



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

ELOIZA LOPES DE LIRA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS EM
PACIENTES DO HOSPITAL ESCOLA DR. HÉLVIO AUTO (HEHA) – MACEIÓ/AL**

Maceió – AL
2016

ELOIZA LOPES DE LIRA

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DAS INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS EM
PACIENTES DO HOSPITAL ESCOLA DR. HÉLVIO AUTO (HEHA) – MACEIÓ/AL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Abel Borges

Maceió – AL
2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- L768a Lira, Eloiza Lopes de.
Aspectos epidemiológicos das infecções por arbovírus em pacientes do Hospital Escola Dr. Hélvio Auto (HEHA) – Maceió-AL / Eloiza Lopes de Lira. – 2016.
73f. : il.
- Orientador: Claudio Torres de Miranda.
Coorientadora: Alessandra Abel Borges.
Dissertação (mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2016.
- Bibliografia: f. 60-71.**
Apenso: f. 72-73.
1. Dengue – Alagoas. 2. Arbovírus. 3. Epidemiologia. I. Título.

CDU: 614(813.5)



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Folha de Aprovação

Eloiza Lopes de Lira

Aspectos epidemiológicos das infecções por arbovírus em pacientes do Hospital Escola Dr.
Hélvio Auto (HEHA)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 23 de setembro de 2016.

Prof.^ª Dr.^ª Alessandra Abel Borges (Co-orientadora)

Banca Examinadora

Prof.^ª Dr.^ª Célia Maria Silva Pedrosa – (UFAL)

Prof.^ª Dr.^ª Ana Luiza Pamplona Mosimann - (Fiocruz/PR)

*Dedico este trabalho a todos os voluntários
que gentilmente se dispuseram em colaborar com esta pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar sempre pelo melhor caminho e me amparar todas as vezes que precisei;

Aos meus orientadores, Cláudio Torres de Miranda e Alessandra Abel Borges, pela confiança depositada, oportunidade concedida e transmissão de conhecimento;

Ao Ministério da Saúde/CNPq/SESAU-AL/ FAPEAL pelo financiamento do projeto (processo nº 60030 000740/2013);

Ao colega Herbert Charles Silva Barros que nos auxiliou na organização dos dados epidemiológicos para análise estatística;

Aos lapevianos, que neste período foram minha segunda família e que sempre estavam dispostos a ajudar, não só com palavras, mas com ações, em especial a Ana Rachel, Flávio Martins, Márcia Angélica, Rebeqa Feitosa, Juliana Melo, Danilo Machado, Vanessa Muller, Stephannie Maia e Jesualdo Vasconcelos;

As professoras, Denise Maria Wanderlei Silva e Regianne Umeko Kamiya por disponibilizarem recursos físicos para a realização de alguns experimentos;

Aos pesquisadores, Luiz Tadeu M. Figueiredo, Cláudia Nunes Duarte, Gilberto Sabino Júnior, Guilherme Ferreira Silveira e Diogo Kuczera pelas colaborações para o enriquecimento deste trabalho;

A pesquisadora Ana Luiza Pamplona Mosimann pelo conhecimento transmitido, e que junto com o pesquisador Juliano Bordignon, ofereceram-me estadia em Curitiba, além de até então ceder suporte e auxílio direto neste trabalho;

A equipe do Hospital Escola Hólvio Auto, a qual foi crucial para captação e obtenção de amostras para este estudo, em especial as médicas Luciana Maria de Medeiros Pacheco e Renata Brandão Leite;

Aos pacientes, que voluntariamente, cederam amostras biológicas e dados pessoais para execução deste trabalho;

Ao CEREST, que gerido por Álvaro Pinto, oportunizou conciliar o serviço público com a execução do meu mestrado. E ao meu coordenador, Paulo César, pelo apoio, compreensão e amizade;

Aos meus pais, Ana Júlia e Valdomiro por todo apoio e carinho depositados em mim, e que junto com meus irmãos, Euclides e Eloana, sempre ficaram na torcida para que tudo desse certo;

Aos meus familiares e amigos pelas palavras de apoio e torcida, para que este trabalho e etapa da minha vida fosse concluída com êxito;

Ao meu companheiro, Ithallo Tanabe, pelo auxílio e suporte ofertado ao longo desses anos, estando disponível sempre para análise e discussão de resultados.

RESUMO

Os arbovírus são transmitidos por vetores artrópodes, os quais geram preocupação no âmbito da saúde pública por provocarem grandes epidemias em diversas partes do mundo. Durante a fase aguda de suas infecções, estes vírus provocam infecções assintomáticas ou com quadro febril indistinguível, o que dificulta o diagnóstico clínico diferencial e, por conseguinte, o tratamento de suporte adequado. No Brasil, há vários arbovírus circulantes, havendo, além das epidemias de dengue, relatos de surtos provocados pelo vírus Ilhéus (ILHV), Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV) e Oropouche (OROV). Contudo, no estado de Alagoas não há nenhum dado científico sobre estes vírus. Assim, o presente estudo propôs avaliar aspectos epidemiológicos das arboviroses circulantes em Alagoas, por meio da detecção molecular de genomas virais e caracterização do perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos. Para tanto, foram analisadas 230 amostras (205 de soro e 25 de líquido) de pacientes atendidos no Hospital Escola Hélvio Auto, coletadas entre outubro de 2013 e junho de 2014. Após a triagem por PCR, os 85 pacientes com RNA viral detectado, tiveram seus perfis epidemiológicos analisados e foram submetidos a quantificação de citocinas pró-inflamatórias. Entre os vírus triados, o sorotipo 4 do vírus dengue (DENV-4), era o circulante em Alagoas sendo este introduzido no estado em 2012, após a reemergência em 2010 do DENV-4 no Brasil. Foi predominante os sintomas comumente relacionados a infecções provocadas pelo vírus dengue. Contudo, somente 37,65% dos pacientes desenvolveram plaquetopenia, além da observação de pacientes com decréscimo no nível de hematócrito (17,65%) e aumento nos níveis de TGO e/ou TGP. Ademais, identificamos correlação entre a queixa de dor abdominal com a manifestação de plaquetopenia. Observamos também níveis elevados de IL-10 em casos graves da doença, além do aumento significativo dos níveis de IL-8 e IL-6 nas demais amostras. Diante disto, os resultados obtidos são de grande importância para os órgãos de vigilância epidemiológica de Alagoas, pela ciência do sorotipo de dengue circulante e pelas informações epidemiológicas que servirão de suporte para criação e/ou manutenção de medidas de intervenção e manejo clínico aos indivíduos acometidos pelo DENV. Contudo, ainda são necessários mais estudos levando em consideração também os indivíduos com genoma viral não detectado a fim de verificar a existência de aspectos epidemiológicos distintivos entre os grupos, como auxílio ao diagnóstico clínico.

Palavras-chaves: Dengue – Alagoas. Arbovirus. Epidemiologia.

ABSTRACT

The arboviruses are transmitted by arthropod vectors, generating concern in public health by causing epidemics in many parts of the world. In the acute phase of their infection, these viruses cause asymptomatic infections or indistinguishable fever, hindering the clinical diagnosis, and consequently, appropriate treatment. In Brazil, there are several circulating arboviruses, with reports of outbreaks caused by Ilheus (ILHV), Saint Louis (SLEV), Rocio (ROCV) and Oropouche (OROV), besides dengue epidemic. However, in the state of Alagoas there is a deficit in the epidemiological and scientific data about these viruses. Thus, the aim of this study is to evaluate the epidemiology of circulating arboviruses in Alagoas, through the molecular detection of viral genomes and characterization of the epidemiologic profile of affected individuals. Therefore, we analyzed 230 samples (205 serum and 25 liquor) of patients attending at the Hospital Escola Helvio Auto (HEHA), acquired between October 2013 and June 2014. After assay of PCR we detected 85 patients with viral RNA that had their epidemiologic profile analyzed in addition to the quantification of proinflammatory cytokines. Among the viruses screened, the serotype 4 dengue virus (DENV-4) was detected as circulating in Alagoas, which was introduced in the state in 2012, after the re-emergence in 2010 of the DENV-4 in Brazil. Furthermore, the symptoms commonly associated with infections caused by dengue virus were predominant in our patients. However, only 37.65% of the patients developed thrombocytopenia and 17.65% of them had a decrease in hematocrit level. They presented increased levels of AST and / or ALT. In addition, we identified correlation between the complaint of abdominal pain and thrombocytopenia. We also observed high levels of IL-10 in severe cases, in addition to high levels of IL-8 and IL-6 in the other samples. In view of this, the results are of great importance for the epidemiological surveillance department of Alagoas, due to the knowledge about the current serotype of dengue in the region and to the epidemiologic information that will help elaborate clinical management protocols to DENV-infected individuals. However, more studies are needed including individuals with viral genome not detected in order to find epidemiological differences over those DENV-infected and thus aid in clinical diagnosis.

Keywords: Dengue – Alagoas. Arbovirus. Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos ciclos de transmissão e manutenção de arbovírus no mundo	15
Figura 2 – Representação morfológica de um Flavivirus na forma imatura e madura	18
Figura 3 – Representação esquemática do genoma dos Flavivirus, com setas indicando os sítios de clivagem	19
Figura 4 – Prevalência mundial de infecções pelo vírus dengue	20
Figura 5 – Mapa mundial de co-circulação dos sorotipos do vírus dengue no período de 2000 a 2013, indicando o último sorotipo recentemente isolado	22
Figura 6 – Indução de cascata de citocinas em infecções pelo DENV	23
Figura 7 – Locais das primeiras ocorrências de infecção por diferentes sorotipos de dengue no Brasil	24
Figura 8 – Incidência de casos prováveis de dengue em Alagoas em comparação com a média nacional, no período de 2000 a 2014	25
Figura 9 – Evolução clínica e laboratorial da dengue	26
Figura 10 – Quadro listando as manifestações clínicas consideradas de alarme para as infecções com o vírus dengue	26
Figura 11 - Fluxograma para classificação de risco de dengue	27
Figura 12 – Representação esquemática da morfologia (A) e genoma (B) dos representantes do gênero Orthobunyavirus.....	31
Figura 13 – Dispersão geográfica dos genótipos do vírus Oropouche na América do Sul, baseado em dados do gene N, no período de 1995 a 2009	32
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose de amplicons da Multiplex-Nested-PCR mostrando amplicons de amostras DENV-4 positivas	41
Figura 15 - A análise filogenética das sequências do gene NS5 de DENV-4	42
Figura 16 – Proporção por gênero dos indivíduos com RNA viral detectado	43
Figura 17 – Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por faixa etária.....	43
Figura 18 – Distribuição dos indivíduos com RNA viral detectado nos municípios do Estado de Alagoas (A) e nos bairros da capital, Maceió (B)	44
Figura 19 - Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por período com manifestações clínicas até o dia da coleta de amostra	45

Figura 20 – Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por classificação de risco para dengue.....	45
Figura 21 – Sinais clínicos dos indivíduos com RNA viral detectado.....	46
Figura 22 – Sinais laboratoriais dos indivíduos com RNA viral detectado (A) e porcentagem de casos por dia de manifestação clínica (B, C e D).....	47
Figura 23 – Contagem de plaquetas de indivíduos com RNA viral detectado, agrupados de acordo com diagnóstico clínico	48
Figura 24 – Frequência de indivíduos com altos níveis de TGO e/ou TGP e a porcentagem de casos por dia de manifestação clínica (B, C e D).....	48
Figura 25 – Associação entre manifestação de dor abdominal com desenvolvimento de plaquetopenia nos indivíduos com RNA viral detectado	49
Figura 26 – Proporção dos indivíduos com citocinas quantificadas por classificação de risco para dengue.....	50
Figura 27 – Níveis de citocinas pró-inflamatórias (pg/ml) em soro de voluntários saudáveis (CN) e pacientes com RNA viral detectado.....	50
Figura 28 – Níveis de IL-10 de indivíduos com RNA viral detectado, agrupados de acordo com manifestações clínicas	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações epidemiológicas gerais dos arbovírus abordados no presente estudo.....	16
Tabela 2 – Genótipos dos sorotipos do vírus dengue e seus respectivos locais de circulação.....	21
Tabela 3 – Controles positivos utilizados no estudo e seus respectivos títulos virais.....	36
Tabela 4 – Iniciadores utilizados no presente estudo.....	37
Tabela 5 – Mediana dos parâmetros laboratoriais por quadro clínico.....	47
Tabela 6 – Níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 por quadro clínico de dengue.....	51
Tabela 7 – Relação entre os níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 com parâmetros laboratoriais.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Imunoamplificação dependente de anticorpo
C	Capsídeo
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	Fita complementar de ácido desoxirribonucleico
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue, sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue, sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue, sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue, sorotipo 4
E	Envelope
Gc	Glicoproteína de superfície c
Gn	Glicoproteína de superfície n
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p70	Interleucina 12p70
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ILHV	Vírus Ilhéus
L	Segmento de RNA grande
M	Membrana dos Flavivirus
M	Segmento de RNA médio dos Orthobunyavirus
MTase	metiltransferase
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2	Proteína não-estrutural 2
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4	Proteína não-estrutural 4
NS5	Proteína não-estrutural 5
NSm	Proteína não-estrutural m
NSs	Proteína não-estrutural s
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	Região codificadora
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Vírus rocío
RpRd	RNA polimerase RNA-dependente
S	Segmento de RNA pequeno
SLEV	Vírus Saint Louis
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTR	Região não-codificadora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO	15
2.1 Flavivirus	17
2.1.1 Dengue	19
2.1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis	27
2.1.3 Vírus Ilhéus	28
2.1.4 Vírus Rocio	29
2.2 Orthobunyavirus	30
2.2.1 Vírus Oropouche	31
3 OBJETIVO	34
3.1 Geral	34
3.2 Específicos	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Pacientes, Amostras e Dados Epidemiológicos	35
4.2 Controles Virais	35
4.3 Detecção Molecular	36
4.3.1 Iniciadores	36
4.3.2 RNA viral	37
4.3.3 Transcrição Reversa (RT)	37
4.3.4 PCR gênero-específica para Flavivirus e Nested-Multiplex-PCR espécie-específica	38
4.3.5 One-Step RT-PCR para OROV	38
4.4 Sequenciamento e análise filogenética	39
4.5 Quantificação de citocinas séricas	39
4.6 Estatística	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Detecção Molecular	41
5.2 Análise filogenética	41
5.3 Aspectos epidemiológicos	43
5.4 Citocinas	49
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	58
8 REFERÊNCIAS	59
APENSO	71

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são infecções provocadas por vírus transmitidos através de vetores artrópodes, as quais anualmente geram grandes epidemias em diversas partes do mundo. Essas viroses podem apresentar-se desde a forma assintomática até aquelas com comprometimento neurológico (encefalites e meningoencefalites) e desenvolvimento de hemorragia. Dessa forma, são preocupantes no cenário de saúde pública principalmente porque para a maioria o tratamento é apenas de suporte (voltado a controlar os sintomas), não havendo vacina e nem tratamento antiviral disponível.

