
	<i>Proechimys cayennensis</i>	44			7 (2D1; 4D3; 1D4)	DENV 4 = 95,8%	Referência: (Thoisy, 2009)
	<i>Proechimys cuvieri</i>	15			3(1D3;2D4)		
	<i>Rattus rattus</i>	1			0		
	<i>Rhipidomys nitela</i>	2			0		
	<i>Zygodontomys brevicaudata</i>	16			5(D1)		
<i>Rattus rattus</i>	75		2 (DENV 2)			Local de coleta México Tipo de ambiente Periurbano	
<i>Mus musculus</i>	86		3(DENV2)			Data coleta 2011/2012 Tipo de amostra soro Referência: Cigarroa-Toledo et al., 2016	

na: Não testadas. D1= *Dengue virus 1*, D2= *Dengue virus 2*, D3= *Dengue virus 3*, D4= *Dengue virus 4*. Obs: amostra de Thoisy et al., 2004 foram testadas somente para DENV2, já as amostras de Thoisy et al., 2009 foram triadas para os 4 sorotipos de DENV.

Thoisy e colaboradores realizaram a detecção molecular de DENV em roedores da Guiana Francesa, coletados entre 2001-2007 em ambientes de floresta, urbanos e rurais, similar aos locais de coleta das amostras desse projeto de doutorado (De Thoisy *etal.*, 2009). Entretanto, a

maioria dos roedores positivos era dos gêneros *Oecomys*, *Proechimys* e *Zygodontomys*, que são gêneros diferentes dos animais que compõem essa coleção de estudo (Tabela 3). Por outro lado, no México houve a detecção sorológica de DENV em *Mus musculus* peridomesticos, que foram também espécies de animais analisadas neste projeto (Cigarroa Toledo *et al.*, 2016).

O estudo conduzido por Ázara (2013) analisou amostras de vários gêneros coletados em Sabará, sendo os testes realizados com os iniciadores descritos por Lanciotti *et al.*, 1992, que tem com alvo a região CprM. Nesse projeto essas amostras foram retestadas, para a análise do comportamento das reações de PCR frente a diferentes amostras de roedores, sem prejuízo de gastos das outras amostras que são inéditas desse trabalho. As amostras foram retestadas como os iniciadores de Bronzoni *et al.*, 2005, que tem como alvo a região NS5.

Azara (2013) detectou animais positivos dos gêneros *Akodon*, *Cerradomys*, *Necomys* e *Oligoryzomys*, que são gêneros que também fazem parte desta coleção. Entretanto, maiores inferências não são possíveis, visto que tal estudo restringiu se somente a detecção viral por PCR, sem confirmação por seqüenciamento das amostras consideradas positivas para DENV (Ázara, 2013). Outro ponto a ser considerado é que as amostras foram retestadas usando diferentes alvos gênicos, o que pode contribuir para a divergência dos resultados.

Rezende, 2015 também realizou a prospecção de DENV em 153 roedores coletados entre os anos de 2012 e 2013 na região rural de Rio Pomba (MG). Foram testados, por qPCR, animais dos gêneros *Calomys*, *Akodon*, *Necomys*, *Oligoryzomys*, *Juliomys*, *Nectomys* e *Gerlinguetus*. Um *Calomys* foi positivo na qPCR (Alves., não publicado) que tem como alvo 109 pb da região NS5 para SLEV e DENV 1-4. Os gêneros de animais analisados por Rezende, 2015 também são gêneros que compõem o banco de amostras deste projeto. Tendo em vista que as análises foram baseadas somente em qPCR (que amplificou um fragmento pequeno) e que a amostra não foi seqüenciada, foram restritas maiores inferências sobre o resultado.

Em adição a esses dados, um estudo sobre a preferência alimentar de *Ae. aegypti* coletados na região urbana de Caratinga entre os anos 2010 e 2011 demonstrou, através do sequenciamento de genes ribossomais 12S e 16S, a detecção de material genético de *Homo sapiens*, *Bos taurus* e roedores da espécie *Mus musculus* no sangue de fêmeas ingurgitadas. Dois dos mosquitos alimentados com sangue foram positivos para o teste de qPCR de DENV, sendo um alimentado com sangue humano e outro com sangue do roedor (Vilela, 2013). Esses dados sugerem que esses mosquitos têm um hábito alimentar diverso, o que abre perspectivas e reforça a

hipótese de que o DENV possa circular entre diferentes espécies de mamíferos, incluindo roedores.

6.3.1.2 PROSPECÇÃO MOLECULAR DE YFV EM ROEDORES

Para a prospecção de YFV, foram testados pools de amostras de soro e fígado de pequenos roedores. Cada pool foi composto por amostras de mesma espécie ou gênero dentro da mesma coleção. Das capivaras foram testados as fezes, os soros, o sangue, os *swab* anal e oral e seus carrapatos. Para a triagem, foram utilizados os iniciadores descritos por Patel *et al.* (2013), que amplifica por qPCR, 260pb da região NS5 (Tabela 3). Não foram detectadas amostras de capivaras e roedores positivos. As reações de detecção de YFV em pequenos roedores e nas capivaras apresentaram perfil similar. A Figura 25 ilustra o perfil de amplificação das amostras de pequenos roedores.

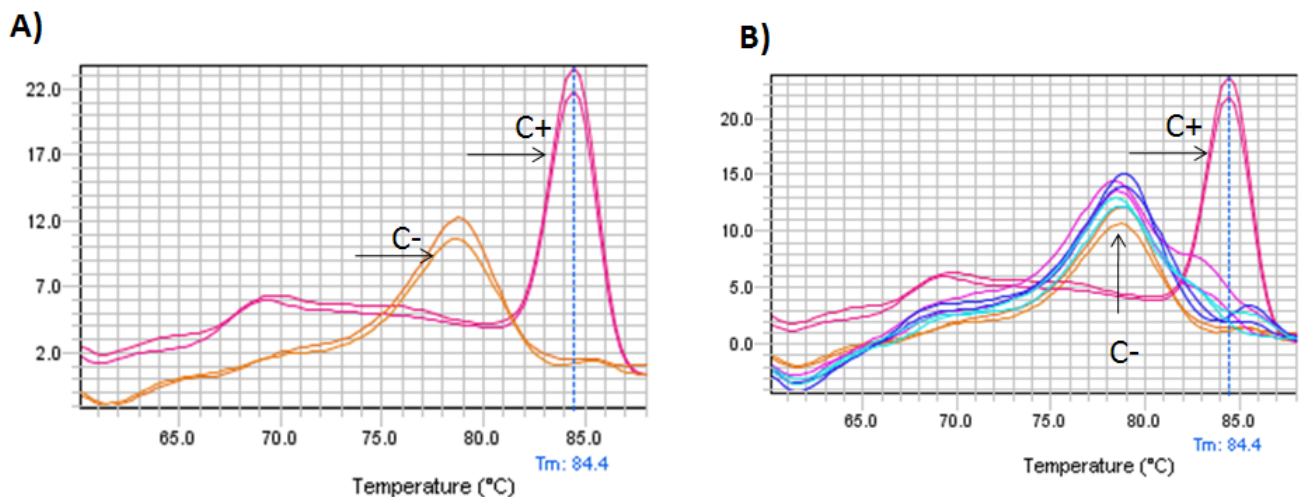


Figura 25 - Perfil de amplificação da reação de qPCR para detecção de YFV em amostras de roedores.

Os perfis de amplificação dos controles positivos e negativos estão indicados pelas setas (A). Perfil de amplificação das amostras de roedores em relação aos controles (B).

A ausência de detecção de animais positivos por técnicas moleculares pode ser devido a uma não viremia no momento da coleta das amostras ou mesmo a não susceptibilidade das espécies analisadas. Cabe resaltar que em virtude do curto período viremico, no geral observado nos arbovírus, a detecção de flavivírus em animais silvestres hígidos e em período não epizootico é difícil de ser realizada (Gonçalves *et al.*, 2018).

Outro ponto que aqui merece ser destacado é que a PCR proposta por Patel e colaboradores em 2013 utiliza uma reação do tipo *Panflavivirus*, ou seja, é capaz de detectar múltiplos *flavivirus* incluindo não só YFV, como DENV. Sendo assim, esta estratégia de triagem nos permitiu então uma segunda avaliação para a circulação de DENV nas coleções de roedores que se mostraram negativas, corroborando os resultados obtidos através da triagem com o protocolo de Bronzoni e colaboradores (2005).

6.3.1.3 PROSPECÇÃO DE ANTICORPOS *ANTI- FLAVIVIRUS* EM ROEDORES

Para a prospecção de anticorpos anti-flavivirus em roedores foram testados, por PRNT, 54 soros de pequenos roedores e soros de 9 capivaras (tabela 3). Para os soros que havia pouca quantidade, as amostras foram testadas em pools, sendo cada pool composto por no máximo três amostras da mesma espécie e região. O restante das amostras foram triadas separadamente. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução maior ou igual a 70%, comparadas ao número de placas presentes no controle de vírus.

Os *Flavivirus* apresentam reatividade cruzada entre os membros que compõem o gênero *Flavivirus* (De Madrid e Porterfield, 1974; Calisher *et al.*, 1989; Amarilla *et al.*, 2018). Para a realização da PRNT optou-se por usar o vírus YFV, já que dentre os vírus de interesse nesta tese, o YFV é o vírus que sabidamente circula no ambiente silvestre brasileiro, de onde provem grande parte das amostras analisadas nesse estudo.

Dentre as amostras testadas não foram detectados anticorpos neutralizantes nos soros de pequenos roedores (Figura 26) e nem das capivaras (Figura 27).

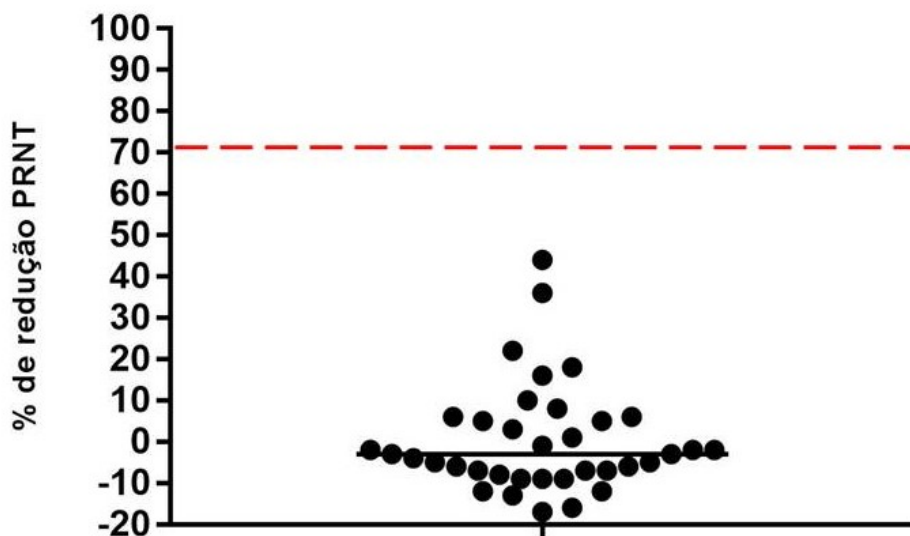


Figura 26 - Porcentagem de redução na PRNT das amostras de pequenos roedores. Foi utilizado como ponto de corte uma redução de 70%, representado pela linha tracejada vermelha. A mediana está representada como uma linha contínua preta.