Dentre os arbovírus circulantes no Brasil, relacionados a surtos e epidemias em seres humanos, estão os membros da família *Flaviviridae*, como vírus dengue (DENV), vírus Rocio (ROCV), vírus Ilhéus (ILHV) e vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), além do vírus Oropouche (OROV), da família *Bunyaviridae*. Todos estes agentes, durante a fase aguda de suas infecções, provocam febre, dores de cabeça, mialgia, artralgia, exantemas, dentre outros, o que dificulta a distinção clínica entre estas viroses.

Em alguns estados do país, já há grupos de pesquisa realizando a busca por estes e outros arbovírus, contudo, em Alagoas é realizado apenas o monitoramento para o DENV através dos boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde. Por meio destes é possível observar que a grande maioria dos casos notificados para dengue não são confirmados. Isto remete à hipótese de que os casos não confirmados para o DENV sejam, na verdade, infecções provocadas por outros arbovírus, que até o momento não foram investigados, neste estado.

Portanto, o conhecimento da circulação de outros vírus em Alagoas, bem como o estabelecimento da epidemiologia das infecções, auxiliará na elaboração de ações de vigilância mais efetivas, a fim de se evitar os casos graves através do levantamento de parâmetros prognósticos para o estabelecimento medidas de controle.

2 REVISÃO

Arbovírus, segundo a expressão inglesa *arthropod-borne-virus*, é o termo designado aos vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, em geral mosquitos e carrapatos (GUBLER, 2001). Atualmente fazem parte deste grupo 537 espécies, as quais estão listadas e descritas no Catálogo Internacional de Arboviroses (CDC, 2015), e são, em sua maioria, representantes das famílias: *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*). A manutenção destes vírus na natureza ocorre através de aves e mamíferos (seus principais hospedeiros), sendo acidental a infecção em humanos (Figura 1) (MELTZER, 2012).

A transmissão destes vírus é diretamente relacionada ao clima, havendo distinção entre áreas tropicais e áreas de clima temperado. Na primeira, os vírus circulam ao longo do ano apresentando um pico sazonal amplo. Já na segunda, casos de arboviroses são relatados apenas nos meses mais quentes, não havendo circulação de vírus no período de temperaturas baixas (HOLLIDGE; GONZÁLEZ-SCARANO; SOLDAN, 2010). Dessa forma, os arbovírus possuem ampla disseminação mundial e as infecções provocadas pelos mesmos resultam em grande impacto na saúde pública e veterinária (PFEFFER; DOBLER, 2012).

Figura 1 – Representação dos ciclos de transmissão e manutenção de arbovírus no mundo



Fonte: Autora (2016) – Adaptado de Anez et al. (2012).

Dentre os arbovírus brasileiros relacionados a surtos em seres humanos estão o vírus dengue (DENV), vírus Rocio (ROCV), vírus Ilhéus (ILHV) e vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) – família *Flaviviridae* – e o vírus Oropouche (OROV) – família *Bunyaviridae* (Tabela 1). Além destes, nos últimos dois anos, houve a introdução de dois arbovírus no Brasil, o vírus Chikungunya (*Alphavirus*) e o vírus Zika (*Flavivirus*) (FIGUEIREDO, 2015).

Tabela 1 – Informações epidemiológicas gerais dos arbovírus abordados no presente estudo

Família/Gênero	Vírus	Vetor	Hospedeiro	Distribuição Geográfica	Referência
<i>Flaviviridae/ Flavivirus</i>	Dengue	<i>Aedes ssp</i>	Primatas e primatas não humanos	Sudeste da Ásia, Américas, oeste do Pacífico, África e leste do Mediterrâneo	BHATT et. al (2013); GUZMAN e HARRIS (2015)
	Saint Loius	<i>Culex ssp.</i>	Pássaros Humanos e equinos (acidental)	Continente Americano	ROSA et. al (2013), DIAZ et. al (2015).
	Ilhéus	<i>Aedes ssp</i> <i>Psorophora ssp</i>	Pássaros	América Central e do Sul	PAUVOLID-CORRÊA et al. (2011)
	Rocio	<i>Aedes ssp</i> <i>Psorophora ssp</i> <i>Culex ssp</i>	Pássaros, roedores e equinos	Brasil	FIGUEIREDO (2014)
<i>Bunyaviridae/ Orthobunyavirus</i>	Oropouche	<i>Aedes (Oclerotatus) serratus</i> <i>Culicoides ssp</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	Pássaros, preguiças e primatas não humanos	América do Sul	FIGUEIREDO (1999) CARDOSO et al. (2015)

Fonte: Autora (2016)

O surgimento e ressurgimento de arboviroses estão diretamente relacionados com os hábitos humanos, sendo o trânsito de pessoas e de insumos (comércio) entre os países, o maior contribuinte para a propagação de vírus e mosquitos antropofílicos

em todo o mundo. Ainda, a exposição a esses vetores é intensificada pelo processo de urbanização junto com precárias condições sanitárias (HOLLIDGE; GONZÁLEZ-SCARANO; SOLDAN, 2010). Isto contribui para um cenário propício à ocorrência de arboviroses, o que gera preocupação pois para grande maioria destes vírus não há vacina e nem tratamento antiviral disponível (ANEZ et al., 2012).

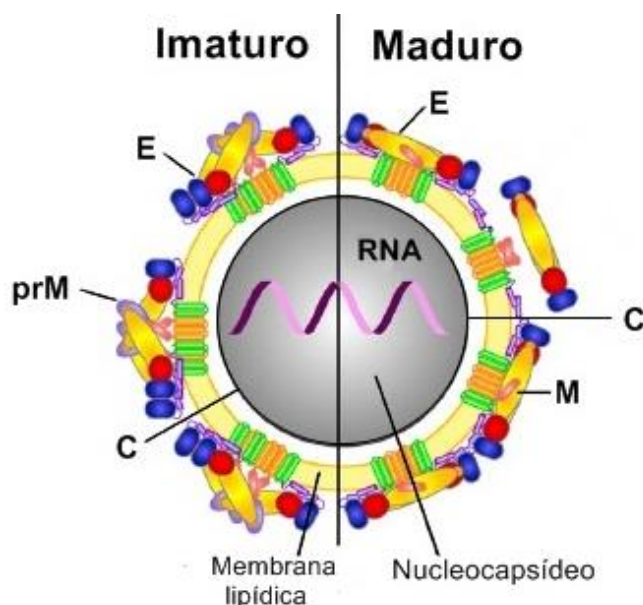
Somando a isto, em geral, os arbovírus podem provocar estado febril indistinguível ou assintomático na fase aguda das infecções (ANEZ et al., 2012), o que dificulta o diagnóstico clínico diferencial e, por conseguinte, o tratamento de suporte adequado. Quando manifestados, segundo Cleton et al., (2012) os sintomas podem ser categorizados em quatro grupos: doença febril leve ou grave (DF), erupção cutânea (rash) e artralgia (RA), síndrome neurológica (SN) e síndrome hemorrágica (SH). Na DF as manifestações clínicas são similares as da gripe, como febre e dores de cabeça, muscular e retro-orbitária. Por sua vez a RA é caracterizada pela manifestação de exantemas e poliartralgias. Já para SN pode apresentar-se como encefalite ou meningite. E por fim, SH é caracterizada pela redução de plaquetas, hemorragias e choque.

2.1 Flavivirus

Entre os grupos que compõe a família *Flaviviridae*, o gênero *Flavivirus* engloba o maior número de representantes (53 espécies) (ICTV, 2015). Estes são vírus pequenos e envelopados que contém RNA de fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11.000 nucleotídeos.

Na forma madura apresentam diâmetro em torno de 50 nm e contém três proteínas estruturais designadas como C (capsídeo), E (envelope) – o principal determinante antigênico por mediar a ligação e fusão com a célula do hospedeiro durante a infecção – e M (membrana) (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; HEINZ; STIASNY, 2012) (Figura 2). Esta última, em partículas virais imaturas está como sua forma precursora, prM, a qual perde o radical pr após processo proteolítico pela furina no aparelho de Golgi durante a exocitose das células do hospedeiro (YU et al., 2008; HEINZ; STIASNY, 2012).

Figura 2 – Representação morfológica de um *Flavivirus* na forma imatura e madura



Legenda: **E** – proteína do envelope viral; **prM** – proteína precursora da proteína da membrana (vírus imaturo); **M** – proteína de membrana; **C** – proteína do capsídeo.

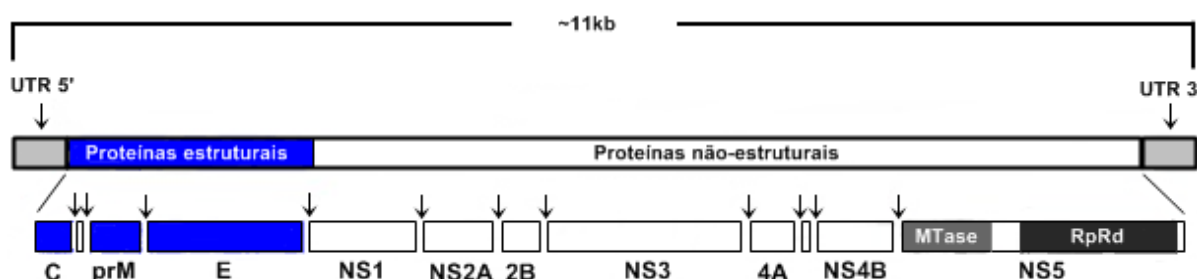
Fonte: Autora (2016) – Adaptado de HEINZ e STIASNY (2012).

O genoma é composto por uma região 5' não-codificadora (*untranslated region* – UTR), uma única *open reading frame* (ORF), contendo mais de 10.000 nucleotídeos, e uma região terminal 3' não-codificadora. A ORF codifica as três proteínas estruturais (C, E e prM) e outras sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003; ROMANOS, 2008) (Figura 3).

As formas como estas proteínas não-estruturais desempenham especificamente suas funções ainda é alvo de estudos, contudo se pode afirmar que a proteína NS1 tem importante papel como biomarcador de infecção por *Flavivirus* devido a esta ser secretada no sangue, pelas células infectadas do hospedeiro, nos primeiros dias ou antes mesmo dos sintomas (YOUNG et al., 2000; MULLER; YOUNG, 2013). Ainda, já se sabe que a NS2B funciona como co-fator para a NS3, a qual possui importantes papéis no ciclo viral atuando como protease, helicase e NTPase (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; LUO; VASUDEVAN; LESCAR, 2015;

WU et al., 2015). Além disso, bem como a NS3, a proteína NS5 possui papel fundamental na replicação viral devido a suas atividades de RNA polimerase RNA-dependente (RpRd) e metiltransferase (MTase), sendo descrita como a maior e mais conservada proteína dos *Flavivirus* (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Figura 3 – Representação esquemática do genoma dos *Flavivirus*, com setas indicando os sítios de clivagem



Legenda: UTR – região não-codificadora de proteínas (*untranslated region*); C – região codificadora da proteína do capsídeo; prM – região codificadora da proteína precursora de membrana; E - região codificadora da proteína do envelope; NS1 - região codificadora da proteína não-estrutural 1; NS2A - região codificadora da proteína não-estrutural 2A; 2B - região codificadora da proteína não-estrutural 2B; NS3 - região codificadora da proteína não-estrutural 3; 4A - região codificadora da proteína não-estrutural 4A; NS4B - região codificadora da proteína não-estrutural 4B; NS5 - região codificadora da proteína não-estrutural 5; MTase – região codificadora da enzima metiltransferase; RpRd – região codificadora da RNA polimerase RNA-dependente (RpRd).

Fonte: Autora (2016) – Adaptado de LINDENBACH, THIEL e RICE (2007)

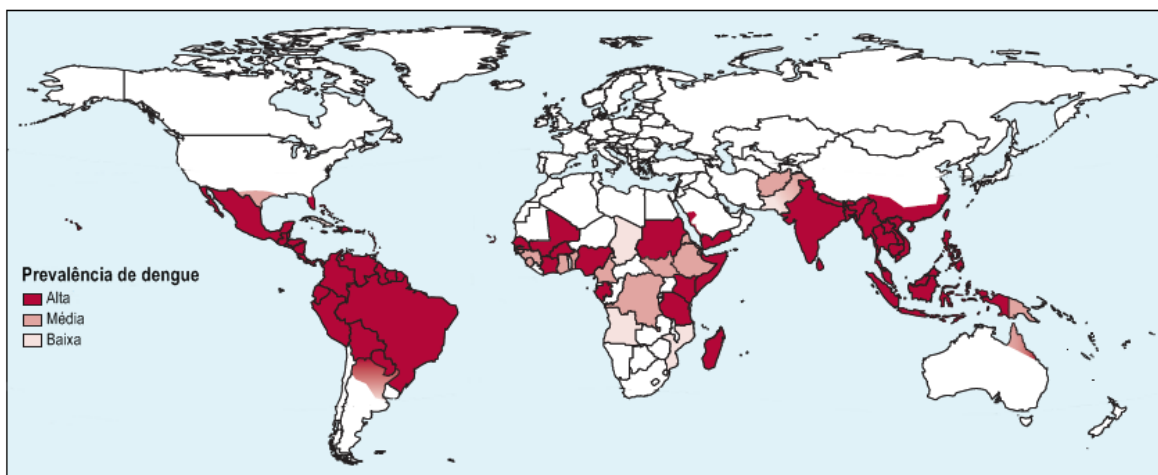
2.1.1 Dengue

O vírus dengue (DENV) é endêmico em mais de 100 países, distribuídos pelo sudeste da Ásia, Américas, oeste do Pacífico, África e leste do Mediterrâneo (Figura 4), sendo anualmente responsável por cerca de 390 milhões de infecções humanas no mundo, categorizando-o como um importante problema de saúde pública, que acarreta efeitos sociais e econômicos substanciais (BHATT et al., 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015).

Este cenário é reflexo da crescente expansão do vírus desde seu primeiro isolamento em 1943 no Japão. Para tanto um dos importantes contribuintes para esta

realidade é a ampla distribuição dos seus vetores – mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (comumente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) – os quais mantêm o vírus na natureza através de ciclo urbano e silvestre, por meio de infecção de humanos e primatas não humanos, respectivamente (ROMANOS, 2008; MESSINA et al., 2014).

Figura 4 – Prevalência mundial de infecções pelo vírus dengue



Fonte: Autora (2016) – Adaptado de GUZMAN e HARRIS (2015)

Somado a isto, a alta prevalência de infecções pelo vírus dengue possivelmente se dá por este possuir quatro sorotipos (DENV 1-4), os quais possuem em torno de 60% a 75% de identidade a nível de aminoácido, fato que lhes confere distinções filogenéticas e antigênicas (OHAINLE et al., 2011; GUZMAN; HARRIS, 2015). Devido a isto, ao desenvolver a doença, o sistema imunológico humano produz anticorpos capazes de conferir proteção duradoura apenas contra o sorotipo causador daquela infecção, o que deixa o indivíduo suscetível a infecções subsequentes aos demais sorotipos (BURKE; MONATH, 2001; GUZMAN; HARRIS, 2015).

Além disso, para cada sorotipo é intrínseco a distinção de 3% entre os seus aminoácidos e de 6% entre nucleotídeos, o que filogeneticamente os agrupam por genótipos. Esta variabilidade gênica está relacionada tanto a localidade de ocorrência (Tabela 2), quanto a capacidade infectante de cada sorotipo, sendo uma ferramenta importante para determinar a origem e a propagação de epidemias de dengue no mundo (MESSINA et al., 2014; GUZMAN; HARRIS, 2015).

Tabela 2 – Genótipos dos sorotipos do vírus dengue e seus respectivos locais de circulação

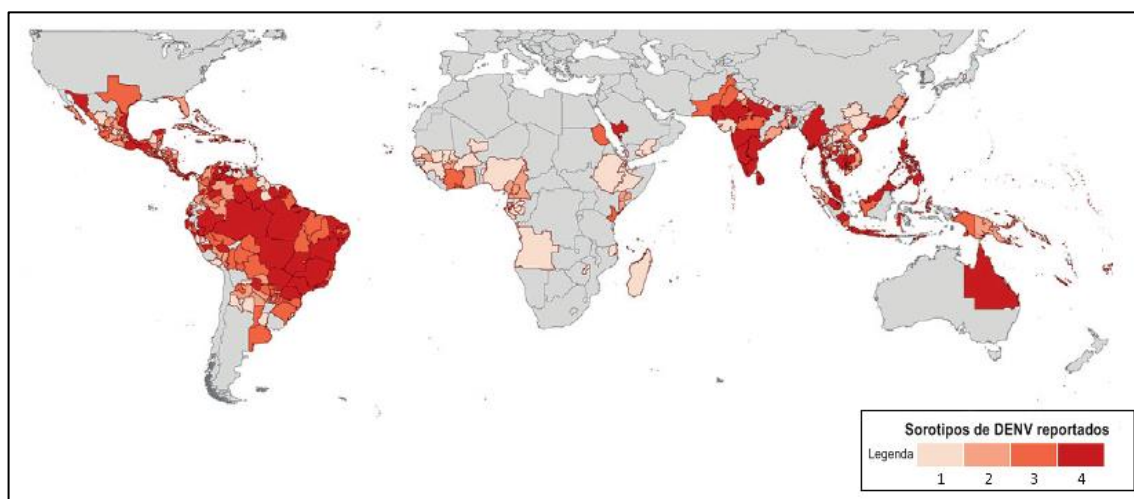
SOROTIPO	GENÓTIPO	LOCALIZAÇÃO
DENV-1	Genótipo I	Sudeste da Ásia, China e Leste da África
	Genótipo II	Tailândia
	Genótipo III	Malásia
	Genótipo IV	Sul do Pacífico
	Genótipo V	América e África
DENV-2	Asiático I	Tailândia e Malásia
	Asiático II	Filipinas, Taiwan, Vietnã, China e Sri Lanka
	Americano/ Asiático	China, Tailândia, Vietnã, Brasil, Venezuela e Caribe
	Americano	Peru, Venezuela, Caribe e Sul do Pacífico
	Cosmopolita	Índia, sudeste da Ásia, África, Oriente Médio e Austrália
	Silvestre	África e Ásia
DENV-3	Genótipo I	Indonésia, Malásia, Singapura, Filipinas e sul do Pacífico
	Genótipo II	Tailândia, Camboja, China e Myanmar
	Genótipo III	Sudeste da Ásia, América Central e do Sul, África e Oriente Médio
	Genótipo IV	Porto Rico
	Genótipo V	Filipinas (estirpe mais antiga isolada em 1956)
DENV-4	Genótipo I	Filipinas, Tailândia, Sri Lanka e Japão
	Genótipo II	Indonésia, sul do Pacífico e América Latina
	Genótipo III	Tailândia
	Silvestre	Malásia

Fonte: Autora (2016) – Adaptado de TWIDDY et al. (2002), MENDEZ et al. (2010), LUO et al. (2012), PINHO et al. (2015).

2.1.1.1 Resposta Imunológica

Diante do cenário mundial (Figura 5), a preocupação maior gira em torno do risco de evolução para manifestações graves da doença em casos de infecção secundária. Este efeito é conhecido como Imunoamplificação Dependente de Anticorpo (Antibody-dependent enhancement ou ADE), onde as células de memória, decorrentes da infecção prévia por outro sorotipo, sintetizam anticorpos não neutralizantes durante uma infecção secundária. Estes, formam imunocomplexos que são fagocitados por monócitos/macrófagos aumentando assim a taxa de infecção destas células, e conseqüentemente as respostas inflamatórias exacerbadas e deletérias ao indivíduo (ROMANOS, 2008; SIERRA et al., 2012).

Figura 5 – Mapa mundial de co-circulação dos sorotipos do vírus dengue no período de 2000 a 2013, indicando o último sorotipo recentemente isolado

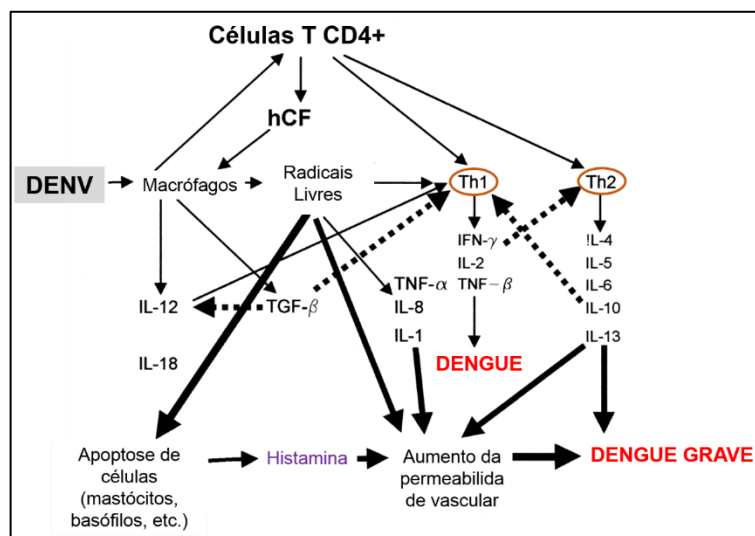


Fonte: Autora (2016) – Adaptado de MESSINA et al. (2014)

Estas respostas exacerbadas são consequência da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-17A) e anti-inflamatórias (IL-10), as quais estão associadas a regulação da permeabilidade vascular e disfunção plaquetária, fato que contribui para o extravasamento de plasma e de moléculas intravasculares (IANI et al., 2016; INYOO; SUTTITHEPTUMRONG; PATTANAKITSAKUL, 2016; OLIVEIRA et al., 2016; KUCZERA et al., 2016).

Ainda, estas também regulam o tipo de resposta imunológica que os linfócitos T auxiliares (células T CD4+) terão frente à infecção pelo DENV, podendo esta ser perfil Th1 ou Th2. O primeiro é ativado diante de quadro inflamatório, de hipersensibilidade, ou lesão tecidual provocada por infecções e doenças autoimunes, e está comumente relacionado com a recuperação do organismo durante uma infecção. Já o segundo perfil, está associado com o estímulo de produção de anticorpos de memória pelos linfócitos B, e em geral, conduz a uma resposta exacerbada a infecção com consequente quadro patológico grave (CHATURVEDI et al., 2000; CHATURVEDI, 2009; LEE et al., 2013). Assim, o perfil Th2 é comumente observado em casos graves de dengue, e o Th1, por sua vez, em infecções agudas provocadas pelo vírus dengue (Figura 6).

Figura 6 – Indução de cascata de citocinas em infecções pelo DENV



Legenda: DENV replica em macrófagos e é apresentado para o recrutamento de células T CD4⁺, as quais produzem hCF (Human Cytotoxic Factor). O hCF induz uma cascata de citocinas que podem provocar uma resposta do tipo Th1, associada a forma branda de dengue, a DF, ou uma resposta do tipo Th2, a qual acarreta o desenvolvimento de fatores de severidade associados a DHF. hCF – fator citotóxico humano; DF – Febre do Dengue; DHF – Febre Hemorrágica do Dengue. Seta continua fina – indução positiva, seta continua grossa – efeito nocivo; seta pontilhada – inibição.

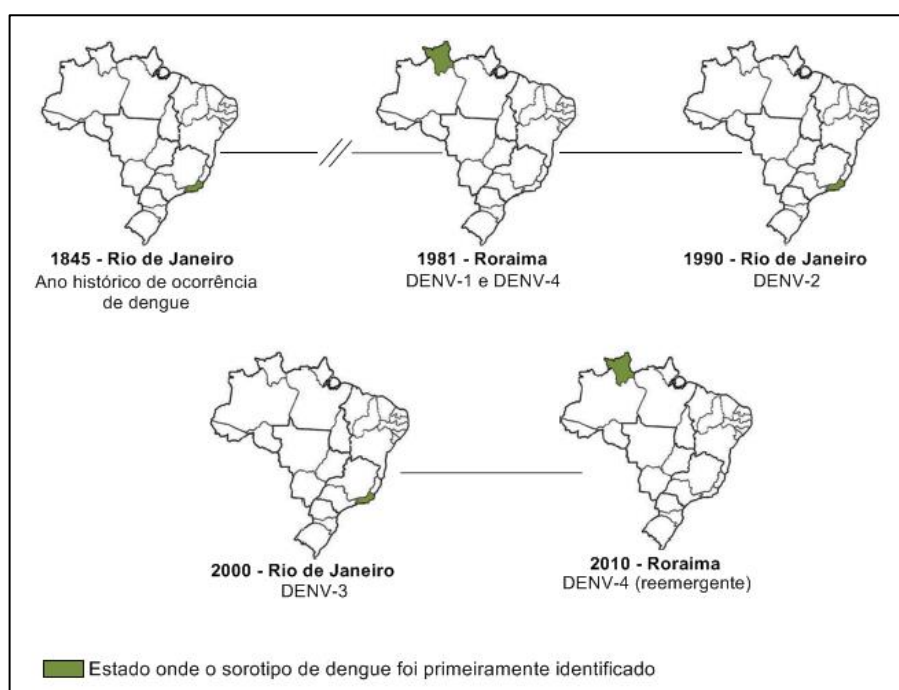
Fonte: Autora (2016) – Adaptado de CHATURVEDI et al. (2000).

2.1.1.2 Dengue no Brasil

O primeiro caso de epidemia provocada pelo DENV no Brasil foi reportado em 1845, no Rio de Janeiro, seguido de novos relatos em outras localidades até 1923 (PINHEIRO; NELSON, 1997; SCHNEIDER; DROLL, 2001). Após este período, não houve relatos de novas epidemias no país devido à implementação do programa de erradicação do *Ae. aegypti*, também vetor do vírus da febre amarela, que provocava grave epidemia naquela época. Esta ação foi realizada também por outros países da América do Sul (Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai e Peru) e em 1947 a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) aprovou o plano continental da erradicação do *Ae. aegypti*, utilizando como base as ações já desenvolvidas pelos países citados (PAHO, 1947; DICK et al., 2012; MESSINA et al., 2014; FARES, et al., 2015).

Dessa maneira, não só o Brasil, mas todo o continente americano passou longos anos sem circulação do *Ae. aegypti*, conseqüentemente sem casos de dengue, contudo após o sucesso do plano, as medidas de erradicação foram sendo negligenciadas e na década de 60 o mosquito foi reintroduzido no continente (DICK et al., 2012). Assim, em 1981, no estado de Roraima, foram referidas infecções ocasionadas pelos sorotipos 1 e 4 de dengue e desde então vem ocorrendo novos casos da doença além da introdução dos demais sorotipos no país (Figura 7) (OSANAI et al., 1983; FARES, et al., 2015).

Figura 7 – Locais das primeiras ocorrências de infecção por diferentes sorotipos de dengue no Brasil



Fonte: Autora (2016) – Adaptado de FARES et al. (2015)

Assim, a dengue se tornou endêmica no Brasil com casos reportados anualmente. Em 2015, foram registrados 1.649.008 casos prováveis de dengue no país, sendo a região Sudeste responsável pelo maior número (1.026.226 casos; 62,2%), seguida da região Nordeste (311.519 casos; 18,9%) (BRASIL, 2016a). Dentre os estados que compõem a região Nordeste está Alagoas, o qual notifica casos desde a implementação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em

1999 e que, no geral, apresenta incidência de infecções acima da média nacional (Figura 8). Entretanto, não há dados científicos sobre a doença no Estado.