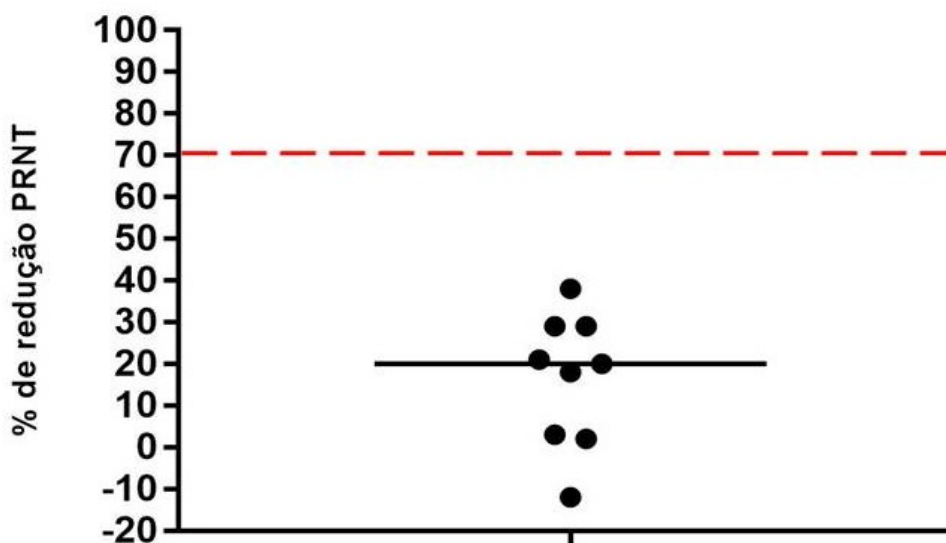


Figura 27 - Porcentagem de redução na PRNT das amostras de capivaras. Foi utilizado como ponto de corte uma redução de 70%, representado pela linha tracejada vermelha. A mediana está representada como uma linha contínua preta.

De Thoisy e colaboradores (2004) detectaram anticorpos anti-DENV2 em várias espécies da ordem Rodentia que incluíram *Dasyprocta leporina* (cutia) e *Coendou spp.* (porcos espinhos arborícolas ou ouriços cacheiros), que são animais de espécies diferentes dos que compoem esta coleção (De Thoisy *etal.*, 2004). Por outro lado, no México foram detectados anticorpos anti-DENV2 em *Mus musculus* peridomésticos, que são gêneros de animais que fazem parte desta coleção (Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016).

Nos estudos de Ázara (2013) foram detectados cinco animais positivos para DENV no ELISA IgG que pertenciam aos gêneros *Cerradomys*, *Necromys* e *Oligoryzomys* (tabela10). Dentre os animais positivos no ELISA, dois *Cerradomys* também foram positivos na PRNT, no qual foi usado um ponto de corte de 50% de redução na diluição 1:20. Neste trabalho optou se por usar uma PRNT com um ponto de corte mais elevado, considerando uma redução de 70%, assim como em outros estudos que descrevem a presença de anticorpos em animais que, até então, não são classicamente descritos como participantes da cadeia de manutenção viral (De Assis *et al.*, 2012; Franco-Luiz *et al.*, 2016). Dessa forma, não foram detectados anticorpos anti-flavivirus nos pequenos roedores e capivaras analisados nesta tese.

6.3.2 PROSPECÇÃO VIRAL NA ORDEM PRIMATA

6.3.2.1 PROSPECÇÃO MOLECULAR DE DENV EM PNH

Para a prospecção de DENV em PNHs, foram testadas 61 amostras, entre vísceras, órgãos, soro, sangue e fezes (Tabela 3). Para a triagem dos soros de Tocantis, as amostras foram agrupadas em *pools*, sendo cada *pool* composto por três amostras. O restante das amostras foram triadas separadamente.

Para tanto, foram utilizados os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.* (2005), que amplifica fragmentos de 222pb a 472 pb, da região NS5. Não foram detectadas amostras positivas (Figura 28).

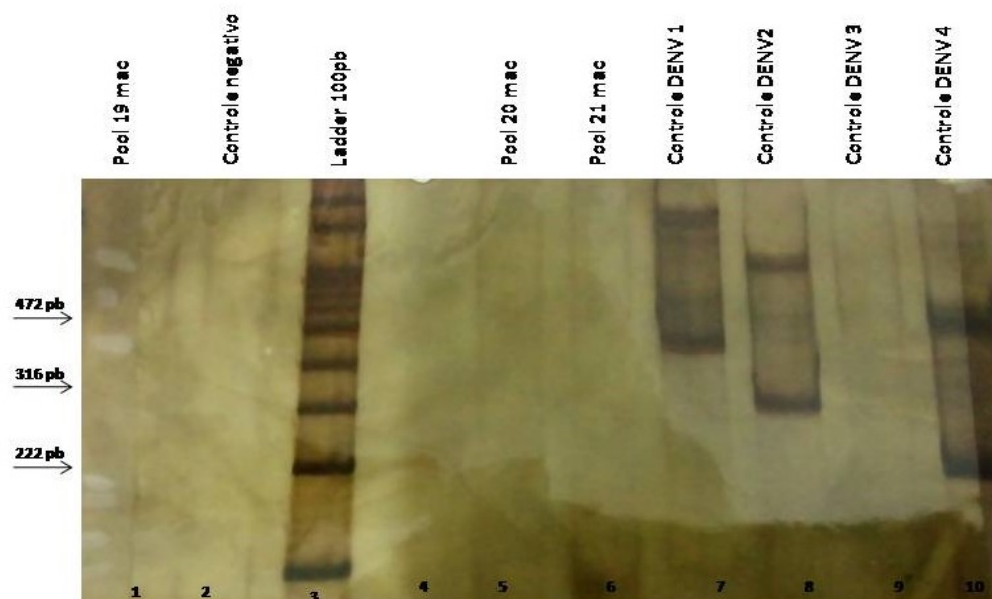


Figura 28- Gel representativo do perfil das amostras de PNH na PCR pra prospecção de DENV. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Produtos das ampliações de amostras de PNH utilizando os iniciadores descritos por Bronzoni *et al.*,2005. Nas canaletas 1, 5 e 6 estão localizados os produtos das reações de amostras de PNH na PCR.Como controles das reações foram usados DENV1 (472 pb), DENV 2 (316 pb), DENV 3 (659 pb) e DENV 4 (222 pb). Foi utilizado como controle negativo, água de injeção. Marcador de tamanho molecular de 100pb(Kasvi).

Os primatas não humanos do velho mundo fazem parte do ciclo silvestre dos DENVs, sendo esse ciclo, até então, restrito a países da África e da Ásia. Animais das espécies *Chlorocebus sabaues* (África), *Papio papio* (África), *Erythrocebus patas* (África), *Macaca fascicularis* (Ásia) e *Presbys spp* (Ásia) participam desse ciclo (Vasilakis e Weaver, 2017). Dessa maneira, a falta de evidências da circulação de DENV nos animais analisados nesse estudo (*Allouatta*, *Callicebus* e *Callitrix*), pode ser discutida à luz de vários fatores que incluem: (1) a conservação da coleção a -20C e não a -70C; ao número amostral reduzido e restrito a indivíduos pertencentes a somente três gêneros; (3) a ausência de fato da circulação de DENV em ambientes silvestres nas regiões geográficas contempladas neste estudo; (4) a não susceptibilidade das espécies de primatas analisados.

Algumas justificativas aqui colocadas para serem elucidadas demandariam estudos adicionais complexos que envolveriam coletas sistemáticas em distintas regiões geográficas ou até mesmo estudos de experimentação animal a fim de se verificar a susceptibilidade das espécies de PNHs do novo mundo ao DENV.

Uma abordagem holística que integre estudos de resposta imune dos hospedeiros, associados a conhecimentos sobre fisiologia, metabolismo, epidemiologia, ecologia e aspectos

evolutivos são fundamentais para uma melhor compreensão da emergência viral e, portanto, são especialmente importantes no avanço de nosso conhecimento nesta área (Mandl et al., 2015). Entretanto, tais estudos seriam de difícil execução em nosso país mesmo a médio e longo prazo por razões financeiras, logísticas e questões éticas.

6.3.2.2 PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE YFV EM PNHs

Para a prospecção de YFV, foram testadas 79 amostras de PNHs, entre vísceras, órgãos, soro, sangue e fezes (Tabela 3). Para a detecção, foram utilizados os iniciadores descritos por Patel *et al.* (2013), que amplifica por qPCR, 260 pb da região NS5.

Dois animais da espécie *Callicebus personatus* coletados em Conceição do Mato Dentro em janeiro de 2017 foram positivos para YFV na qPCR. De um dos animais positivos, foram testados o coração, o baço, o pulmão, o fígado, os rins, a bexiga e o estômago, sendo todas as amostras positivas. Do outro animal positivo, foram testados fragmentos do estômago, do rim, do fígado, do intestino, do coração, do baço, da bexiga, do tecido muscular, do ovário, do pulmão e linfonodos, sendo detectado o genoma viral somente no rim, no fígado e no coração.

Para caracterização, as amostras positivas foram submetidas à PCR dirigida para 978 pb, da região CprM, descrita por Jorge *et al.* (2007). Em seguida, os produtos das reações de qPCR e de PCR convencional foram enviados ao sequenciamento. Para a região NS5, foram obtidas sequências de 207 pb dos dois animais. Já para a região CprM foi possível obter uma sequência consenso de um animal (945pb).

As sequências obtidas foram depositadas no *GenBank*. Foram depositadas duas sequências de 207 pb, da região NS5, sendo depositadas sob os seguintes números de acesso: MF580491 e MF580493. Já da região CprM foram depositadas duas sequências de 945 pb: MF580492 e MF580494.

As análises do BLAST revelaram que as sequências apresentaram alta identidade nucleotídica com outras sequências de YFV depositadas no *GenBank*. As análises filogenéticas foram baseadas em um fragmento de 207 pb, da região NS5, e de 945 pb, da região CprM. O programa *JmodelTest* foi usado para a seleção do melhor modelo de substituição (Pousada., 2008). Para a reconstrução filogenética foi utilizado o método *Maximum likelihood*, com replicatas de

1.000 bootstrap e Akaike information criterion (AIC), com GTR+G, no Programa MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>). As análises demonstraram que essas amostras pertencem ao genótipo Sul-americano 1 de YFV (Figuras 29 e 30).

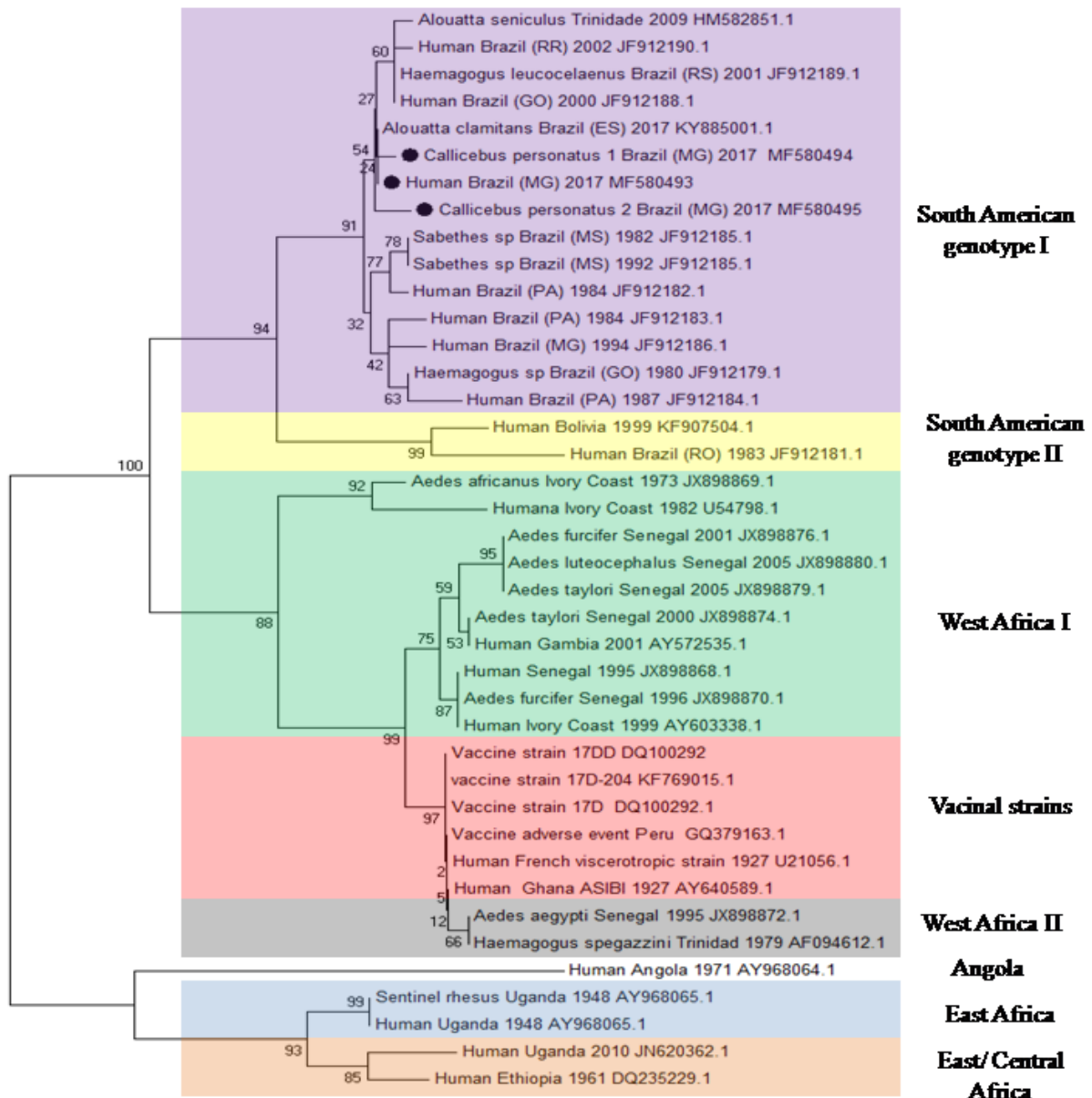


Figura 29 - Inferência filogenética construída a partir de 207 pb, da região NS5 de YFV. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança, com 1.000 bootstrap e Akaike information criterion (AIC), com GTR+G no programa MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>). Os círculos pretos indicam amostras deste estudo e os números ao longo dos ramos são valores de bootstrap. Para cada sequência, o hospedeiro, o local de origem e a data foram citados. Para as amostras brasileiras, também foi relatado o estado entre parênteses: Espírito Santo (ES); Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS); Minas Gerais (MG); Pará (PA); Rio Grande do Sul (RS); e Roraima (RR).

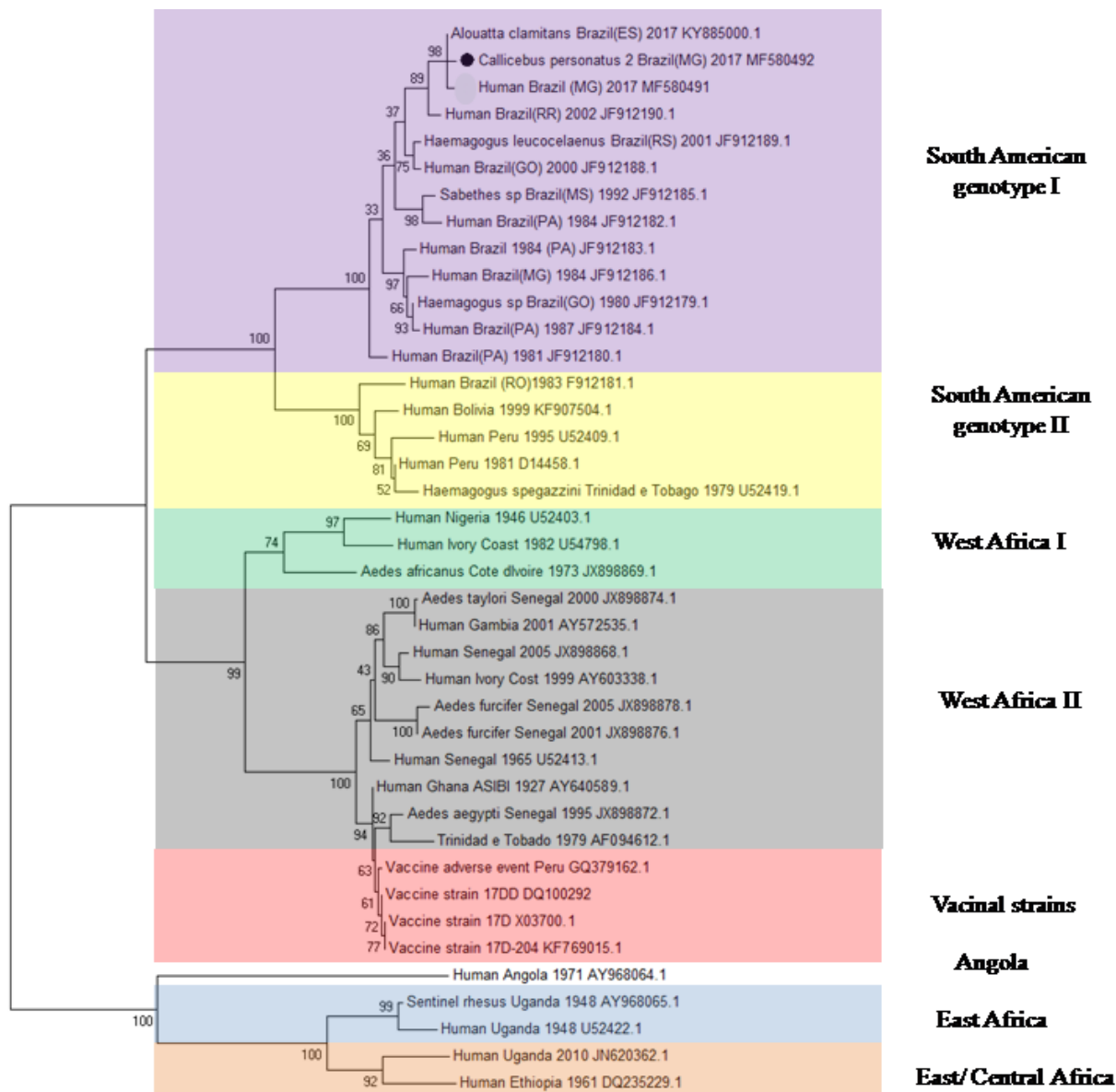


Figura 30 - Inferência filogenética construída a partir de 945 pb, da região CprM de YFV. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança, com 1.000 bootstrap e Akaike information criterion (AIC), com GTR+G no programa MEGA7 (<http://www.megasoftware.net>). O círculo preto indica a amostra deste estudo e os números ao longo dos ramos são valores de bootstrap. Para cada sequência, o hospedeiro, o local de origem e a data foram citados. Para as amostras brasileiras, também foi relatado o estado entre parênteses: Espírito Santo (ES); Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS); Minas Gerais (MG); Pará (PA); Rio Grande do Sul (RS); e Roraima (RR).

O genótipo Sul-americano I já foi detectado previamente no país, sendo responsável por surtos anteriores e atuais no Brasil (Bonaldo *et al.*, 2017; Mir *et al.*, 2017; Moreira-Soto *et al.*, 2018; Rezende *et al.*, 2018). As sequências obtidas neste estudo mostraram alta identidade entre elas e também com outras sequências de YFV de surtos anteriores no país. Além disso, a comparação das sequências de *Callicebus* com outra amostra de *Alouatta*, coletada no Espírito Santo em 2017, mostrou alta similaridade entre elas (Figura 30).

6.3.2.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS MOLECULARES E A NECROPSIA DOS PNHs

Em paralelo à detecção molecular de YFV nas amostras teciduais, a equipe da Clínica Veterinária Zoovet e da Bicho do Mato Consultoria realizou necropsias de alguns PNHs, que foram coletados em Conceição do Mato Dentro.

Análises moleculares detectaram a presença de genoma viral no coração, baço, pulmão, estômago e rim dos animais. Os principais sinais da doença em PNH incluíram icterícia, hemorragias, degeneração gordurosa do fígado e febre, sendo parte desses sinais observados no exame necroscópico (Brasil, 2005; Engelmann *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2016; Saúde, 2017) (Figura 31). Segundo um estudo recente, os sinais histopatológicos hepáticos associados à febre amarela nesses animais são similares ao que ocorrem em humanos, como necrose, corpos apoptóticos, esteatose e pouca inflamação celular (Engelmann *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2017).



Figura 31 - Fotos da necropsia de PNH. (A) Edema e hiperemia de pálpebra; (B) Presença de petéquias na mucosa gástrica e presença de sangue/coágulo no conteúdo gástrico; (C) Baço com aspecto hemorrágico (possível alteração *post-mortem*). Fonte: Figueiredo *et al.*, 2018.

Fazendo-se uma correlação entre a detecção do genoma viral nesses tecidos e as alterações macroscópicas observadas, sugere-se que essas alterações poderiam ser decorrentes da infecção viral nesses tecidos.

Até o momento, mais de 7.000 animais foram afetados durante esse último surto registrado no Brasil, dado que mostra a intensa circulação de YFV na população de PNH, podendo representar um risco para a conservação dessas espécies (Brasil, 2017d). Além disso, destaca-se a falta de dados literários sobre a evolução clínica da febre amarela em PNH, sendo este um dos poucos estudos que correlaciona dados moleculares e achados macroscópicos nesses animais.

Os gêneros que mais têm sido associados à ocorrência de epizootias de febre amarela no Brasil são *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix* (Brasil, 2005; Moreno et al., 2013). Esses gêneros são mais afetados, possivelmente pelas suas distribuições geográficas, predisposição clínica à febre amarela ou por características comportamentais. Das 10 espécies de *Alouatta*, a maioria está presente no bioma amazônico, mas também ocorrem no Cerrado e na Caatinga. Os *Cebus* são compostos por quatro espécies, sendo todas predominantemente descritas no bioma amazônico. Das seis espécies do gênero *Callithrix*, cinco ocorrem basicamente na Mata Atlântica com apenas uma espécie sendo encontrada também no Cerrado e na Caatinga (Figura 9) (Paglia et al., 2012).

6.3.2.4 CORRELAÇÃO GEOGRÁFICA DE EPIZOOTIAS E CASOS HUMANOS DE YFV

Com o intuito de demonstrar o panorama epidemiológico da febre amarela no estado de Minas Gerais, foi construído um mapa no qual foram correlacionados dados sobre os casos humanos, as epizootias e a cobertura vacinal para cada município mineiro. Para isso, foram utilizadas as informações disponibilizadas pelo Ministério da Saúde sobre cobertura vacinal e surtos notificados entre dezembro de 2016 a abril de 2017, época do início do surto de febre amarela no Brasil até a época de coleta dos PNHs positivos neste estudo. O programa Tabwin foi usado para a construção do mapa (Figura 32).