Figura 8 – Incidência de casos prováveis de dengue em Alagoas em comparação com a média nacional, no período de 2000 a 2014



Fonte: Autora (2016) – Adaptado de BRASIL (2015).

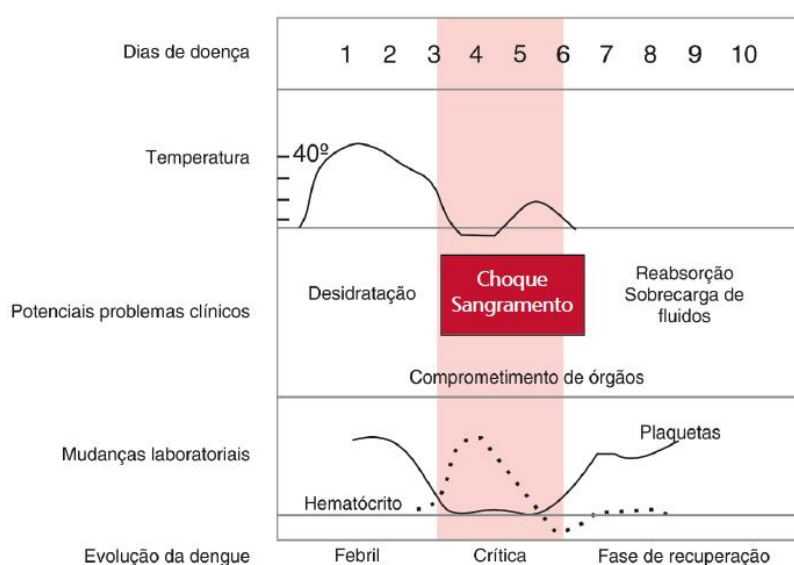
2.1.1.3 Manejo clínico de infecções por dengue no Brasil

No ano de 2016, o Ministério da Saúde brasileiro com apoio técnico da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), lançou a 5ª edição do protocolo para manejo clínico dos pacientes com dengue, o qual inclui o diagnóstico diferencial entre as novas arboviroses, chikungunya e zika, introduzidas no país nos últimos anos e também enfatiza a nova classificação de dengue da OMS, a qual coloca em desuso os termos “dengue clássica” e “dengue hemorrágica” devido ao novo perfil clínico e epidemiológico da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). Esta vem sendo utilizada pelo Brasil desde 2014 e define dengue como uma doença única, dinâmica e sistêmica, ou seja, pode evoluir para a remissão dos sintomas ou agravar-se exigindo constante reavaliação e observação, permitindo intervenções eficazes de forma a evitar mortes (BRASIL, 2016b).

Dessa forma, as infecções sintomáticas causadas pelo vírus dengue são subdivididas em três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação (Figura 9). A fase febril, como o nome já remete, é marcada pela febre – geralmente alta (39°C a 40°C)

– de início abrupto com duração de dois a sete dias, associada a outros sintomas, sendo estes: cefaleia, adinamia, mialgia, artralgia e dor retroorbitária. Por sua vez, a fase crítica é marcada pela desfervescência da febre, em geral entre o terceiro e o sétimo dia do início da doença, acompanhada do surgimento dos sinais de alarme (Figura 10). Já na fase de recuperação, o indivíduo apresenta melhora clínica gradual e para os que passaram pela fase crítica, haverá reabsorção gradual do conteúdo extravasado de líquidos (BRASIL, 2016b).

Figura 9 – Evolução clínica e laboratorial da dengue



Fonte: Autora (2016) – Adaptado de BRASIL (2016b).

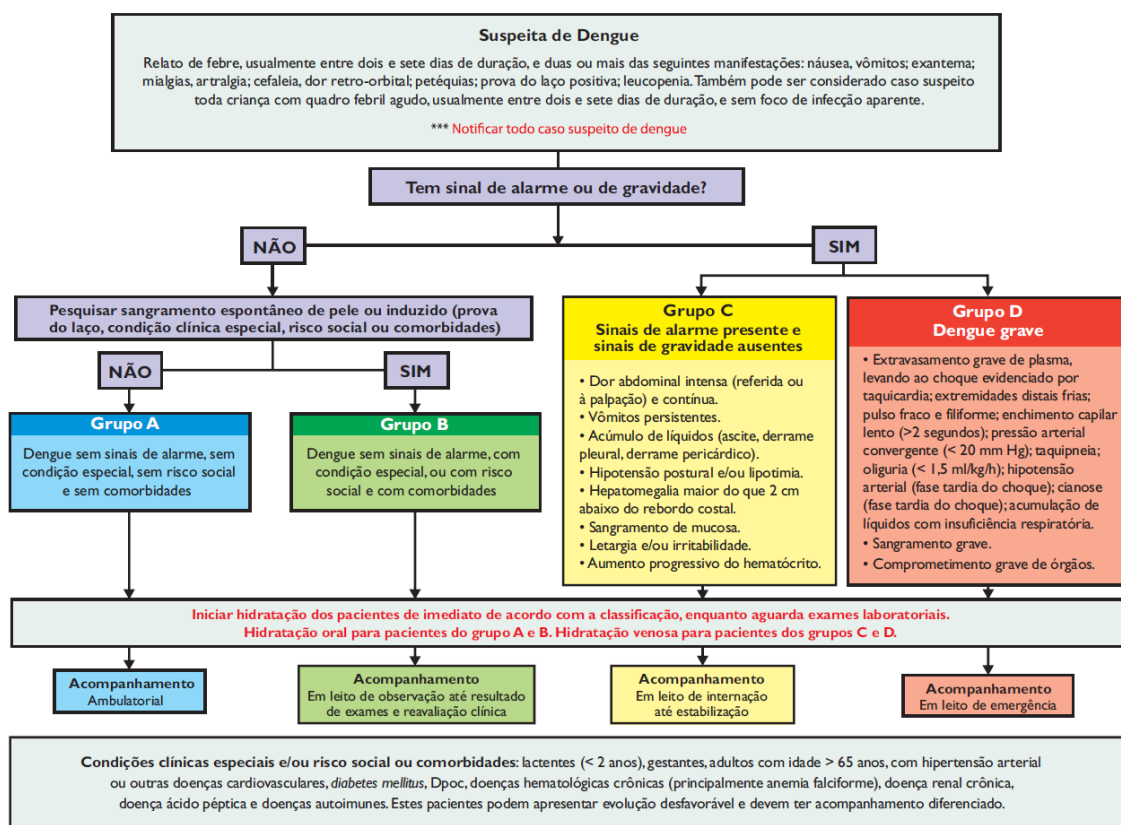
Figura 10 – Quadro listando as manifestações clínicas consideradas de alarme para as infecções com o vírus dengue

Sinais de alarme na dengue
• Dor abdominal intensa (referida ou à palpação) e contínua.
• Vômitos persistentes.
• Acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural, derrame pericárdico).
• Hipotensão postural e/ou lipotimia.
• Hepatomegalia maior do que 2 cm abaixo do rebordo costal.
• Sangramento de mucosa.
• Letargia e/ou irritabilidade.
• Aumento progressivo do hematócrito.

Fonte: Autora (2016) – Adaptado de BRASIL (2016b).

Para o acompanhamento dessas infecções, os pacientes são categorizados em grupos de risco de acordo com suas manifestações clínicas e achados laboratoriais (Figura 11) (BRASIL, 2016b). Dessa forma, o serviço de saúde almeja dar celeridade ao acolhimento do paciente e ser capaz de distinguir aqueles com necessidade de tratamento prioritário (casos com sinais de alarme e graves), a fim de evitar óbitos.

Figura 11 - Fluxograma para classificação de risco de dengue



Fonte: BRASIL (2016b).

2.1.2 Vírus da Encefalite de Saint Louis

O vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) é considerado endêmico nas Américas, com casos diagnosticados desde o Canadá até a Argentina (VASCONCELOS et. al, 1998). Seu ciclo viral é enzoótico (silvestre), o qual é mantido pelas aves silvestres (e.g. pardais – *Passer domesticus*) e pelos mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* (REISEN, 2003). Entretanto há relatos de infecções em outros animais silvestres e de criação (e.g. morcegos, marsupiais, cavalos) e em

humanos, mas essas são consideradas acidentais (ROSA et. al, 2013; DIAZ et. al, 2015).

O primeiro caso reportado de infecção humana pelo vírus foi em 1933, em Saint Louis (origem do nome), Missouri, EUA (REISEN, 2003). Desde então nas Américas, surtos de estado febril leve até graves encefalites vem sendo associados a esse vírus, com óbito em 5% a 20% dos casos (MAIA et. al, 2014).

No Brasil, o primeiro caso de doença induzida por SLEV em seres humanos, ocorreu em Belém-PA em 1978 (PINHEIRO et. al, 1981). Anos depois em 2004, por meio de RT-PCR, foi identificado o primeiro caso no estado de São Paulo (ROCCO et. al, 2004). Dois anos depois, no mesmo estado, em São José do Rio Preto, foram relatados 6 casos de SLEV durante um surto de dengue causado pelo sorotipo 3, fato que provavelmente contribuiu para a observação do primeiro caso de co-infecção no Brasil de SLEV e dengue tipo 3 (MONDINI et. al, 2007a; MONDINI et. al, 2007b). Ainda em São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto, em 2008 foi reportado outro caso de infecção por SLEV (MAIA et. al, 2014). E mais recentemente, em Cuiabá (MT), durante o surto provocado por DENV-4 no período de 2011-2012, foram reportados dois casos de co-infecção com SLEV, sendo um de tripla co-infecção com DENV-1. Na mesma região, em 2013, foi detectado o genoma do vírus em *pool* de mosquitos *Culex spp* (HEINEN et al, 2015).

Vale mencionar que todos os casos identificados por SLEV foram diagnosticados clinicamente como dengue, devido à similaridade dos sintomas induzidos por estes vírus. Contudo, ressalta-se que o SLEV tem tropismo pelo sistema nervoso e recentemente Diaz e colaboradores (2015) identificaram sítios de mutação correlacionados com a patogenicidade e a viremia do vírus, os quais interferem na infectividade deste em aves e facilitam o processo de invasão do sistema neurológico em ratos.

2.1.3 Vírus Ilhéus

O vírus Ilhéus (ILHV) foi descrito pela primeira vez em 1944, quando foi isolado de mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* e *Psorophora*, durante investigação epidemiológica de casos de febre amarela na cidade de Ilhéus (BA), no Brasil

(LAEMMERT; HUGHES, 1947). Estes juntamente com as aves compõem o ciclo enzoótico que mantem o vírus na natureza. Entretanto, pesquisas tem apontado outros possíveis colaboradores deste ciclo, como mosquitos pertencentes aos gêneros *Culex*, *Sabethes*, *Haemagogus* e *Trichoprosopon* e hospedeiros mamíferos (roedores, cavalos e macacos) (KARABATSOS, 1985; PEREIRA et al., 2001; SHOPE, 2003; JOHNSON et al., 2007; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011).

A respeito de infecções em seres humanos, estas são reportadas em países da América Latina, porém sem relatos de epidemias (VENEGAS et al., 2012). As manifestações clínicas vão desde quadro febril agudo, até disfunções neurológicas e cardíacas, mas felizmente até no momento, não há descrição de sequelas ou mortes provocadas por este vírus (VENEGAS et al., 2012).

No Brasil o relato mais recente foi a confirmação de circulação do vírus na região do Pantanal, Mato Grosso do Sul, por meio de isolamento do vírus de mosquitos do gênero *Aedes* e detecção de anticorpos em cavalos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2013).

2.1.4 Vírus Rocio

O vírus Rocio (ROCV) foi isolado em 1975 no Brasil, durante uma grave epidemia de encefalite em habitantes da região do vale Ribeira (SP), a qual perdurou de 1973 a 1980 (TIRIBA et al. 1976; LOPES et al. 1978; HENRIQUES, 2009). Acredita-se que este vírus tenha um ciclo silvestre mantido por mosquitos do gênero *Aedes*, *Psorophora* e *Culex*, sendo os pássaros o seu reservatório natural, contudo anticorpos para o vírus já foram encontrados também em mamíferos (roedores, marsupiais e cavalos) (IVERSSON, 1980; CARDOSO; NAVARRO, 2007; BARROS, et al. 2011, FIGUEIREDO, 2014; SILVA et al., 2014).

Dentre os possíveis reservatórios, recentemente foi descrito pela primeira vez a presença de anticorpos para ROCV em equinos de criadouros pertencentes a estados da região nordeste (Paraíba), centro-oeste (Mato Grosso do Sul), e Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro) do Brasil, fato que categoriza estes locais como potenciais para ocorrência de surtos por este vírus (FIGUEIREDO, 2014; SILVA et al., 2014).

A respeito dos sintomas, as infecções por ROCV apresentam manifestações clínicas similares a de outros *Flavivirus*, como febre aguda, dor de cabeça, anorexia, náuseas, vômitos e mialgia, o que facilita erro de diagnóstico apenas pela clínica, como descrito em moradores do estado da Bahia, que clinicamente foram notificados como suspeita de dengue, mas possuíam anticorpos de infecção recente para ROCV (STRAATMANN, et al., 1997).

Além disso, este vírus possui tropismo pelo sistema nervoso, o qual, após a fase aguda pode desencadear sinais de encefalite, incluindo confusão, distúrbios de reflexo, comprometimento motor, irritação meníngea e síndrome cerebelar (BARROS, et al. 2011; CHÁVEZ et al, 2013). Manifestações estas, observadas durante um surto no Brasil na década de 70, que em alguns indivíduos provocaram sequelas graves, dentre estas: comprometimento visual, olfativo e de memória, além de perturbações auditivas e falta de coordenação motora, e apresentou uma taxa de letalidade de 10% (IVERSSON, 1980; BARROS, et al. 2011). No entanto, felizmente, após este episódio não houve mais relatos de encefalite com tal nível de gravidade.