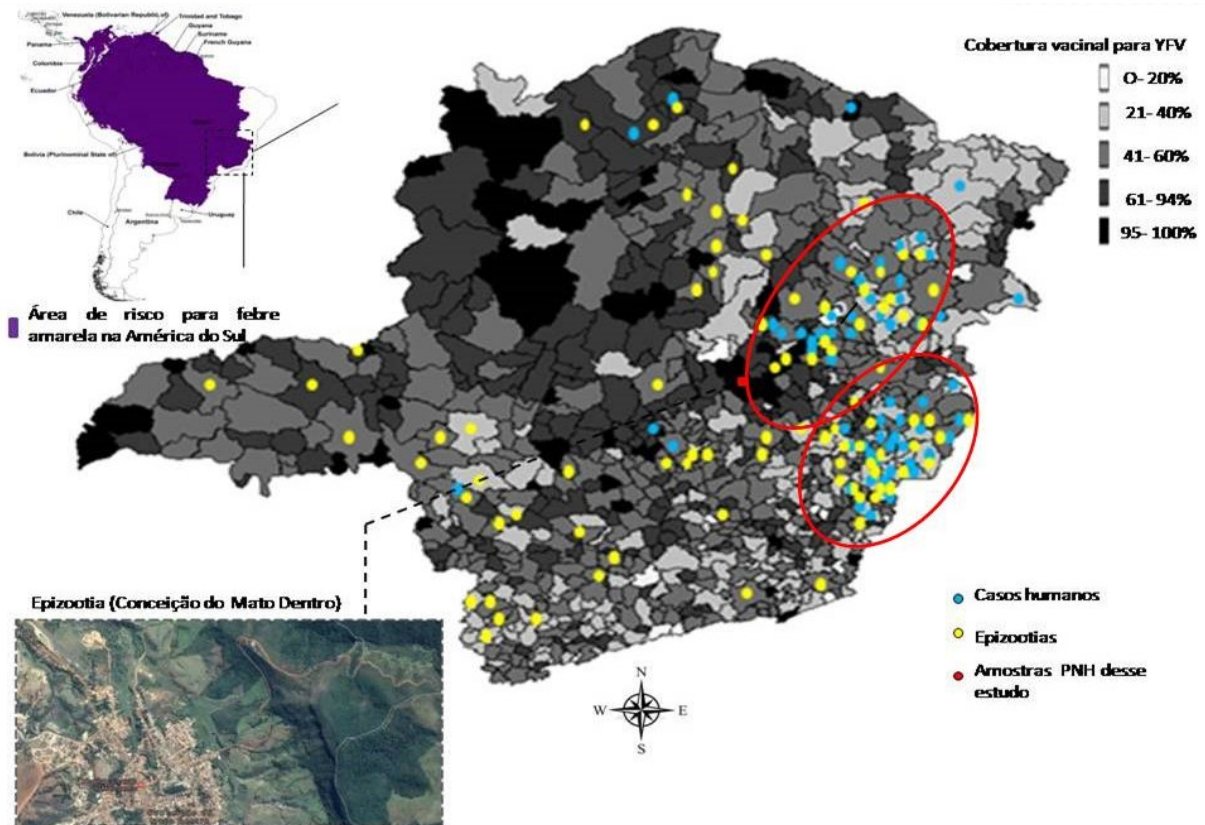


Figura 32 - Associação geográfica entre os casos humanos e as epizootias confirmadas de YFV em Minas Gerais em 2017. Mapa da América do Sul destacando, em áreas roxas, o risco para o YFV (WHO, 2017). Mapa de Minas Gerais evidenciando a cobertura vacinal por município (Brasil, 2017b). A cobertura vacinal é mostrada em escala de cinza. Pontos amarelos e azuis indicam, respectivamente, casos de epizootias e casos humanos confirmados (Brasil, 2017a). O ponto vermelho indica a área de coleta das amostras utilizadas neste estudo. Os círculos em vermelho destacam áreas com sobreposição de casos humanos e epizootias (*clusters*).

A partir da análise dos dados, pode-se perceber que grande parte dos municípios mineiros apresentava nesta época uma cobertura vacinal menor do que 95%, taxa preconizada como ideal pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2017c). Além disso, por meio da correlação de casos humanos e de epizootias, fica evidente a sobreposição de casos em muitos locais, formando dois *clusters*, sendo um deles próximo a Conceição do Mato Dentro, local da coleta das amostras de PNHs positivos para YFV (Figura 32).

Apesar de Conceição do Mato Dentro ter uma cobertura vacinal acima de 95%, ela é circundada por regiões com baixa cobertura vacinal e casos progressos de febre amarela, tal como a cidade do Serro, que apresenta 79% da população vacinada para febre amarela e notificação de 21 casos humanos, sendo cinco em 2002 e dezesseis em 2003 (SINAN 2017). Além disso, Conceição do Mato Dentro destaca se pela atividade mineradora, com intensos impactos ecológicos, que podem levar à alteração de *habitat* e outras mudanças que incluem movimento e dinâmica populacional dos primatas não humanos.

Estudos conduzidos por Faria *et al* (2018) também relatam a sobreposição de casos humanos e epizootias e através de estudos de modelagem estimaram que, em média, a distância entre a residência de um morador acometido por febre amarela e o *habitat* mais próximo, com potencial de transmissão viral, foi de 5.3 quilômetros.

Dados epidemiológicos apontam para uma dispersão viral no sentido da costa leste brasileira, na região do bioma de Mata Atlântica, que abriga uma ampla diversidade de primatas não humanos e de potenciais vetores silvestres e onde o vírus não era registrado há décadas (Moreira-Soto *et al.*, 2018) . Importante também destacar que nestas áreas a cobertura vacinal é baixa e a ocorrência de casos humanos poderia atuar como um retro-alimentador dos casos em PNH.

Devido à magnitude e rápida dispersão do YFV no último surto de febre amarela no Brasil, várias hipóteses têm sido levantadas na tentativa de melhor compreensão dessa dispersão viral. Uma hipótese é que a dispersão pode ter sido decorrente da movimentação de vetores, do deslocamento de pessoas ou do tráfico ilegal de primatas ou mesmo de outros animais que possam atuar como hospedeiros (Vasconcelos, 2010; Faria *et al.*, 2018).

Nas últimas quatro décadas, a degradação exacerbada de alguns ambientes naturais brasileiros acelerou o processo de desmatamento, o que levou algumas espécies de PNHs a se deslocarem para pequenas manchas de florestas na região sudeste do país. A alta densidade de PNHs mais adaptados a ambientes modificados, como sagüis e macacos pregos, combinada a áreas infestadas por *Haemagogus sp* podem também ter favorecido a propagação das ondas epizooticas do YFV silvestre para esta região e, conseqüentemente, infecção humana (Possas *et al.*, 2018). Vale destacar que os PNHs atuam como sentinelas para febre amarela, tendo assim um papel essencial para a vigilância da doença. Casos de epizootias vão direcionar as ações do sistema de saúde para áreas onde foram identificados casos epizooticos.

Em uma tentativa de contenção do surto recente de febre amarela, também foi proposta a vacinação dos PNHs que vivem nos arredores dos centros urbanos das grandes metrópoles, como Rio de Janeiro e São Paulo. Entretanto essa estratégia apresenta vários desafios que incluem: (1) Determinação da eficácia, segurança e a quantidade ideal de dose vacinal 17DD para cada espécie, de acordo com o peso e tamanho do animal; (2) Determinação da área na qual a vacinação será realizada, bem como o tamanho da população de primatas que vivem no local; (3) Determinação da logísticas de vacinação para garantir que todos os animais sejam vacinados

(Pinto *et al.*, 1993; Wolfe *et al.*, 2007; Massad *et al.*, 2018). Além das dificuldades técnicas essa estratégia também inclui altos gastos financeiros. O custo per capita da vacinação de humanos para febre amarela é estimado em US\$1,5. Assim, o valor estimado para a vacinação de 3 milhões pessoas, é de, aproximadamente, US\$4,5milhões. Já a vacinação de 2000 primatas, considerando os custos referentes à captura e da dose vacinal não sairia por menos de US\$200,00 por animal vacinado (Massad *et al.*, 2018).

6.3.2.5 PROSPECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-FLAVIVIRUS EM PNH

Para a prospecção de anticorpos anti-*Flavivirus* em PHN foram testados 27 soros de primatas da espécie *Cebbus apella* (hoje reclassificada como *Sapajus appela*, Gênero *Sapajus*, de acordo com Grooves, 2001), coletados entre os anos 2001 e 2002 em Tocantins (Tabela 3). Para os soros em que havia em pouca quantidade, as amostras foram testadas em pools, sendo cada pool composto por no máximo três amostras. O restante das amostras foi triado separadamente. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram média de redução maior ou igual a 50%, comparadas ao número de placas presentes no controle de vírus. Vale destacar que para a PRNT de roedores foi considerado um ponto de corte de 70%, em consonância com outros estudos que prospectam vírus que até então não são classificamente participantes da cadeia de transmissão viral. Como o YFV já é sabidamente conhecido como participante do ciclo de febre amarela, foi usado um ponto de corte de 50% na PRNT.

Assim como a sorologia realizada nas amostras de roedores, aqui também optou-se por utilizar o YFV para as reações de PRNT, tendo em vista que é o teste já padronizado no laboratório e que dentre os vírus de interesse nesta tese, é o que sabidamente circula no ambiente silvestre no Brasil, de onde provem grande parte das amostras analisadas nesse estudo.

Das 27 amostras testadas, duas apresentaram redução de 50% na PRNT, com título de 200 UN/ML (Figura 33), indicando assim uma exposição anterior a *Flavivirus*.

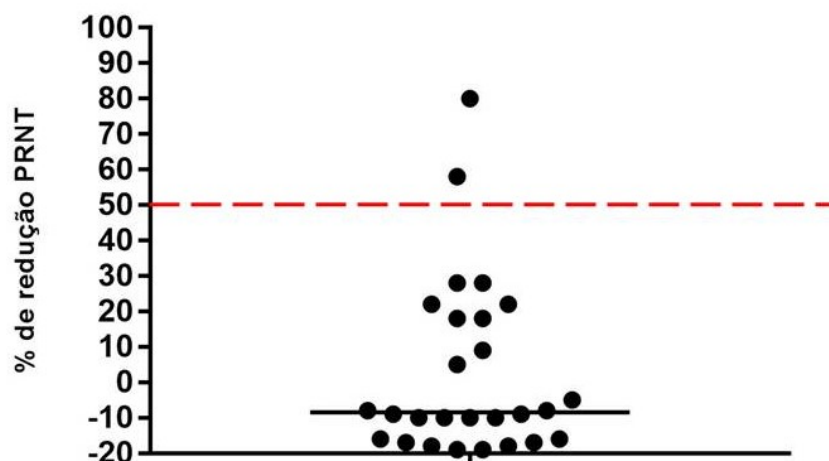


Figura 33-Porcentagem de redução na PRNT das amostras de PNH. Foi utilizado com ponto de corte uma redução de 50%, representado pela linha tracejada vermelha. A mediana está representada como uma linha contínua preta.

A presença de anticorpos neutralizantes nesses animais é um indício que eles foram expostos ao YFV ou outro *Flavivirus* circulante na região. Os *Flavivirus* são sorologicamente relacionados e mesmo utilizando a técnica de PRNT, considerada padrão ouro para detecção de anticorpos, não é possível distinguir a reatividade cruzada entre eles (De Oliveira-Filho *et al.*, 2018).

Segundo Cavalcante e colaboradores (2016) há relato de casos humanos de febre amarela em Tocantins, entre os anos de 2001 e 2002, período no qual esses animais podem ter sido expostos ao vírus, ou mesmo anteriormente a essa data, tendo em vista que até o 1999, grande parte dos surtos de YFV era restrita às regiões norte e centro oeste do país, principalmente na bacia Amazônica (Vasconcelos, 2003; Rezende *et al.*, 2018). Além disso, durante períodos interepidemicos podem haver epizootias, sem relato de casos humanos associados (Saúde, 2018a).

Nos meses finais de 1999 foram registrados surtos de febre amarela nos estados de Tocantins e Goiás que reportaram 16 e 11 casos, respectivamente (Vasconcelos, Costa, *et al.*, 2001). Já entre janeiro e julho de 2001 foram notificados 77 casos humanos de febre amarela, afetando sete estados distribuídos nas regiões norte, nordeste, central e sudeste do Brasil. Neste surto, o principal estado afetado foi Goiás com 65% dos casos humanos e relatos de epizootias em 49 municípios. Em Tocantins foram notificados 6 casos humanos com número desconhecido de epizootias (Vasconcelos, 2001; Costa, *et al.*, 2001).

Nas Américas, os gêneros mais comumente associados a febre amarela são *Alouatta*, *Cebus* e *Callitrix* (De Almeida *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2013). Esses animais apresentam um período viremico entre três e quatro dias com a morte podendo ocorrer entre três a sete dias (Brasil, 2005).

Por outro lado, os gêneros *Ateles*, *Saimiri* e *Sapajus*, parecem ser mais resistentes a infecção (Wolfe *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2010; Moreno *et al.*, 2013). Os *Sapajus* apresentam baixa taxa de letalidade, com um período viremico entre dois a seis dias e desenvolvem uma resposta imune contra esse vírus, corroborando os resultados aqui encontrados (Herver *et al.*, 1985; Moreno *et al.*, 2013). O maior período viremico desses animais faz com que eles se exponham aos vetores por um período maior, o que pode contribuir para a maior dispersão viral.

7.0 CONCLUSÃO

Este trabalho se insere no contexto da *disease ecology*, que é uma área de pesquisa que visa compreender a fluida e complexa interação entre hospedeiro, patógeno e o ambiente e que resultam na emergência de doenças infecciosas. Por meio da compreensão dessas interações é possível intervir para prevenir, mitigar e ampliar a oportunidade de controle das DIES. Diante disso, esta tese propôs uma tentativa de melhor compreensão da cadeia de transmissão do DENV e da YFV e norteou-se na hipótese da circulação de DENV em roedores e primatas não humanos, bem como a circulação de YFV em outros animais além dos primatas, sendo os roedores um grupo dos animais candidatos a isso. Para isso, foram analisadas através de abordagens sorológicas e moleculares, amostras de primatas, pequenos roedores e grandes roedores (capivaras) coletados em diferentes ambientes, biomas e estados brasileiros.

Não foram detectadas evidências da circulação DENV e YFV nos pequenos roedores e capivaras. Entretanto, dados literários já apontam para circulação desses vírus em roedores em país vizinho ao Brasil. Dessa forma, este resultado pode ser devido à não susceptibilidade das espécies analisadas ou mesmo a não circulação desses vírus nas espécies e ambientes aqui contemplados.

Também não foram detectadas evidências da circulação de DENV em PNH, o que pode ser discutido à luz de vários fatores que incluem o número amostral reduzido e restrito a poucos gêneros ou mesmo à não susceptibilidade das espécies analisadas.

A análise genômica dos fragmentos gênicos de YFV de dois *Callicebus personatus* coletados em Conceição do Mato Dentro, área de transição entre Cerrado e Mata Atlântica, demonstrou a circulação do genótipo sul Americano I, além de alta identidade com sequências de YFV do atual surto de febre amarela derivadas de humanos e PNH de vários estados brasileiros. A correlação dos dados moleculares e as alterações morfológicas observadas nas necropsias dos animais sugerem que as alterações foram decorrentes do intenso processo de multiplicação viral nos tecidos analisados. Em adição, a correlação geográfica de casos humanos e epizootias em Minas Gerais, na época de coleta das amostras de PNH, evidenciou a sobreposição de casos em muitos locais, formando dois *clusters*, sendo um deles próximo a Conceição do Mato Dentro.

Apesar da febre amarela ser letal para grande parte dos primatas do novo mundo, dois animais da espécie *Cebus apella* (gênero *Sapajus*) coletados entre 2001 e 2002 em Tocantins, no bioma Amazônico, apresentaram anticorpos contra *Flavivirus*, corroborando os dados literários que afirmam a maior resistência desse gênero ao YFV e os diferentes grau de susceptibilidade dos primatas brasileiros a este vírus.

Entre 2016 e 2018 foram confirmadas cerca de 2.300 epizootias por YFV no Brasil, dado que mostra a intensa circulação desse vírus na população de PNH, podendo inclusive representar um risco para a conservação dessas espécies. Dados epidemiológicos apontam para uma dispersão viral no sentido da costa leste brasileira, na região do bioma Mata Atlântica, que abriga uma ampla diversidade de primatas não humanos e de potenciais vetores silvestres e onde o vírus não era registrado há décadas.

8.0 REFERENCIAS

ABRAHÃO, J. S. et al. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*, v. 16, n. 6, p. 976-9, Jun 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507750> >.

AGUIRRE, A. A.; TABOR, G. M. Global factors driving emerging infectious diseases. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1149, p. 1-3, Dec 2008. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120161> >.

AHMED, Q. A.; MEMISH, Z. A. Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. *Trop Doct*, v. 47, n. 2, p. 92-96, Apr 2017. ISSN 1758-1133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424031> >.

ALEXANDER, R. M. Evolution. Enhanced: A rodent as big as a buffalo. *Science*, v. 301, n. 5640, p. 1678-9, Sep 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500968> >.

ALLEN, T. et al. Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nat Commun*, v. 8, n. 1, p. 1124, Oct 2017. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066781> >.

ALMEIDA, M. Vigilância da Febre Amarela e outras arboviroses através do monitoramento de primatas não humanos de vida livre no Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008.

AMARILLA, A. A. et al. Ilheus and Saint Louis encephalitis viruses elicit cross-protection against a lethal Rocio virus challenge in mice. *PLoS One*, v. 13, n. 6, p. e0199071, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29897990> >.

ANDRAL, L. et al. [Studies on yellow fever in Ethiopia. 3. Serological and virological studies of the woodland fauna]. *Bull World Health Organ*, v. 38, n. 6, p. 855-61, 1968. ISSN 0042-9686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5303661> >.

ARAÚJO, J. M. et al. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*, v. 9, n. 4, p. 716-25, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010450> >.

AUGUSTE, A. J. et al. Enzootic transmission of yellow fever virus, Venezuela. *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 1, p. 99-102, Jan 2015. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531105> >.

AUGUSTE, A.J. et al. Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol*, v. 84, n. 19, p. 9967-77, Oct 2010. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631128> >.

ÁZARA, T. M. F. Detecção De *Dengue virus* Em *Aedes albopictus* E Pequenos Mamíferos De Fragmento Florestal Urbano (tese): Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais 2013.

BANU, S. et al. Dengue transmission in the Asia-Pacific region: impact of climate change and socio-environmental factors. *Trop Med Int Health*, v. 16, n. 5, p. 598-607, May 2011. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320241> >.

BARCELLOS, C.; LOWE, R. Expansion of the dengue transmission area in Brazil: the role of climate and cities. *Trop Med Int Health*, v. 19, n. 2, p. 159-68, Feb 2014. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286460> >.

BARCELOS FIGUEIREDO, L. et al. Dengue virus 2 American-Asian genotype identified during the 2006/2007 outbreak in Piauí, Brazil reveals a Caribbean route of introduction and dissemination of dengue virus in Brazil. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e104516, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25127366> >.

BARRETT, A. D. Yellow Fever in Angola and Beyond--The Problem of Vaccine Supply and Demand. *N Engl J Med*, v. 375, n. 4, p. 301-3, Jul 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27276108> >.

BARRETT, A. D. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*, Mar 2017. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28366605> >.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*, v. 52, p. 209-29, 2007. ISSN 0066-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16913829> >.

BARRETT, A. D.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*, v. 21, n. 3, p. 308-13, Jun 2009. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520559> >.

BATES, M.; ROCA-GARCIA, M. Experiments with various Colombian marsupials and primates in laboratory cycles of yellow fever. *Am J Trop Med Hyg*, v. 26, p. 437-53, Jul 1946. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20996628> >.

BATISTA, P. Seroepidemiological Monitoring In Sentinela Animals And Vectors As Part Of Arbovirus Surveillance In The State Of Mato Grosso Do Sul, Brazil: *Revista brasileira de medicina tropical*: 168-173 p. 2012.

BATISTA, P. 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* 2013.

BEATY, B. J.; TESH, R. B.; AITKEN, T. H. Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, v. 29, n. 1, p. 125-32, Jan 1980. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6766282> >.

BELLO, A. et al. La Brucelosis en los animais salvajes: I.EL Chiguire. (*Hydrochoerus hydrochaeris*): *Veterinaria tropical*: 117-128 p. 1974.

BELMUSTO-WORN, V. E. et al. Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arilvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, v. 72, n. 2, p. 189-97, Feb 2005. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741556> >.

BERNS, D. S.; RAGER, B. Emerging infectious diseases: a cause for concern. *Isr Med Assoc J*, v. 2, n. 12, p. 919-23, Dec 2000. ISSN 1565-1088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344776> >.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266> >.

BHUTTA, Z. A. et al. Global burden, distribution, and interventions for infectious diseases of poverty. *Infect Dis Poverty*, v. 3, p. 21, 2014. ISSN 2049-9957. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110585> >.

BONALDO, M. C. et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 6, p. 447-451, Jun 2017. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28591405> >.

BONEBRAKE, T. C. et al. Managing consequences of climate-driven species redistribution requires integration of ecology, conservation and social science. *Biol Rev Camb Philos Soc*, Jun 2017. ISSN 1469-185X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28568902> >.

BONIZZONI, M. et al. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 9, p. 460-468, 2013.

BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 8, p. e1760, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22880140> >.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: History of control in Brazil: *Epidemiologia e serviço de saúde*: 113-118 p. 2007.

BRASIL. Manual de vigilância de epizootias em primatas não humanos. Brasília DF.: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1º edição 2005.

BRASIL. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação. Ministério da Saúde. Brasília. 2º edição: 79-83 p. 2008.

BRASIL. Boletim de atualização – Dezembro/2009 Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009). Ministério da Saúde. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. Ministério da Saúde. Brasil. único: 1-21 p. 2016.

BRASIL. Atualização sobre a investigação de casos suspeitos de febre amarela silvestre, Minas Gerais, 2017 Secretaria de saúde do estado de Minas Gerais. 2017a.

BRASIL. Cobertura Vacinal de febre amarela, por município, no período de 2007 a 2016, Minas Gerais, 2017b. Disponível em: < <http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/page/1615-febre-amarela-2017> >. Acesso em: 16 de Maio de 2017.

BRASIL. Informe Especial Febre Amarela No Brasil Nº 01/2017 Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde 2017c.

BRASIL. Ministério da Saúde anuncia fim do surto de febre amarela, mas alerta para o próximo verão.: Ministério da Saúde 2017d.

BROWN, J. E. et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, v. 68, n. 2, p. 514-25, Feb 2014. ISSN 1558-5646. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24111703> >.

BRYANT, J. E.; BARRETT, A. D. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v. 39, n. 2, p. 103-18, Nov 2003. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625093> >.

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog*, v. 3, n. 5, p. e75, May 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17511518> >.

CALDAS IR, Camacho LA, Freire MS, Torres CR, Martins RM, Homma A, et al. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine (Guildford)*. 2014; 32: 4977-84.

CAMPI-AZEVEDO AC, Teixeira-Carvalho A, Antonelli LR, Fonseca CT, Villela-Rezende G, Santos RA, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(6): 491-502.

CARVALHO, A.G.O. Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra flavivírus. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE/CCB-2015-106, Recife, 2015.

CALISHER, C. H. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*, v. 70 (Pt 1), p. 37-43, Jan 1989. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543738> >.

CARRINGTON, C. V.; AUGUSTE, A. J. Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infect Genet Evol*, v. 13, p. 198-210, Jan 2013. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981999> >.

CATROXO, M. et al. Detection Of Coronavirus In Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) by Transmission Electron Microscopy, In São Paulo, Brazil. *Morphology Journal*. 28: 549-555 p. 2010.

CAUSEY, O. R.; KUMM, H. W.; LAEMMERT, H. W. Dispersion of forest mosquitoes in Brazil; further studies. *Am J Trop Med Hyg*, v. 30, n. 2, p. 301-12, Mar 1950. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15419408> >.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 26, n. 3, p. 617-620, 2017 Jul-Sep 2017. ISSN 2237-9622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977185> >.

CDC. Centers for disease Control and Prevention. Areas with Risk of Yellow Fever Virus Transmission in South America. Disponível em: < https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south_america.html >.