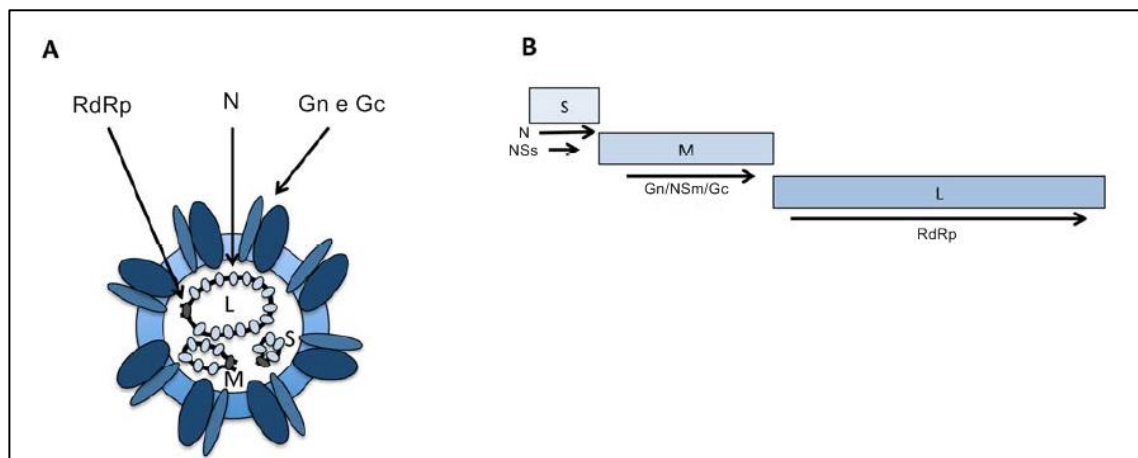
2.2 Orthobunyavirus

A família *Bunyaviridae* atualmente é composta por 350 espécies de vírus distribuídos entre cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus* e *Tospovirus* (EIFAN et al, 2013; ELLIOTT, 2014). Desses, apenas o gênero *Orthobunyavirus* engloba 170 espécies de vírus, os quais compartilham com os demais integrantes da família *Bunyaviridae* o capsídeo envelopado esférico (Figura 12A), com aproximadamente 100nm de diâmetro (CARDOSO et al., 2015).

Além disso, estes vírus possuem RNA de fita simples, com senso negativo, envolto por um nucleocapsídeo helicoidal, subdividido em 3 segmentos, denominados de grande (L- *large*), médio (M – *medium*) e pequeno (S – *small*) (Figura 12A), sendo este último o mais conservado no gênero *Orthobunyavirus*, o que justifica o seu amplo uso na reconstrução filogenética e confirmação de isolamento para alguns de seus representantes, como o vírus Oropouche (OROV) (SAEED et al., 2000; NUNES et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2011; HANG et al., 2014). Ainda, vale mencionar que cada segmento codifica proteínas distintas, sendo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) codificada pelo segmento L; o precursor das glicoproteínas de superfície

(Gn e Gc) e a proteína não estrutural NSm pelo segmento M; e a proteína N do nucleocapsídeo junto com uma pequena proteína não estrutural NSs, pelo segmento S (Figura 12B) (VASCONCELOS et al., 2009; EIFAN et al, 2013).

Figura 12 – Representação esquemática da morfologia (A) e genoma (B) dos representantes do gênero *Orthobunyavirus*



Legenda: Vírion pertencente ao gênero *Orthobunyavirus* com suas proteínas de superfície (Gn e Gc) e genoma segmentado encapsulado pela proteína N (A). Pode-se observar também o produto que cada segmento do genoma gera, após transcrição (B). L – segmento grande; M – médio; S – pequeno; RdRp – RNA polimerase dependente de RNA; NSs – proteína não-estrutural do fragmento S; NSm – proteína não-estrutural do fragmento M.

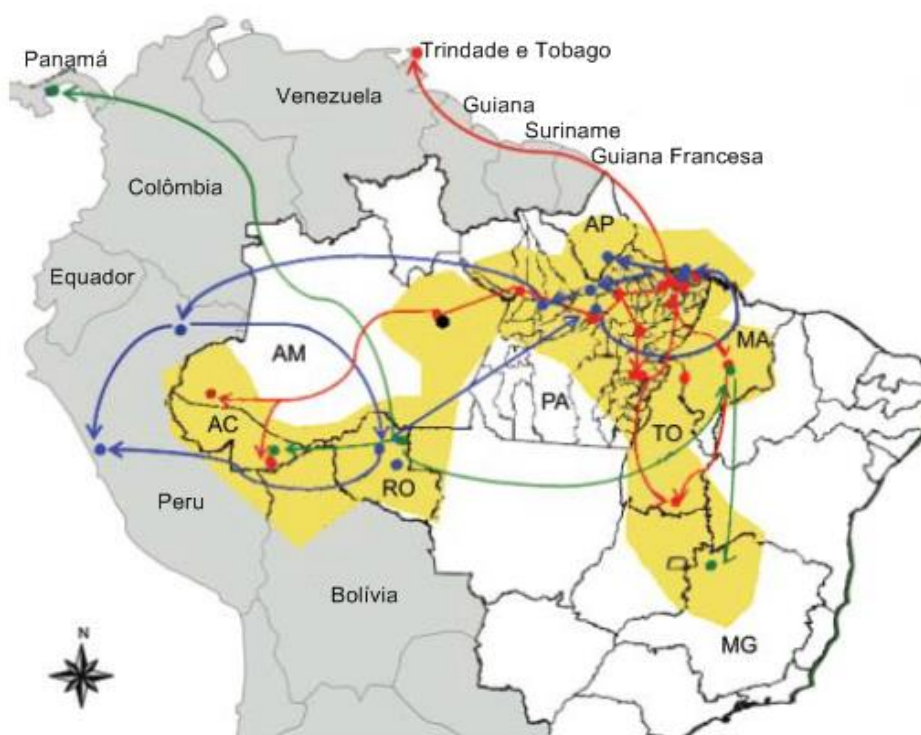
Fonte: Autora (2016) – Adaptado de EIFAN, et al. (2013)

2.2.1 Vírus Oropouche

O vírus Oropouche (OROV) foi isolado pela primeira vez em Trindade e Tobago, no ano de 1955, a partir de soro de paciente e *pool* de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* (ANDERSON et al, 1961). Após este episódio, vários surtos foram reportados não só em Trindade e Tobago, mas também no Peru, Panamá e Brasil (PINHEIRO et al., 1981). Para este último, foi reportado o primeiro isolamento do vírus em 1960, do sangue de preguiças e *pool* de mosquitos da espécie *Aedes (Oclerotatus) serratus*, capturados durante a construção da rodovia Belém-Brasília (PINHEIRO et al., 1962). Recentemente, houve o primeiro relato de isolamento de OROV de pacientes e mosquitos *Culex quinquefasciatus* no Estado de Mato Grosso (CARDOSO et al., 2015).

O ciclo silvestre desse vírus é mantido por meio de pássaros, preguiças e primatas como reservatório e incluindo como vetores, além do *Aedes (Oclerotatus) serratus* já citado, os mosquitos *Coquillettidia venezuelensis* e do gênero *Culicoides* (FIGUEIREDO, 1999). Quando acidentalmente humanos são infectados, estes desenvolvem manifestações clínicas similares às relatadas em outras infecções virais, como febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia, podendo ser acompanhada de exantema, e em casos raros e mais graves meningoencefalite (BASTOS et al., 2012). Estas manifestações mais graves, foram também observadas em experimentos com hamster, além de hepatite, acompanhados de letargia, tremores, dificuldade na deambulação com tropeço frequente, sugestivo de ataxia, e, ocasionalmente, paralisia dos membros traseiros e perda de peso (RODRIGUES et al., 2011).

Figura 13 – Dispersão geográfica dos genótipos do vírus Oropouche na América do Sul, baseado em dados do gene N, no período de 1995 a 2009



Legenda: a região amarela representa a de distribuição do OROV no Brasil; as setas correspondem a dispersão dos genótipos, sendo a vermelha para o genótipo I, a azul para o genótipo II e a verde para o genótipo III; o ponto preto ilustra a ocorrência do genótipo IV.

Fonte: Autora (2016) – Adaptado de VASCONCELOS, et al. (2011)

Referente à variabilidade genética, de acordo com as sequências pertencentes ao segmento S, codificadora da proteína N, depositadas no GenBank, foram distinguidos 4 genótipos de OROV. O genótipo I inclui estirpes brasileiras isoladas nos estados do Acre, Amazonas, Maranhão, Tocantins e Pará, e estirpes de Trindade e Tobago. O genótipo II inclui cepas isoladas durante surtos no Brasil (Amapá, Pará e Rondônia) e Peru. O genótipo III é formado por estirpes isoladas no Brasil (Acre, Minas Gerais e Rondônia) e Panamá e o genótipo IV inclui estirpes brasileiras isolada no estado do Amazonas (VASCONCELOS et al., 2011) (Figura 13).

Dessa maneira, o Brasil apresenta a circulação de 4 genótipos do vírus OROV, fato que evidencia a suscetibilidade de dispersão desse vírus no país e possibilidade de ocorrência de novos surtos.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Estudar aspectos epidemiológicos e imunológicos das arboviroses circulantes em Alagoas, por meio da detecção molecular de genomas virais e caracterização do perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos.

3.2 Específicos

- Coletar amostras sanguíneas e dados epidemiológicos de indivíduos com quadro febril agudo, atendidos no Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto;

- Averiguar a presença dos genomas virais de DENV (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4), SLEV, ROCV, ILHV e OROV nas amostras séricas e de líquido obtidas dos indivíduos incluídos no estudo;

- Caracterizar o perfil demográfico, clínico e laboratorial das infecções;

- Identificar marcadores imunológicos para ocorrência de infecções graves causadas pelos arbovírus estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAL, sob protocolo nº 19172913.3.0000.5013.

4.1 Pacientes, Amostras e Dados Epidemiológicos

No presente estudo foram incluídos 230 pacientes oriundos do pronto atendimento e enfermaria do Hospital Escola Dr. Hélivio Auto (HEHA), cujos atendimentos ocorreram entre outubro de 2013 e junho de 2014 e resultaram na coleta de 205 amostras de soro e de 25 amostras de líquido. Para a inclusão no estudo, independente de sexo ou faixa etária, foi utilizada a definição de caso suspeito de dengue do Ministério da Saúde, a qual engloba pessoas que vivem em área onde se registram casos de dengue, ou que tenham viajado nos últimos 14 dias para área com ocorrência de transmissão de dengue (ou presença de *A. aegypti*), apresentando febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e duas ou mais das seguintes manifestações: náusea, vômitos, exantema, mialgias, artralgia, cefaleia, dor retroorbital, petéquias, prova do laço positiva; leucopenia; além de crianças provenientes de (ou residente em) área com transmissão de dengue, com quadro febril agudo, usualmente entre 2 e 7 dias, e sem foco de infecção aparente (BRASIL, 2016b).

Os voluntários ou responsáveis pelos mesmos (no caso de menores de 18 anos) que se enquadraram nos critérios de inclusão acima, autorizaram a participação na pesquisa por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os dados epidemiológicos foram coletados, por meio de questionário (ANEXO I), preenchido durante entrevista aos voluntários (ou responsáveis pelos mesmos) e através de averiguação dos prontuários.

4.2 Controles Virais

As cepas dos quatro sorotipos de DENV e dos vírus SLEV, ROCV, ILHV e OROV utilizadas como controles positivos neste trabalho (Tabela 3) foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Victor Hugo Aquino, do Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), da Universidade de São

Paulo. As mesmas foram cultivadas *in vitro* em células C6/36 de *Aedes albopictus* ou em células VERO E6 de *Cercopithecus aethiops* (rim de macaco verde africano) para produção de estoques virais no LAPEVI/ ICBS/ UFAL (Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia). Os isolados virais foram recolhidos do sobrenadante celular após 7 dias de infecção, e as alíquotas foram divididas e estocadas em nitrogênio líquido e em freezer -80°C.

Para a quantificação do título dos controles foi realizado o método das placas de lise com células VERO E6, estas em uma densidade de 2×10^5 células/mL.

Tabela 3 – Controles positivos utilizados no estudo e seus respectivos títulos virais

Vírus	Cepa	Título viral (PFU/mL)
DENV-1	HAWAI	1×10^5
DENV-2	NGC	$3,7 \times 10^4$
DENV-3	H87	$2,5 \times 10^2$
DENV-4	H241	$4,4 \times 10^4$
OROV	BeAn1991	$3,1 \times 10^5$
SLEV	BeH356964	2×10^5
ROCV	SPH	$3,1 \times 10^5$
ILHEUS	BeH7445	5×10^5

Legenda: PFU – *Plaque Forming Units*

4.3 Detecção Molecular

Todas as amostras do presente estudo foram submetidas à detecção molecular para os quatro sorotipos de DENV e os vírus SLEV, ROCV, ILHV e OROV.

4.3.1 Iniciadores

Para a detecção de genoma viral de Oropouche foram utilizados os iniciadores ORO N5 e ORO N3, que anelam na região do segmento S (VASCONCELOS et. al, 2011) (Tabela 4). Por sua vez, para os representantes do gênero *Flavivirus* foram

utilizados os iniciadores gênero-específico FG1 e FG2 e iniciadores espécie-específicos (Tabela 4) os quais se anelam na região do gene NS5 (BRONZONI et al., 2005).