CHAN, M. Yellow fever: the resurgence of a forgotten disease. *Lancet*, v. 387, n. 10034, p. 2165-6, May 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27229187> >.

CHANG, G. J. et al. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J Virol*, v. 69, n. 9, p. 5773-80, Sep 1995. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637022> >.

CHAPMAN, C.; PERES, C. Primate conservation in the new millennium: the role of scientists: *Evolutionary Anthropology* 2001.

CHU, M. C.; O'ROURKE, E. J.; TRENT, D. W. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. *J Gen Virol*, v. 70 (Pt 7), p. 1701-12, Jul 1989. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2738579> >.

CIGARROA-TOLEDO, N. et al. Serologic Evidence of Flavivirus Infections in Peridomestic Rodents in Merida, Mexico. *J Wildl Dis*, v. 52, n. 1, p. 168-72, Jan 2016. ISSN 1943-3700. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26540177> >.

CONSOLI, R.; OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz 1994.

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

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infect Genet Evol*, v. 12, n. 2, p. 309-14, Mar 2012. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226705> >.

COSTA, Z. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil *Revista Pan-Amazônica de Saúde Ananindeua*. 2: 11-26 p. 2011.

COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 4848, Jul 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687779> >.

COUTTS, C.; HAHN, M. Green Infrastructure, Ecosystem Services, and Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, v. 12, n. 8, p. 9768-98, Aug 2015. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26295249> >.

CHRISTIAN, K.A. et al. What We Are Watching—Top Global Infectious Disease Threats, 2013-2016: An Update from CDC’s Global Disease Detection Operations Center. *Health Security*, vol. 15, Number 5, 2017, DOI: 10.1089/hs.2017.0004.

CUCUNAWANGSIH; LUGITO, N. P. H. Trends of Dengue Disease Epidemiology. *Virology (Auckl)*, v. 8, p. 1178122X17695836, 2017. ISSN 1178-122X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28579763> >.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. *Curr Opin Immunol*, v. 48, p. 1-6, Jul 2017. ISSN 1879-0372. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28738211> >.

CUTLER, S. J. Refugee crisis and re-emergence of forgotten infections in Europe. *Clin Microbiol Infect*, v. 22, n. 1, p. 8-9, Jan 2016. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493842> >.

DAVIES, T. J.; PEDERSEN, A. B. Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc Biol Sci*, v. 275, n. 1643, p. 1695-701, Jul 2008. ISSN 0962-8452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445561> >.

DE ALMEIDA, M. A. et al. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *Am J Primatol*, v. 74, n. 1, p. 68-76, Jan 2012. ISSN 1098-2345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020690> >.

DE ASSIS, F. L. et al. Serologic evidence of orthopoxvirus infection in buffaloes, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 18, n. 4, p. 698-700, Apr 2012. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22469217> >.

DE ARAÚJO, J. M. et al. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 9, p. e1784, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970331> >.

DE MADRID, A. T.; PORTERFIELD, J. S. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol*, v. 23, n. 1, p. 91-6, Apr 1974. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4833603> >.

DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695666> >.

DE OLIVEIRA-FILHO, E. F. et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transbound Emerg Dis*, v. 65, n. 4, p. 1094-1097, Aug 2018. ISSN 1865-1682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29424106> >.

DE SOUZA, R. P. et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 5, n. 12, p. e1439, Dec 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22216365> >.

DE THOISY, B.; DUSSART, P.; KAZANJI, M. Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French

Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 98, n. 7, p. 409-12, Jul 2004. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138077> >.

DE THOISY, B. et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 9, n. 2, p. 157-70, Apr 2009. ISSN 1557-7759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945183> >.

DEARING, M. D.; DIZNEY, L. Ecology of hantavirus in a changing world. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1195, p. 99-112, May 2010. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536819> >.

DENNEHY, J. J. Evolutionary ecology of virus emergence. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1389, n. 1, p. 124-146, Feb 2017. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28036113> >.

DESCLOUX, E. et al. Climate-based models for understanding and forecasting dengue epidemics. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 2, p. e1470, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348154> >.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci*, v. 5, p. 14, 2018. ISSN 2297-1769. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29484301> >.

DEUBEL, V. et al. Genetic heterogeneity of yellow fever virus strains from Africa and the Americas. *J Gen Virol*, v. 67 (Pt 1), p. 209-13, Jan 1986. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3944583> >.

DORNAS, F. P. et al. Mimivirus circulation among wild and domestic mammals, Amazon Region, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 20, n. 3, p. 469-72, Mar 2014. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564967> >.

DOS SANTOS, C. N. et al. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res*, v. 35, n. 1, p. 35-41, Jan 1995. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7754673> >.

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 Res*, v. 90, n. 1-2, p. 197-205, Dec 2002. ISSN 0168-1702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457974> >.

DUTRA, Lara Ambrosio Leal ; De Freitas Almeida, Gabriel Magno ; Oliveira, Grazielle Pereira ; Abrahão, Jônatas Santos ; Kroon, Erna Geessien ; Trindade, Giliane de Souza . Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Archives of Virology*.2016

EASTWOOD, G. et al. Enzootic Circulation of Chikungunya Virus in East Africa: Serological Evidence in Nonhuman Kenyan Primates. *Am J Trop Med Hyg*, Sep 2017. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29016323> >.

ENGELMANN, F. et al. "Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model." 2014. *PLoS Negl Trop Dis* 8 (11):e3295. doi: 10.1371/journal.pntd.0003295. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25412185>>.

EPSTEIN, P. R. Emerging diseases and ecosystem instability: new threats to public health. *Am J Public Health*, v. 85, n. 2, p. 168-72, Feb 1995. ISSN 0090-0036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856775> >.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*, v. 546, n. 7658, p. 406-410, 06 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538727> >.

FERES, V. C. et al. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol*, v. 37, n. 3, p. 179-83, Nov 2006. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962821> >.

FERNANDES N, CUNHA M, GUERRA J, RÉSSIO R, CIRQUEIRA C, IGLESIAS S, et al. Outbreak of Yellow Fever among Nonhuman Primates, Espírito Santo, Brazil, 2017. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(12):2038-2041. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.3201/eid2312.170685> >.

FIALHO, M.; GONÇALVES, G. Primates da RPPN Gargaú, Paraíba, Brasil Neotropical Primates Conservation International 2008.

FIGUEIREDO, L.; CAVALCANTE, S.; SIMÕES, M. Dengue Serologic Survey of School Children in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987: Bulletin of the World Health Organization 1990.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 40, n. 2, p. 224-9, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894>>.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Detection and Molecular Characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. *Ecohealth*, Aug 2018. ISSN 1612-9210. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30117000>>.

FIGUEIREDO, R. M. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 14, n. 4, p. 667-9, Apr 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394292>>.

FONNESBECK, C. J. et al. Measles outbreak response decision-making under uncertainty: a retrospective analysis. *J R Soc Interface*, v. 15, n. 140, Mar 2018. ISSN 1742-5662. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29563241>>.

FOURNET, F. et al. The Influence of Urbanization Modes on the Spatial Circulation of Flaviviruses within Ouagadougou (Burkina Faso). *Int J Environ Res Public Health*, v. 13, n. 12, Dec 2016. ISSN 1660-4601. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27973402>>.

FORATTINI O. *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp; 2002.

FRANCO-LUIZ, A. P. et al. The detection of Vaccinia virus confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 46, p. 16-9, Jun 2016. ISSN 1878-1667. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27260805>>.

GARSKE, T. et al. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med*, v. 11, n. 5, p. e1001638, May 2014. ISSN 1549-1676. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800812>>.

GERSHMAN, M. D.; STAPLES, J. E. Yellow Fever. *Centers for Disease Control and Prevention*, January 4, 2017 2017. Disponível em: <

<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
>. Acesso em: 19 de Março de 2017.

GIBBS, E. P. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Vet Rec*, v. 174, n. 4, p. 85-91, Jan 2014. ISSN 2042-7670. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464377>>.

GITHEKO, A. K. et al. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, v. 78, n. 9, p. 1136-47, 2000. ISSN 0042-9686. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11019462>>.

GOMES, I.; ROSENBERG, F. A possible role of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in foot and mouth disease (FMD) endemicity: *Preventive Veterinary Medicine*: 197-205 p. 1984.

GONÇALVES DIAS, H. et al. Investigação Molecular De Flavivírus Em Mamíferos Silvestres De Vida Livre Em Parques Urbanos Da Região Centro-Oeste Do Brasil. 2018. resumo publicado na 54º Congresso da sociedade de medicina tropical . Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/327704132_investigacao_molecular_de_flavivirus_em_mamiferos_silvestres_de_vida_livre_em_parques_urbanos_da_regiao_centro-oeste_do_brasil>

GONCALVEZ, A. P. et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, v. 303, n. 1, p. 110-9, Nov 2002. ISSN 0042-6822. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482662>> .

GREEN, A. Yellow fever continues to spread in Angola. *Lancet*, v. 387, n. 10037, p. 2493, Jun 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27353673>> .

GRITSUN, T. S.; LASHKEVICH, V. A.; GOULD, E. A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*, v. 57, n. 1-2, p. 129-46, Jan 2003. ISSN 0166-3542. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615309>> .

GROVES, C.P. (2005). Wilson, D.E.; Reeder, D.M. (eds.), ed. *Mammal Species of the World* 3 ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp. 136–138. ISBN 978-0-8018-8221-0. OCLC 62265494

GUBERNOT, D. M.; BOYER, B. L.; MOSES, M. S. Animals as early detectors of bioevents: veterinary tools and a framework for animal-human integrated zoonotic disease surveillance.

Public Health Rep, v. 123, n. 3, p. 300-15, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0033-3549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006972> >.

GUBLER, D. J. The economic burden of dengue. Am J Trop Med Hyg, v. 86, n. 5, p. 743-4, May 2012. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556068> >.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flavivirus. Philadelphia: Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007. 1155-1252.

GUMUSOVA, S.; SUNBUL, M.; LEBLEBICIOGLU, H. Ebola virus disease and the veterinary perspective. Ann Clin Microbiol Antimicrob, v. 14, p. 30, May 2015. ISSN 1476-0711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018030> >.

GUINDON S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology 59(3):307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

GUZMAN, M. G. et al. Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. Emerg Infect Dis, v. 13, n. 2, p. 282-6, Feb 2007. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17479892> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. Nat Rev Dis Primers, v. 2, p. 16055, 08 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534439> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. Lancet, v. 385, n. 9966, p. 453-65, Jan 2015. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25230594> >.

GÓMEZ, J. M.; NUNN, C. L.; VERDÚ, M. Centrality in primate-parasite networks reveals the potential for the transmission of emerging infectious diseases to humans. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 110, n. 19, p. 7738-41, May 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610389> >.

HAHN, C. S. et al. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, n. 7, p. 2019-23, Apr 1987. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3470774> >.

HAMRICK, P. N. et al. Geographic patterns and environmental factors associated with human yellow fever presence in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 11, n. 9, p. e0005897, Sep 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28886023> >.

HAN, B. A. et al. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, n. 22, p. 7039-44, 06 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26038558> >.

HARDY, J. L. et al. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*, v. 28, p. 229-62, 1983. ISSN 0066-4170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6131642> >.

HARRINGTON, L. C. et al. Age-dependent survival of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) demonstrated by simultaneous release-recapture of different age cohorts. *J Med Entomol*, v. 45, n. 2, p. 307-13, Mar 2008. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402147> >.

HAYES, E. B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine*, v. 28, n. 51, p. 8073-6, Nov 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971115> >.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol*, v. 55, n. 4, p. 289-95, Dec 2012. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999801> >.

HERVÉ JP, Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Sá Filho GC. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. *Hiléia Méd*. 1985;7:31-40.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. The potential for the establishment of new arbovirus transmission cycles in Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 109, n. 9, p. 543-4, Sep 2015. ISSN 1878-3503. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246250> >.

HJELLE, B.; GLASS, G. E. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Niño-southern oscillation. *J Infect Dis*, v. 181, n. 5,

p. 1569-73, May 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10823755> >.

HOLBROOK, M. R. et al. An animal model for the tickborne flavivirus--Omsk hemorrhagic fever virus. *J Infect Dis*, v. 191, n. 1, p. 100-8, Jan 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15593010> >.

HOLZMANN, I. et al. Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am J Primatol*, v. 72, n. 6, p. 475-80, Jun 2010. ISSN 1098-2345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20095025> >.

HUCHON, D. et al. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Mol Biol Evol*, v. 19, n. 7, p. 1053-65, Jul 2002. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082125> >.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/> > Acesso em: 20 Novembro de 2017.

JENTES, E. S. et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis*, v. 11, n. 8, p. 622-32, Aug 2011. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798462> >.

JIANG, T. et al. Co-circulation of two genotypes of dengue virus serotype 3 in Guangzhou, China, 2009. *Virol J*, v. 9, p. 125, Jun 2012. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22721418> >.

JOHANSSON, M. A. et al. Incubation periods of Yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg*, v. 83, n. 1, p. 183-8, Jul 2010. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595499> >.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, v. 451, n. 7181, p. 990-3, Feb 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288193> >.

JORGE, T. R. et al. Isolation and characterization of a Brazilian strain of yellow fever virus from an epizootic outbreak in 2009. *Acta Trop*, v. 166, p. 114-120, Feb 2017. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818122> >.

JUNG, L. et al. Effects of Local Habitat Variation on the Behavioral Ecology of Two Sympatric Groups of Brown Howler Monkey (*Alouatta clamitans*). PLoS One, v. 10, n. 7, p. e0129789, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147203> >.

KARABATSOS, N. International Catalogue of Arboviruses including Certain Other Viruses of Vertebrates HYGIENE, A. S. O. T. M. A. San Antonio 1995.

KARESH, W. B. et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. Lancet, v. 380, n. 9857, p. 1936-45, Dec 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200502> >.

KEESING, F. et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature, v. 468, n. 7324, p. 647-52, Dec 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124449> >.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. J Immunol Res, v. 2016, p. 6803098, 2016. ISSN 2314-7156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525287> >.

KILPATRICK, A. M. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. Science, v. 334, n. 6054, p. 323-7, Oct 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021850> >.

KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. Lancet, v. 380, n. 9857, p. 1946-55, Dec 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200503> >.

KLEMPA, B. Hantaviruses and climate change. Clin Microbiol Infect, v. 15, n. 6, p. 518-23, Jun 2009. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604276> >.

KLUNGTHONG, C. et al. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. J Virol Methods, v. 154, n. 1-2, p. 175-81, Dec 2008. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778736> >.

KOHL, C. et al. Use of RNALater(®) Preservation for Virome Sequencing in Outbreak Settings. Front Microbiol, v. 8, p. 1888, 2017. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018436> >.

KOWALEWSKI, M. M. et al. Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. *Am J Primatol*, v. 73, n. 1, p. 75-83, Jan 2011. ISSN 1098-2345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084672> >.

KRAMER, L. D.; EBEL, G. D. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res*, v. 60, p. 187-232, 2003. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689695> >.

KREUDER JOHNSON, C. et al. Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. *Sci Rep*, v. 5, p. 14830, Oct 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445169> >.

KUKRETI, H. et al. Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. *Virology*, v. 6, p. 1, Jan 2009. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126194> >.

KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol*, v. 4, n. 2, p. 121-7, Apr 1992. ISSN 1044-5323. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617166> >.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol*, v. 62, p. 71-92, 2008. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429680> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, v. 30, n. 3, p. 545-51, Mar 1992. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617> >.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, v. 78 (Pt 9), p. 2279-84, Sep 1997. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292015> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, v. 75 (Pt 1), p. 65-75, Jan 1994. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113741> >.

LEAL, S. G., A. P. Romano, R. V. Monteiro, C. B. Melo, P. F. Vasconcelos, and M. B. Castro. 2016. "Frequency of histopathological changes in Howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil." *Rev Soc Bras Med Trop* 49 (1):29-33. doi: 10.1590/0037-8682-0363-2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27163561>>.

LEPINIEC, L. et al. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J Gen Virol*, v. 75 (Pt 2), p. 417-23, Feb 1994. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113765> >.

LEVINSON, J. et al. Targeting surveillance for zoonotic virus discovery. *Emerg Infect Dis*, v. 19, n. 5, p. 743-7, May 2013. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647732> >.

LEWIS, J. A. et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*, v. 197, n. 1, p. 216-24, Nov 1993. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8212556> >.

LIMA, M. A.; ROMANO-LIEBER, N. S.; DUARTE, A. M. Circulation of antibodies against yellow fever virus in a simian population in the area of Porto Primavera Hydroelectric Plant, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 52, n. 1, p. 11-6, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305949> >.

LINDAHL, J. F.; GRACE, D. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infect Ecol Epidemiol*, v. 5, p. 30048, 2015. ISSN 2000-8686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26615822> >.

LINDENBACH, B. D. *Flaviviridae: the viruses and their replication* Philadelphia: Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007.

LOEHLE, C. Social Barriers to Pathogen Transmission in Wild Animal Populations. *Ecology*, v. 76, n. 2, p. 326-335, 1995. ISSN 1939-9170. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2307/1941192/abstract> >.

LUIS, A. D. et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci*, v. 280, n. 1756, p. 20122753, Apr 2013. ISSN 1471-2954. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23378666> >.

MAEDA, A and MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *The Veterinary Journal*, 2013

MANDERSON, L. et al. Social research on neglected diseases of poverty: continuing and emerging themes. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, n. 2, p. e332, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19238216> >.

MANDL, J. N. et al. Reservoir host immune responses to emerging zoonotic viruses. *Cell*, v. 160, n. 1-2, p. 20-35, Jan 2015. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25533784> >.

MARQUES, J. C. B.-.; FREITAS, D. S. D. The Role Of Monkeys, Mosquitoes, And Humans In The Occurrence Of A Yellow Fever Outbreak In A Fragmented Landscape In South Brazil: Protecting Howler Monkeys Is A Matter Of Public Health: *Tropical Conservation Science*. 3: 48-89 p. 2010.

MASSAD, E.; MIGUEL, M. M.; COUTINHO, F. A. B. Is vaccinating monkeys against yellow fever the ultimate solution for the Brazilian recurrent epizootics? *Epidemiol Infect*, v. 146, n. 13, p. 1622-1624, Oct 2018. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30103835> >.

MATTINGLY, P. F. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I. Taxonom: and bionomics. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 51, n. 4, p. 392-408, Dec 1957. ISSN 0003-4983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13498658> >.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*, v. 166, p. 155-163, Feb 2017. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27876643> >.

MCCLOSKEY, B. et al. Emerging infectious diseases and pandemic potential: status quo and reducing risk of global spread. *Lancet Infect Dis*, v. 14, n. 10, p. 1001-10, Oct 2014. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189351> >.

MEERBURG, B. G.; SINGLETON, G. R.; KIJLSTRA, A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol*, v. 35, n. 3, p. 221-70, 2009. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19548807> >.

MELINO, S.; PACI, M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J*, v. 274, n. 12, p. 2986-3002, Jun 2007. ISSN 1742-464X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509079> >.

MENDEZ, J. A. et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology*, v. 7, p. 226, Sep 2010. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20836894> >.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*, v. 22, n. 3, p. 138-46, Mar 2014. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468533> >.

MILAGRE, B. Perfil sorológico de algumas infecções em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) capturadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. Universidade Federal de Viçosa: Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) 2004.

MILLS, J. N. Biodiversity loss and emerging infectious disease: An example from the rodent-borne hemorrhagic fevers *Biodiversity*, v. 7, n. 1, p. 9-17, 2006.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Disponível em: < <https://prefeitura.pbh.gov.br/> >, 2017a. Acesso em: 20 Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Conceição do Mato Dentro. Disponível em: < <http://cmd.mg.gov.br/> >, 2017b. Acesso em: 18 Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Contagem. Disponível em: < <http://www.contagem.mg.gov.br/> >, 2017c. Acesso em: 18 Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Ouro Preto. Disponível em: < <http://www.ouropreto.mg.gov.br/> >, 2017d. Acesso em: 21 Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Sabará. Disponível em: < <http://site.sabara.mg.gov.br/> >, 2017e. Acesso em: 2 Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal do Serro. Disponível em: < <http://www.serro.mg.gov.br/> >, 2017f. Acesso em: 23 de Setembro 2017.

MINAS GERAIS. Prefeitura Municipal de Catas Altas. Disponível em: < <http://catasaltas.mg.gov.br/> >, 2017g. Acesso em: 20 Setembro 2017.

MIR, D. et al. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 7385, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785067> >.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *The Veterinary Journal*, vol. 195, 33–40, 2013.

MONATH, T. P. Yellow fever and dengue - the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease *Seminars in virology*. 5: 133-145 p. 1994.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*, v. 1, n. 1, p. 11-20, Aug 2001. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871403> >.

MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res*, v. 60, p. 343-95, 2003. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689698> >.

MONTENEGRO, M. Ecologia de *Cebus flavius* (Schreber, 1774) em remanescentes de Mata Atlântica no estado da Paraíba. 2011. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Brasil.

MORENO, E. S. et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, São Paulo state, Brazil, 2008-2009. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 55, n. 1, p. 45-50, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328725> >.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, v. 430, n. 6996, p. 242-9, Jul 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241422> >.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, v. 1, n. 1, p. 7-15, 1995 Jan-Mar 1995. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8903148> >.

MORSE, S. S. et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet*, v. 380, n. 9857, p. 1956-65, Dec 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200504> >.

MOTA, M. T. et al. Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. *Braz J Microbiol*, v. 47 Suppl 1, p. 38-50, Dec 2016. ISSN 1678-4405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818091> >.

MURRAY, N. E.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, v. 5, p. 299-309, 2013. ISSN 1179-1349. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990732> >.

MUTEBI, J. P. et al. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region. *J Virol*, v. 78, n. 18, p. 9652-65, Sep 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331698> >.

MUTEBI, J. P. et al. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol*, v. 75, n. 15, p. 6999-7008, Aug 2001. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435580> >.

MYAT THU, H. et al. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. *Virology*, v. 336, n. 2, p. 163-72, Jun 2005. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15892958> >.

NAVA, A. et al. The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil. *ILAR J*, v. 58, n. 3, p. 393-400, Dec 2017. ISSN 1930-6180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29253158> >.

NEIDERUD, C. J. How urbanization affects the epidemiology of emerging infectious diseases. *Infect Ecol Epidemiol*, v. 5, p. 27060, 2015. ISSN 2000-8686. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26112265> >.

NIEDRIG M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health*. 1999; 4(12): 867-71.

NOGUEIRA, M.; CRUZ, T. Doenças de capivaras. Corumbá, MT: Embrapa Pantanal 2007.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 86, n. 2, p. 269, 1991 Apr-Jun 1991. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1842417> >.

NUNES, M. R. et al. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol*, v. 86, n. 24, p. 13263-71, Dec 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015713> >.

OLIVAL, K. J. et al. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*, v. 546, n. 7660, p. 646-650, 06 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28636590> >.

OLIVEIRA, D. B. et al. Evidence of Apeu Virus Infection in Wild Monkeys, Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, v. 94, n. 3, p. 494-6, Mar 2016. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26787153> >.

OLIVEIRA, M. F. et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 16, n. 3, p. 576-8, Mar 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202456> >.

OMS. Organização Mundial de Saúde, 2017. Disponível em: < <http://www.paho.org/bra/> >. Acesso em 9 de Setembro de 2017.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Y. Global research trends of yellow fever: A bibliometric overview. *J Infect Public Health*, Aug 2017. ISSN 1876-035X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864363> >.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Y.; PATIÑO-BARBOSA, A. M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. *F1000Res*, v. 6, p. 398, 2017. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28529708> >.