Tabela 4 – Iniciadores utilizados no presente estudo

Iniciador	Amplicon (pb)	Sequência (5'→ 3')	Referência
ORO N5 (+) ORO N3 (-)	693	AAAGAGGATCCAATAATGTCAGAGTTCATTT GTGAATTCCACTATATGCCAATTCCGAATT	VASCONCELOS et al., 2011
FG1 (+) FG2 (-)	958	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	FULOP et al., 1993
nDEN1 (-)	472*	CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	BRONZONI et al., 2005
nDEN2 (-)	316*	GAACCAGTTTGTTRTTTCATAGCTGCC	BRONZONI et al., 2005
nDEN3 (-)	659*	TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	BRONZONI et al., 2005
nDEN4 (-)	222*	GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	BRONZONI et al., 2005
nSLE (-)	232*	ATTCTTCTCTCAATCTCCGT	BRONZONI et al., 2005
nILH (-)	474*	TCCACCGCTGATCTGAGCCCGTGA	BRONZONI et al., 2005
nROC (-)	230*	TCACTCTTCAGCCTTTTCG	BRONZONI et al., 2005

Legenda: pb: pares de base; (-): sentido anti-genômico; (+): sentido genômico; *com iniciador FG1

4.3.2 RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada por meio de kits de extração comerciais (NucleoSpin® RNA Virus, Macherey-Nagel; AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit, Axygen Biosciences; QIAamp® Viral RNA, Qiagen) seguindo as especificações do fabricante, obtendo um volume final de 50µl. Antes do armazenamento em freezer -80°C, parte do RNA extraído foi submetido à transcrição reversa (subitem 4.3.3) e à reação de One-Step RT-PCR para OROV (subitem 4.3.5).

4.3.3 Transcrição Reversa (RT)

Para a transcrição reversa foi utilizado o protocolo adaptado de BRONZONI et al. (2005), onde 8µl do RNA viral são adicionados a uma mistura de reação contendo 1X de tampão 5X (250 mM Tris-HCl [pH 8.3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 7,5mM de DTT, 0,2mM de dNTP, 0,3mM do iniciador FG2 (gênero-específico para *Flavivirus*),

20U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen), 100U de transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen), completando o volume final da reação para 20 µl com água ultrapura – DEPC. A mistura foi incubada por 60min a 50°C e 70°C por 15min.

4.3.4 PCR gênero-específica para Flavivirus e Nested-Multiplex-PCR espécie-específica

A fim de detectar o genoma viral de SLEV, ILHV, ROCV e dos sorotipos de DENV foram realizadas PCRs gênero-específica e posteriormente Nested-Multiplex espécie-específica, conforme protocolo adaptado de BRONZONI et al. (2005). Para a reação de PCR 8µl de cDNA foram adicionados em uma mistura contendo 5X de tampão 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,3mM de iniciador FG1, 1U de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen), completando o volume final da reação para 50µl com água ultrapura – DEPC. A mistura foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, com um cliço de extensão final de 72°C por 2 min. Por sua vez, para a reação de nested foram realizadas duas multiplex, uma com os iniciadores para identificar os sorotipos de DENV (nDEN-1, nDEN-2, nDEN-3 e nDEN-4) e outra com os iniciadores para SLEV, ILHV e ROCV (nSLE, nILH e nROC). Para cada multiplex foram utilizados 3µl de produto da primeira reação de PCR, 5X de tampão 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,3mM de iniciador FG1, 0,3mM de cada iniciador espécie-específico, 1U de Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen) completando o volume final da reação para 50µl com água ultrapura – DEPC. A mistura foi submetida a 25 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 2 min, com um cliço de extensão final de 72°C por 2 min.

4.3.5 One-Step RT-PCR para OROV

O ensaio para detecção de genoma viral de Oropouche seguiu os parâmetros preconizados por Vasconcelos e colaboradores (2009), onde para um volume final de 50µl foram utilizados, 5µl de RNA, 5X de tampão 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2,5mM de DTT, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,3mM de cada iniciador (ORO N5 e ORO N3), 20U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen), 100U de transcriptase reversa SuperScript II, Invitrogen), 1,25 U de Taq DNA polimerase

(Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen) completando o volume final com água ultra pura – DEPC. A mistura foi incubada por 65min a 42°C, em seguida submetida a 35 ciclos de 90°C por 1 min, 60°C por 2 min e 72°C por 3min, finalizando com uma etapa de extensão final de 72°C por 5 min.

4.4 Sequenciamento e análise filogenética

A purificação e sequenciamento das amostras foram realizados em parceria com os laboratórios do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (CPV-FMRP-USP) e de Virologia Molecular da FIOCRUZ do Paraná. Para tanto, foi utilizado parte do gene NS5 (958pb), amplificado na reação de PCR gênero-específica.

As sequencias disponíveis no GenBank utilizadas para a construção da árvore foram selecionadas de acordo com os valores de query cover, e-value e ident gerados após blastn das amostras 151H e 628H (HALL, 2013).

A árvore foi estimada utilizando o algoritmo de máxima verossimilhança (ML), conforme implementado no software MEGA6.06, com base no modelo evolutivo de Tamura Nei (TN93) assumindo uma distribuição gamma (+G) e uma proporção de sítios invariáveis (+I). Para a identificação das cepas foram utilizadas as seguintes informações: número de acesso no GenBank_Sigla do país_Ano.

4.5 Quantificação de citocinas séricas

A determinação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro de parte dos indivíduos com RNA viral detectado, foi realizada em parceria com o laboratório de Virologia Molecular da FIOCRUZ do Paraná, onde foi utilizado o kit “Human Inflammatory Cytokines” (BD Biosciences), o qual mensurou os níveis de interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-12p70 (IL-12p70).

Para tanto, 50 μ L de soro com (n=46) e sem (n=10) RNA viral detectado (estes doados por voluntários saudáveis) foram previamente transferidos para placas de 96 poços com fundo em U. A estas foram adicionados 50 μ L de mistura de “beads” e detector, fornecidos pelo kit, incubando-se por 3 horas a temperatura ambiente,

protegidos da luz. Após a incubação, foi adicionado aos poços 100 µL de “Wash Buffer” (1X de solução salina tamponada com fosfato [PBS]) e foi realizada uma centrifugação de 1500 x g por 2 min sendo o sobrenadante descartado. As “beads” foram recuperadas com 200 µL de “Wash Buffer” e a determinação das concentrações das citocinas foram obtidas por meio do citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados de citometria foram analisados no programa “FCAP Array, v1.0.1, da Soft Flow Hungary Ltd.”, obtendo-se assim as concentrações das citocinas em pg/mL.

4.6 Estatística

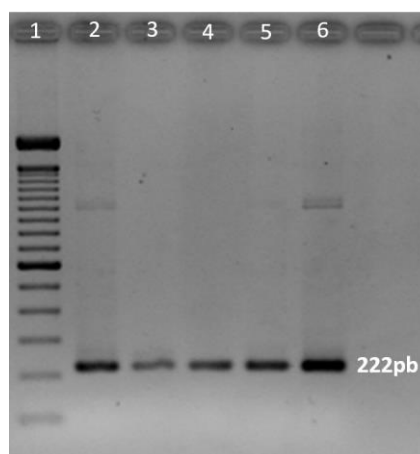
Apenas os dados das amostras com RNA viral detectado foram submetidos a análise estatística e elaboração dos gráficos utilizando o software GraphPad Prism 6. Para análise de dados qualitativos foi utilizado o teste de Chi-quadrado. Por sua vez, para análise dos dados quantitativos, como estes não apresentaram distribuição normal, para comparação entre duas medianas foi utilizado o Teste t de Mann-Whitney já no caso de comparações foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. E quando o objetivo foi a busca de correlações, utilizou-se o Teste de correlação de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção Molecular

Dos 230 indivíduos que tiveram suas amostras analisadas neste estudo, 85 (36,96%) tiveram RNA viral detectável (Figura 14), sendo que entre as 205 amostras de soro isso representou 41,46% das amostras. Nestas amostras, foi detectado RNA viral apenas de DENV-4. Não foram encontradas amostras positivas para SLEV, ILHV, ROCV, OROV e nem para os demais sorotipos de DENV. Da mesma forma, entre as 25 amostras de líquido não houve detecção molecular de nenhum dos vírus averiguados no presente estudo.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose de amplicons da Multiplex-Nested-PCR mostrando amplicons de amostras DENV-4 positivas

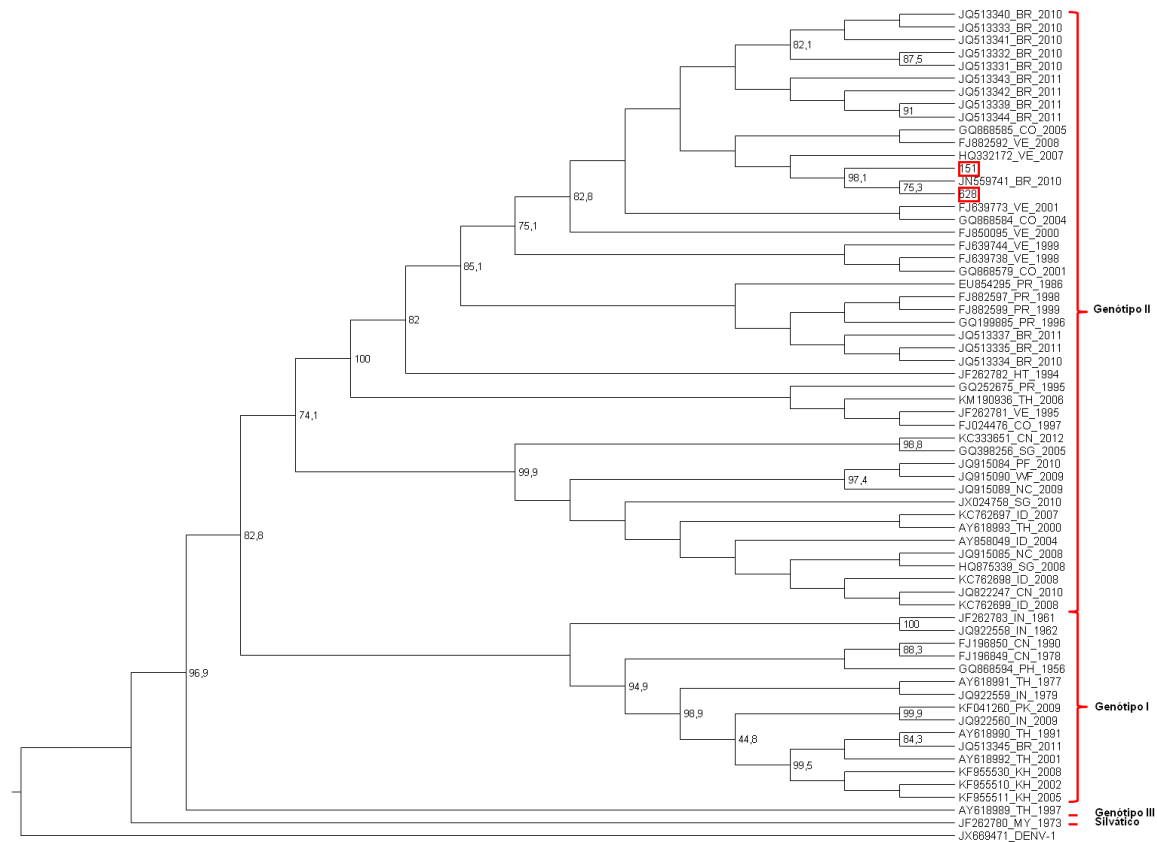


Legenda: gel de agarose a 1,8%. 1 – marcador molecular (100pb); 2 a 5 – soro de pacientes; 6 – controle positivo de DENV-4.

5.2 Análise filogenética

Quanto à genotipagem do DENV-4 encontrado no estudo, por meio do sequenciamento do amplicon gerado na PCR gênero-específica para *Flavivirus* (958pb) da região NS5 do genoma viral de duas amostras positivas para DENV-4, foi observado que estas se incorporam ao genótipo II e que estão fortemente agrupadas (98,1%) com a estirpe isolada em Boa Vista, Roraima (JN559741) (Figura 15).

Figura 15 - A análise filogenética das sequências do gene NS5 de DENV-4



A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança com um modelo de parâmetro TN93 + G + I usando software MEGA6.06. Os números à direita dos nós representam valores de bootstrap (> 70, 1000 repetições). A árvore estava enraizada no meio e os comprimentos dos ramos não refletem as distâncias genéticas. Rotulagem dos estipes: número de acesso GenBank_país_ano de isolamento. CO: Colômbia; CL: Chile; CN: China; ID: Indonésia; IN: Índia; KH: Cambodia; MY: Malásia; NC: New Caledonia; PH: As Filipinas; PK: Paquistão; PR: Porto Rico; SG: Singapura; TH: Tailândia; VE: Venezuela; WF: Wallis e Futuna.

5.3 Aspectos epidemiológicos

Das amostras com diagnóstico molecular positivo para dengue, 44 pertenciam a indivíduos do gênero masculino e 41 do feminino (Figura 16), com média de 28,52 anos de idade (desvio-padrão $\pm 12,14$), sendo a grande maioria adultos (75,29%) (Figura 17) seguindo a classificação de faixa etária com base no Estatuto da Criança e do Adolescente e no Estatuto do Idoso (BRASIL, 1990; BRASIL, 2003).