OSANAI, C. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima, Brazil, 1981-1982: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1983.

OSTFELD, S. R.; HOLT, D. R. Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2: 13-20 p. 2004.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flavivirus in Equines of the Pantanal, Brazil, PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

P.A.H.O.(Pan American Health Organization) Epidemiological Update: Yellow Fever. 23 March, Washington, D.C, 2017. Disponível em: < http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=3879 >.

PADMANABHA, H. et al. The interactive roles of Aedes aegypti super-production and human density in dengue transmission. PLoS Negl Trop Dis, v. 6, n. 8, p. e1799, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22953017> >.

PAGLIA, A.P., et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp.

PARRISH, C. R. et al. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. Microbiol Mol Biol Rev, v. 72, n. 3, p. 457-70, Sep 2008. ISSN 1098-5557. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772285> >.

PATEL, P. et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. Virol J, v. 10, p. 58, Feb 2013. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410000> >.

PESSANHA., J. E. M. Yellow Fever: A Vision Of The Current Scenario. Rev Medica de Minas Gerais 2009; 19(2): 97-102

PFISTER, M. et al. Immunogenicity and safety of BERNA-YF compared with two other 17D yellow fever vaccines in a phase 3 clinical trial. Am J Trop Med Hyg, v. 72, n. 3, p. 339-46, Mar 2005. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772332> >.

PHAN, T. G. et al. The fecal viral flora of wild rodents. PLoS Pathog, v. 7, n. 9, p. e1002218, Sep 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909269> >.

PIANTADOSI, A. et al. Emerging Cases of Powassan Virus Encephalitis in New England: Clinical Presentation, Imaging, and Review of the Literature. Clin Infect Dis, v. 62, n. 6, p. 707-

13, Mar 2016. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668338> >.

PIKE, J. et al. Economic optimization of a global strategy to address the pandemic threat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, n. 52, p. 18519-23, Dec 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512538> >.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; MORAES, M. A. An epidemic of yellow fever in Central Brazil, 1972-1973. II. Ecological studies. *Am J Trop Med Hyg*, v. 30, n. 1, p. 204-11, Jan 1981. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6111231> >.

PINTO, L. P. et al. Habitat, density and group size of primates in a Brazilian tropical forest. *Folia Primatol (Basel)*, v. 61, n. 3, p. 135-43, 1993. ISSN 0015-5713. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8206419> >.

PÉREZ, L. J. et al. Molecular epidemiology study of swine influenza virus revealing a reassorted virus H1N1 in swine farms in Cuba. *Prev Vet Med*, Feb 2015. ISSN 1873-1716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25745869> >.

POSADA D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253–1256. [https:// doi.org/10.1093/molbev/msn083](https://doi.org/10.1093/molbev/msn083)

RABELO, G. O Gênero *Akodon* (Rodentia, Cricetidae) – Principais Mecanismos Responsáveis Pela Variabilidade Cariotípica E Sua Possível Implicação Na Distribuição Das Espécies Ocorrentes No Estado Do Paraná Monografia- Universidade Federal Do Paraná 2007.

REIG, O. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae): *Revista Brasileira de Genética*: 333-365 p. 1984.

REITER, P. Yellow fever and dengue: a threat to Europe? *Euro Surveill*, v. 15, n. 10, p. 19509, Mar 2010. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403310> >.

RESTREPO, S. et al. Susceptibilidade del Chiguiro (*Hydrochoerus hydrochaeris*) al virus de estomatitis vesicular: *Revista ICA*. 15: 123-127 p. 1980.

REZENDE, I. M. Prospecção de Flavivirus em culicídeos e pequenos mamíferos, em Minas Gerais, Brasil. 2015. (mestrado). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juíz de Fora.

REZENDE, I. M. et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 12, n. 6, p. e0006538, 06 2018. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29864115> >.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, v. 174, n. 2, p. 479-93, Feb 1990. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2129562> >.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, v. 352, n. 9132, p. 971-7, Sep 1998. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752834> >.

ROBERTS, D. R. et al. Associations of arbovirus vectors with gallery forests and domestic environments in southeastern Bolivia. *Bull Pan Am Health Organ*, v. 18, n. 4, p. 337-50, 1984. ISSN 0085-4638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6525479> >.

ROMANO, A. et al. Febre Amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle Brasília: Epidemiologia e Serviços de Saúde 20: 101-106 p. 2011.

ROMANO, C. M. et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One*, v. 5, n. 7, p. e11811, Jul 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676363> >.

ROVESTI, M. et al. A short novel about the spread of two important diseases in history: syphilis and SARS. *J Biol Regul Homeost Agents*, v. 31, n. 2 Suppl. 2, p. 183-186, 2017 APR-JUN 2017. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28702980> >.

ROY CHOWDHURY, P. et al. Immunogenicity of Yellow Fever Vaccine Coadministered With MenAfriVac in Healthy Infants in Ghana and Mali. *Clin Infect Dis*, v. 61 Suppl 5, p. S586-93, Nov 2015. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26553692> >.

RUEDA, L. M. et al. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, v. 27, n. 5, p. 892-8, Sep 1990. ISSN 0022-2585. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231624> >.

SALLAM, M. F. et al. Systematic Review: Land Cover, Meteorological, and Socioeconomic Determinants of *Aedes* Mosquito Habitat for Risk Mapping. *Int J Environ Res Public Health*, v. 14, n. 10, Oct 2017. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29035317> >.

SAN MARTÍN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*, v. 82, n. 1, p. 128-35, Jan 2010. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20065008> >.

SANTOS, J. R. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine *Cryptococcosis*. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25392951> >.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Brasília: Guia de vigilância epidemiológica: 816 p. 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). 2014. Informe Epidemiológico da Dengue. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Portal de Saúde. 2017a. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/principal> >. Acesso em: 10 de Maio de 2017.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Boletim Epidemiológico SVS. 2017b. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/boletim-epidemiologico> >. Acesso em: 23 de outubro de 2017.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Situação Epidemiológica da febre amarela no Brasil. 2017c. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela> >. Acesso em: 10 de Abril de 2017.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 a. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/12/Informe-FA-21-11abr18-c.pdf> >. Acesso em 10 de Abril de 2017.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 b.Informe nº27. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela> >. Acesso em: Outubro de 2018.

SAÚDE, M. (Ministério da Saúde). Guia De Vigilância De Epizootias Em Primatas Não Humanos e Entomologia Aplicada à Vigilância Da Febre Amarela. Brasília, 2017. Disponível em: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epizootias_primatas_entomologia.pdf >. Acesso em 8 de Maio de 2017.

SCHATZMAYR, H. G.; Nogueira, R. M.; Travassos Da Rosa, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 81, n. 2, p. 245-6, 1986 Apr-Jun 1986. ISSN 0074-0276. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587006>>.

SHEPARD, D. S.; Undurraga, E. A.; Halasa, Y. A. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. PLoS Negl Trop Dis, v. 7, n. 2, p. e2055, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437406> >.

SHEPARD, D. S. et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. Lancet Infect Dis, v. 16, n. 8, p. 935-41, Aug 2016. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091092> >.

SILVA, L.; ANGERAMI, R. Viroses Emergentes No Brasil. In: (Ed.): Editora FIOCRUZ, 2008. p.132.

SINAN. Sistema de informações de Agravos de notificação. 2017. <https://http://sinan.saude.gov.br/sinan>. Acesso em: 20 Novembro de 2017

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and other emerging flaviviruses. J Infect, v. 42, n. 2, p. 104-15, Feb 2001. ISSN 0163-4453. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531316> >.

STEWART IBARRA, A. M. et al. Dengue vector dynamics (*Aedes aegypti*) influenced by climate and social factors in Ecuador: implications for targeted control. PLoS One, v. 8, n. 11, p. e78263, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324542> >.

STOCK, N. K. et al. Biological and phylogenetic characteristics of yellow fever virus lineages from West Africa. *J Virol*, v. 87, n. 5, p. 2895-907, Mar 2013. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269797> >.

SUAYA, J. A. et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg*, v. 80, n. 5, p. 846-55, May 2009. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407136> >.

TAM, C. C.; Khan, M. S.; Legido-Quigley, H. Where economics and epidemics collide: migrant workers and emerging infections. *Lancet*, v. 388, n. 10052, p. 1374-1376, Oct 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27639953> >.

TEMPORAO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 17, n. 5, p. 938-40, May 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529421> >.

TWIDDY, S. S. et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, v. 298, n. 1, p. 63-72, Jun 2002. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093174> >.

VACCINE, C. G. F. S. O. Y. F. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D-213/77 in children nine-23 months old. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 771-80, Sep 2015. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517656> >.

VASCONCELOS, P. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Brazil. 36: 275-293 p. 2003.

VASCONCELOS, P. et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994.: *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1995.

VASCONCELOS, P. F. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev Saúde Publica*, v. 44, n. 6, p. 1144-9, Dec 2010. ISSN 1518-8787. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109907> >.

VASCONCELOS, P. F. et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol*, v. 65, n. 3, p. 598-604, Nov 2001. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11596099> >.

VASCONCELOS, P. F. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cad Saúde Publica*, v. 17 Suppl, p. 155-64, 2001. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426277> >.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever: reflections on the disease, prospects for the century and risk of re-urbanization. *Rev. Bras. Epidemiol.* 5: 244-258 p. 2002.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol*, v. 9, n. 7, p. 532-41, Jun 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666708> >.

VASILAKIS, N. et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*, v. 358, n. 2, p. 402-12, Feb 2007. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014880> >.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol*, v. 22, p. 30-35, Feb 2017. ISSN 1879-6265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27936448> >.

VILELA, A. Circulação espaço-temporal de *Dengue virus* em mosquitos e humanos: situação de Caratinga, MG, Brasil, 2010-2011 2013. (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. Evolutionary history of Dengue virus type 4: insights into genotype phylodynamics. *Infect Genet Evol*, v. 11, n. 5, p. 878-85, Jul 2011. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21335103> >.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; Zanotto, P. M. Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. e62649, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675416> >.

VON LINDERN, J. J. et al. Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus. *J Gen Virol*, v. 87, n. Pt 4, p. 895-907, Apr 2006. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16528039> >.

WANG, E. et al. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology*, v. 225, n. 2, p. 274-81, Nov 1996. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918913> >.

WANG, L. F.; CRAMERI, G. Emerging zoonotic viral diseases. *Rev Sci Tech*, v. 33, n. 2, p. 569-81, Aug 2014. ISSN 0253-1933. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25707184> >.

WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*, Aug 2017. ISSN 1545-326X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846489> >.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, v. 9, n. 4, p. 523-40, Jul 2009. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460319> >.

WHO, World Health Organization. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, 2007.

WHO. (World Health Organization) Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012-2020. Geneva: 1-43 p. 2012.

WHO. (World Health Organization) Yellow fever vaccination recommendations in the Americas, 2013. World Health Organization, 2017. Disponível em: < http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/ITH_YF_vaccination_americas.png?ua=1&ua=1 >.

WHO. (World Health Organization) Handbook for clinical management of dengue 2014. Disponível em: < http://www.who.int/ith/yellow-fever-risk-mapping/risk_mapping/en/ >. Acesso em: 17 de Maio de 2017.

WILSON, D.; Reeder, D. *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins University Press., 2005.

WOLFE, N. D.; Dunavan, C. P.; Diamond, J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*, v. 447, n. 7142, p. 279-83, May 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507975> >.

WOLFE, N. D. et al. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg Infect Dis*, v. 4, n. 2, p. 149-58, 1998 Apr-Jun 1998. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621185> >.

WOLFE, N. D. et al.. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg*, v. 64, n. 5-6, p. 310-6, 2001 May-Jun 2001. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463123> >.

YOUNG, H. S. et al. Declines in large wildlife increase landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, n. 19, p. 7036-41, May 2014. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778215> >.