Figura 16 – Proporção por gênero dos indivíduos com RNA viral detectado

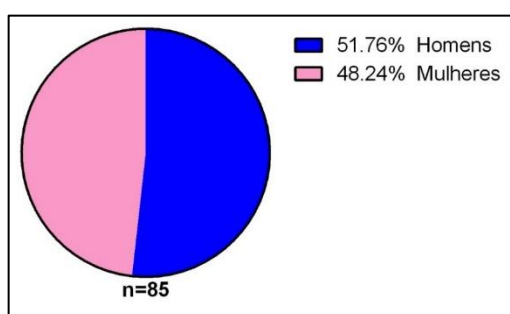
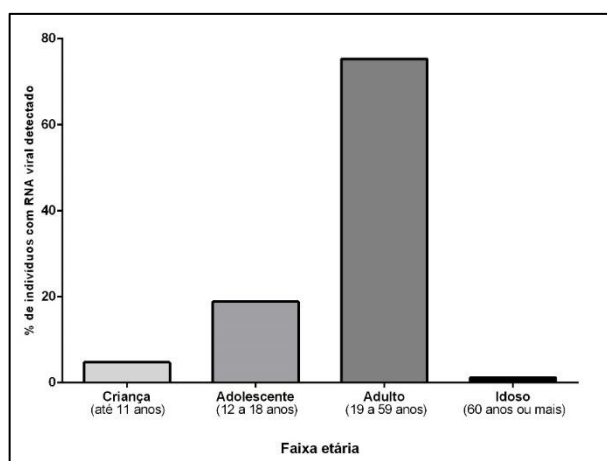
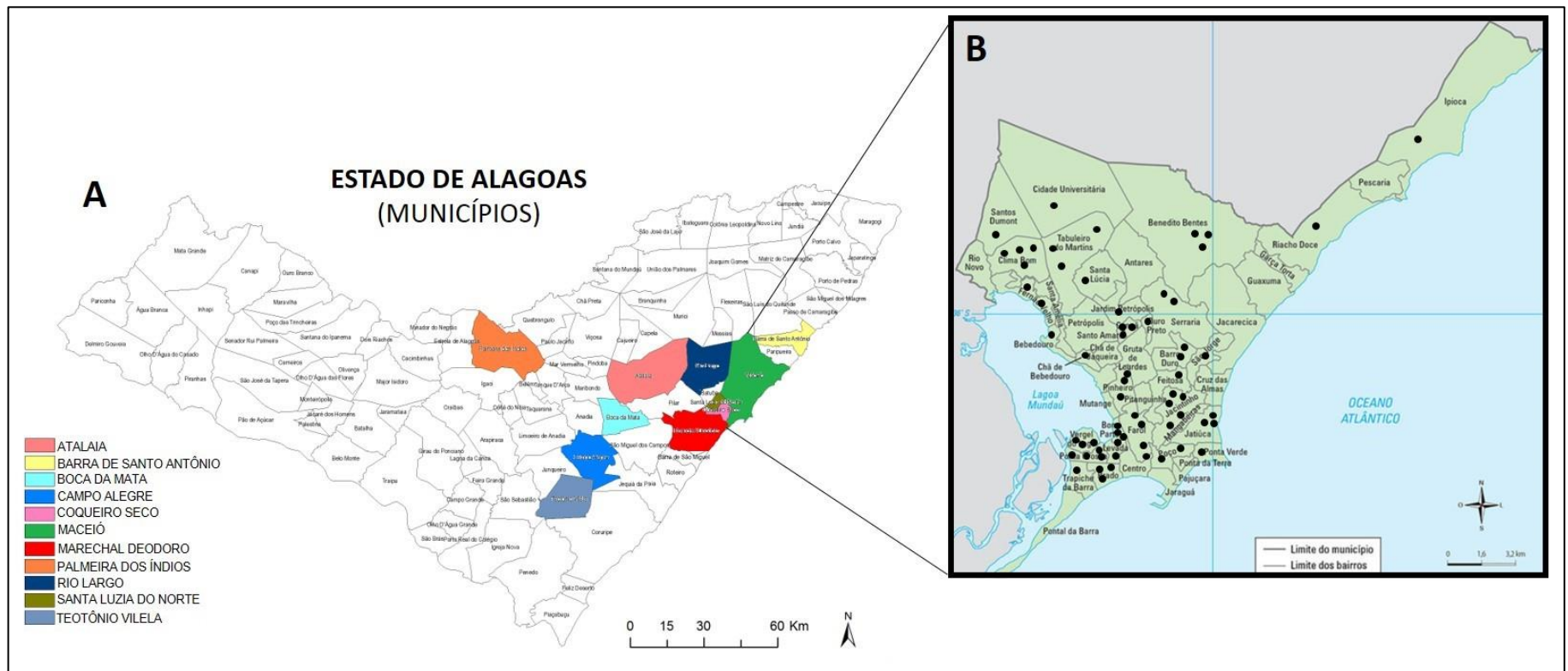


Figura 17 – Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por faixa etária



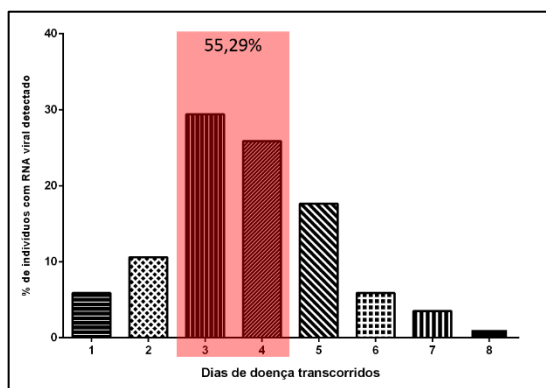
Em relação ao local de habitação, observamos que estes 85 indivíduos estão distribuídos em 11 municípios alagoanos, sendo a grande maioria (77,65%) residente na capital do Estado, Maceió (Figura 18A), com representantes em 31 dos 50 bairros que compõe a mesma (Figura 18B).

Figura 18 – Distribuição dos indivíduos com RNA viral detectado nos municípios do Estado de Alagoas (A) e nos bairros da capital, Maceió (B)



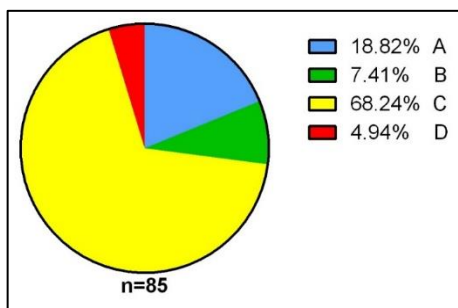
No que tange ao período da doença, a partir do início da febre, em que estes indivíduos com diagnóstico molecular positivo se apresentavam no momento da coleta da amostra de soro, eles estavam em média com 3,78 dias de doença (desvio-padrão $\pm 1,45$), havendo mais representantes com manifestações clínicas a 3 e a 4 dias (Figura 19).

Figura 19 - Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por período com manifestações clínicas até o dia da coleta de amostra



Quanto ao espectro clínico e classificação de risco preconizados pelo Ministério da Saúde aos pacientes com dengue (BRASIL, 2016), levando em consideração indicadores clínicos e laboratoriais, 68,24% destes pacientes se enquadram no Grupo C de risco (Figura 20) – indicativo de caso de urgência, com necessidade de atendimento rápido.

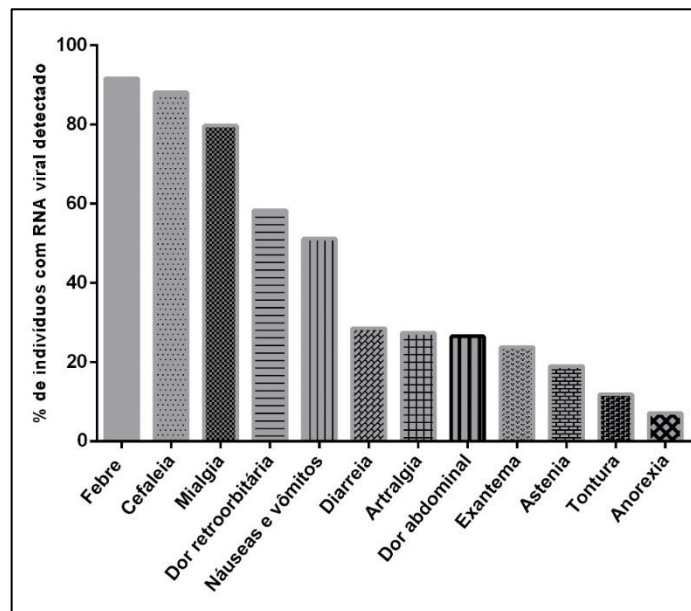
Figura 20 – Proporção dos indivíduos com RNA viral detectado por classificação de risco para dengue



Em relação aos sinais clínicos (Figura 21), foi observado que os sintomas predominantes entre as pessoas com RNA viral detectado foram, febre (91,67%),

cefaleia (88,10%) e mialgia (79,76%). Outros sintomas geralmente associados com infecções provocadas pelo vírus da dengue como dor retroorbitária e artralgia foram relatados por 58,33% e 27,38% das pessoas, respectivamente. Ainda, este grupo era composto por indivíduos que tiveram episódios de vômitos (51,19%) e que se queixaram de dor abdominal (26,51%), considerados estes como sinais de alarme em infecções pelo vírus dengue.

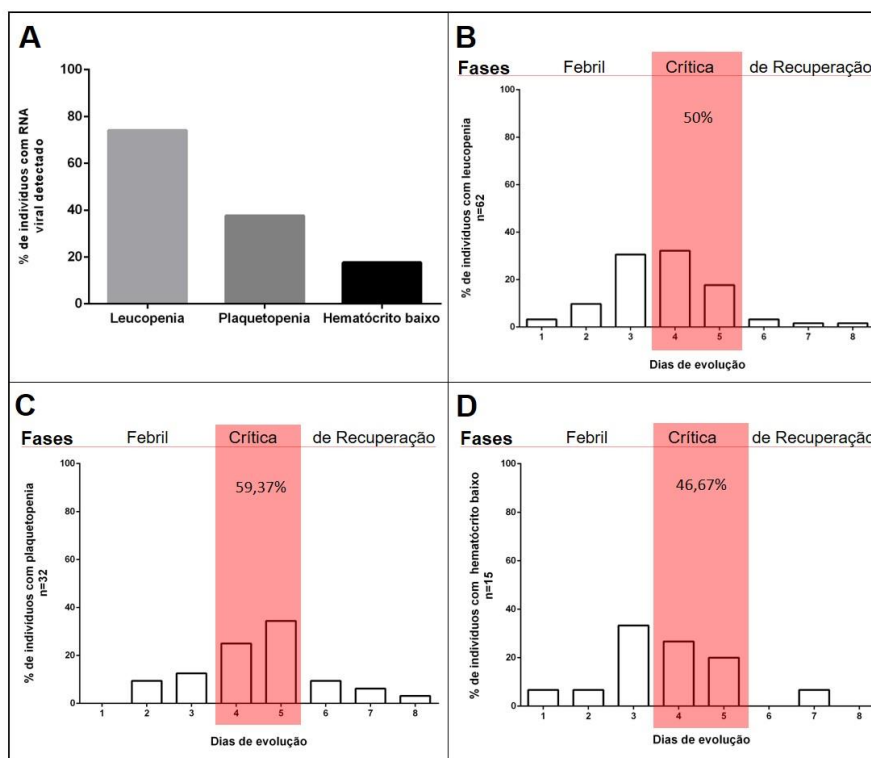
Figura 21 – Sinais clínicos dos indivíduos com RNA viral detectado



Por sua vez, analisando resultados de exames laboratoriais foi visto que grande parte das as pessoas com RNA viral detectado desenvolveram leucopenia (74,12%), e menos da metade apresentaram plaquetopenia (37,65%) (Figura 22A) o que reflete em uma média de contagem de plaquetas igual a $155.916,5/\text{mm}^3$, estando a maioria destes no 3º ou 4º dias e 4º ou 5º dias de manifestação de sintomas, respectivamente (Figura 22 B e C).

Outro fato interessante foi observar que este grupo teve apenas um caso de hemoconcentração – estado clínico que indica provável alteração de permeabilidade capilar (extravasamento plasmático) – sendo mais constante indivíduos apresentando queda de hematócrito (17,65%) (Figura 22 A), estando a maioria no 3º ou 4º dias de manifestação de sintomas (Figura 22 D).

Figura 22 – Sinais laboratoriais dos indivíduos com RNA viral detectado (A) e porcentagem de casos por dia de manifestação clínica (B, C e D)



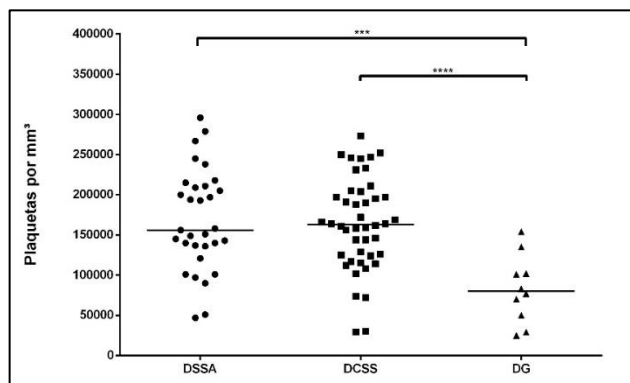
Ainda, analisando as células mensuradas no hemograma de acordo com o quadro clínico dos pacientes, este subdividido em três grupos: dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG), foi observado que as medianas são diferentes estatisticamente quando relacionadas a contagem de plaquetas (Tabela 5), apresentando plaquetopenia os pacientes classificados como dengue grave (Figura 23).

1 Tabela 5 – Mediana dos parâmetros laboratoriais por quadro clínico

	DSSA (n=31)	DCSA (n=44)	DG (n=10)	P
Contagem de plaquetas	156.000	163.000	80.000	> 0,01*
Contagem de leucócitos	3.600	4.130	5.360	0,33
Contagem de neutrófilos imaturos	90,0	92,5	0,0	0,35
Contagem de neutrófilos maduros	2.041	2.408	2.209	0,60
Contagem de monócitos	337,2	224,3	130,4	0,12
Contagem de linfócitos	1029	969,6	630	0,30

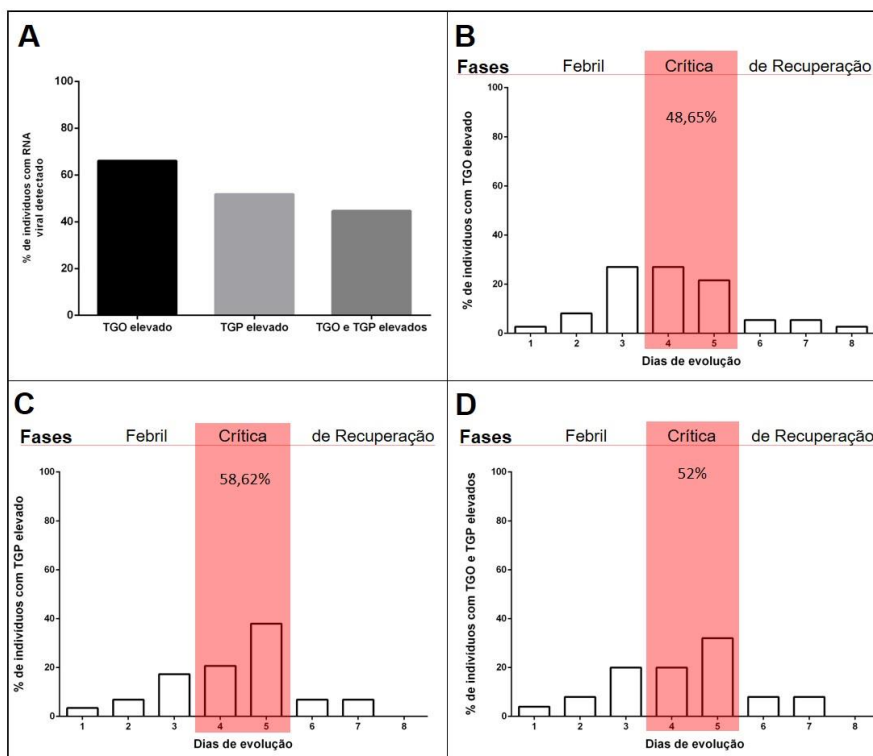
Legenda: DSSA – Dengue sem sinais de alarme; DCSA – Dengue com sinais de alarme; DG – Dengue grave. * valores significativos segundo o teste Kruskal-Wallis – $P < 0,05$.

- 1 **Figura 23 – Contagem de plaquetas de indivíduos com RNA viral detectado, agrupados de acordo com diagnóstico clínico**
- 2



Legenda: São mostrados os valores individuais e mediana de cada grupo. O número de plaquetas/mm³ do grupo DG mostraram menores em relação aos grupos DSSA ($P < 0,01$) e DCSS ($P < 0,0001$), contudo entre estes não houve diferença significativa ($P = 0,89$). Para esta constatação foi realizado o teste de Mann-Whitne.

Figura 24 – Frequência de indivíduos com altos níveis de TGO e/ou TGP e a porcentagem de casos por dia de manifestação clínica (B, C e D)

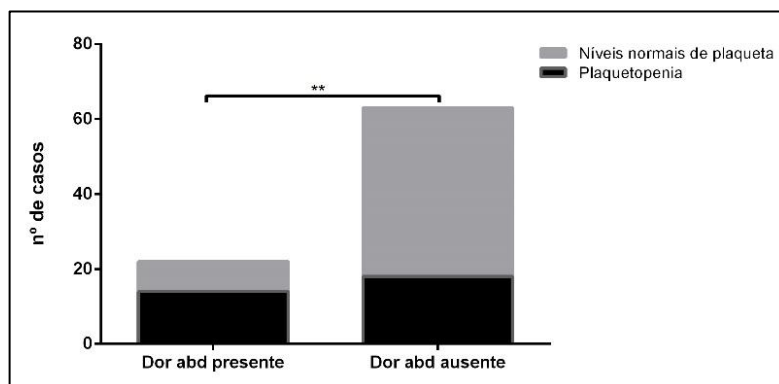


Neste grupo, ainda foi constatado níveis elevados de TGO e TGP entre 44,64% dos 56 indivíduos com RNA viral detectado que tiveram solicitação de quantificação

destas transaminases (Figura 24 A), o que indica uma possível lesão hepática provocada pelo vírus dengue, estando a maioria destes na fase crítica da doença (Figura 24 C).

Além disso, buscou-se averiguar existência de correlação entre as manifestações clínicas e as laboratoriais, preconizadas como sinais de alarme em infecções pelo vírus dengue, havendo indicativo de forte correlação ($p.0,0035$) apenas entre o relato de dor abdominal com o desenvolvimento de plaquetopenia (Figura 25).

Figura 25 – Associação entre manifestação de dor abdominal com desenvolvimento de plaquetopenia nos indivíduos com RNA viral detectado



Legenda: abd – abdominal. São mostrados a proporção casos de plaquetopenia entre o grupo de indivíduos que manifestam e não manifestam dor abdominal. Observou-se correlação significativa entre manifestação de dor abdominal com plaquetopenia ($P<0,01$) segundo teste de Chi-quadrado.

5.4 Citocinas

Dentre as 46 amostras que tiveram citocinas quantificadas quase 60% estão enquadradas na classe de risco C (Figura 26) e apresentaram níveis elevados significativos para IL-6, IL-8 e IL-10 (Figura 27). Diante disto, buscou-se averiguar correlação entre os níveis dessas citocinas com o quadro clínico e manifestações laboratoriais destes indivíduos.

Figura 26 – Proporção dos indivíduos com citocinas quantificadas por classificação de risco para dengue

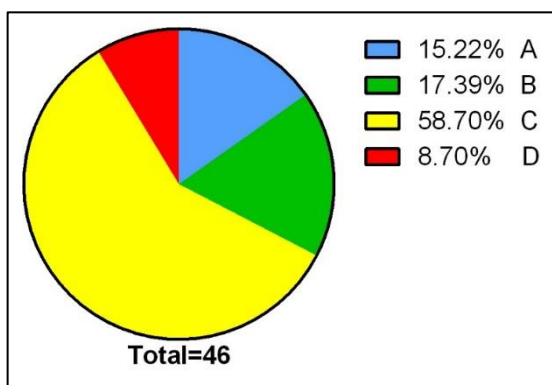
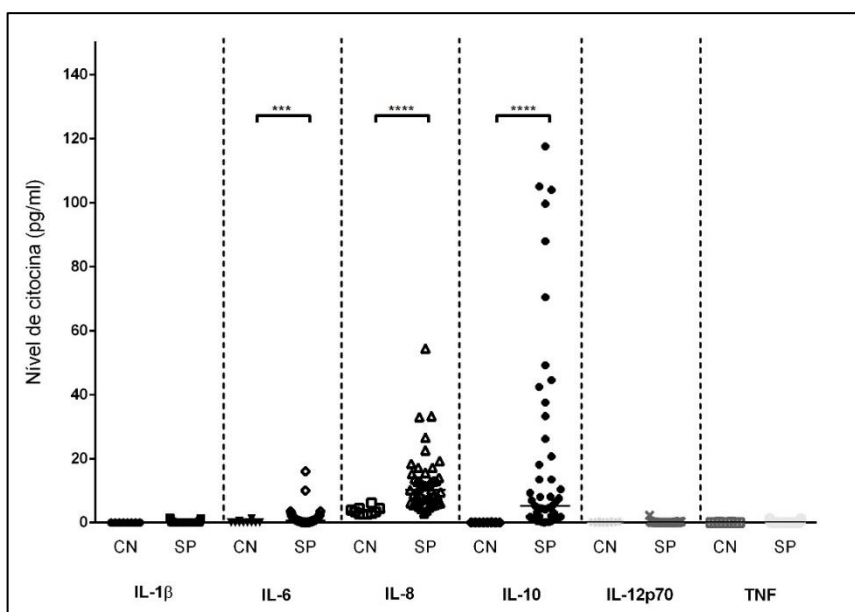


Figura 27 – Níveis de citocinas pró-inflamatórias (pg/ml) em soro de voluntários saudáveis (CN) e pacientes com RNA viral detectado



Legenda: CN – controle negativo; SP – soro de paciente. São mostrados os valores individuais e mediana de cada grupo, para cada citocina. Houve diferença significativa entre os níveis de CN e SP para IL-6 ($P < 0,01$), IL-8 ($P < 0,01$) e IL-10 ($P < 0,01$). Para esta constatação foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Para a análise tomando como base o quadro clínico, os indivíduos foram agrupados em três grupos: dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG). Inicialmente foi observado diferença significativa entre os grupos apenas para níveis de IL-10, o qual estava mais elevado

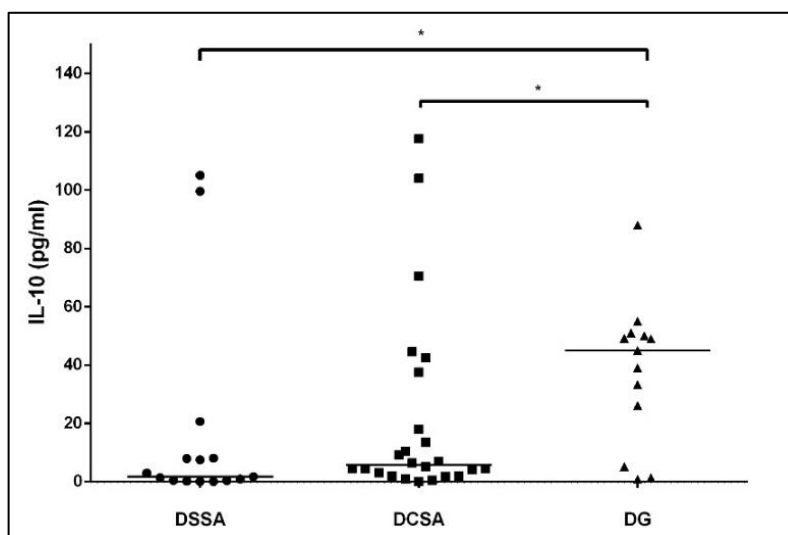
nos indivíduos com manifestações grave de dengue (Tabela 6). Realizando testes posteriores, verificou-se que os níveis de IL-10 foram similares entre os grupos DSSA e DCSA, havendo diferença estatística significativa apenas entre os níveis de IL-10 desses grupos com os níveis do grupo DG (Figura 28).

Tabela 6 – Níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 por quadro clínico de dengue

	<i>n</i>	IL-6		IL-8		IL-10	
		Md	<i>P</i>	Md	<i>P</i>	Md	<i>P</i>
Dengue <u>sem</u> sinais de alarme	15	0,40		8,32		1,76	
Dengue <u>com</u> sinais de alarme	24	0,07	0,76	11,6	0,31	5,82	0,02*
Dengue grave	7	1,04		12,72		45,00	

Legenda: Md – mediana. * valores significativos segundo o teste Kruskal-Wallis – $P < 0,05$.

Figura 28 – Níveis de IL-10 de indivíduos com RNA viral detectado, agrupados de acordo com manifestações clínicas



Legenda: São mostrados os valores individuais e mediana de cada grupo. Os níveis de IL-10 do grupo DG mostraram mais elevados em relação aos grupos DSSA ($P=0,01$) e DCSA ($P=0,04$), contudo entre estes não houve diferença significativa ($P=0,1$). Para esta constatação foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Quanto as manifestações laboratoriais foram constatadas correlação negativa significativa entre os níveis de IL-6 com a contagem de linfócitos, entre os níveis de IL-10 com a contagem de monócitos e leucócitos, e ainda correlação negativa significativa entre os níveis de IL-8 e IL-10 com a contagem de plaquetas (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação entre os níveis de IL-6, IL-8 e IL-10 com parâmetros laboratoriais

	IL-6		IL-8		IL-10	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Contagem de plaquetas	-0,05	0,73	-0,30	0,04*	-0,40	< 0,01*
Contagem de leucócitos	-0,04	0,77	-0,11	0,48	-0,37	0,01*
Contagem de neutrófilos imaturos	0,16	0,24	0,02	0,90	0,06	0,70
Contagem de neutrófilos maduros	0,23	0,12	-0,11	0,47	-0,21	0,16
Contagem de monócitos	-0,17	0,27	-0,22	0,13	-0,45	< 0,01*
Contagem de linfócitos	-0,34	0,02*	-0,01	0,94	-0,13	0,38

Legenda: Parâmetros comparados por meio do teste de correlação de Spearman. * valores significativos – $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo, salvo os boletins do Ministério da Saúde, são os primeiros registros de informações epidemiológicas sobre arboviroses no Estado de Alagoas.

Neste trabalho, durante período de epidemia de dengue entre 2013-2014, buscamos indícios de circulação de outros arbovírus (SLEV, ILHV, ROCV e OROV) além do dengue, sabidamente endêmico no estado desde 1986 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Obtivemos a detecção molecular apenas para o sorotipo 4 de dengue, a qual é de extrema relevância para o estado e para o Ministério da Saúde, pois em 2014 não havia registro do sorotipo circulante em Alagoas (BRASIL, 2015). Vale ressaltar que apesar das análises epidemiológicas terem sido realizadas apenas nas amostras dos indivíduos com RNA viral detectado, estas servem como fomento para levantamento de hipóteses e direcionamento de novos estudos.

Já em relação a não detecção dos outros arbovírus pesquisados, deve-se provavelmente pela baixa frequência de detecção molecular desses em humanos, havendo por vezes, descrições de um único caso (ROCCO et al., 2005; JOHNSON et al., 2007; MONDINI et al., 2007a; MONDINI et al., 2007b; TERZIAN et al., 2009; VASCONCELOS, et al., 2009; TERZIAN et al., 2011; VENEGAS et al., 2012; MAIA et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; HEINEN et al., 2015). Diante disso, não se pode descartar a circulação desses e nem de outros arbovírus em Alagoas, sendo indicado além da busca por genoma viral em humanos, fazê-la em *pool* de mosquitos previamente relatados como vetores, e realizar ainda busca por anticorpos neutralizantes para o vírus de interesse não só na população, mas em animais já descritos como reservatórios (mamíferos e aves silvestres) bem como sentinelas (equinos), como foi recentemente realizado para o vírus SLEV e ROCV em alguns estados do país (SILVA et al., 2014).

Foi notório ainda, que apesar das amostras terem sido obtidas em um hospital de referência no tratamento de doenças infecto-contagiosas no estado, houve predominância de indivíduos residentes em Maceió, possivelmente por ser o município onde está situado o hospital, facilitando aos moradores da capital o acesso ao mesmo. Além deste fator, o local de obtenção das amostras provavelmente

também interferiu na captação do perfil clínico dos pacientes, que em sua grande maioria foram categorizados no Grupo C de risco. Isto, visto que o Hospital HEHA é o local para onde são encaminhados os casos graves de dengue a partir de outras unidades de saúde da capital.

Ainda, com acesso ao Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA) do ano de 2014, concedido pelo coordenador dos agentes de endemia de Maceió, observamos que 17 dos 31 bairros que neste estudo tiveram como residentes indivíduos infectados pelo vírus dengue, foram citados como locais de alto risco para ocorrência de epidemias. Para outros bairros também citados como locais de alto risco, exemplo Centro, Pajuçara e Jaraguá, não tivemos casos confirmados, provavelmente por serem regiões utilizadas para lazer e trabalho sugerindo que os indivíduos ao serem transeuntes nestes locais, foram infectados.

Em relação aos sinais clínicos, observamos que indivíduos com RNA viral detectado relataram sintomas comuns a infecções provocadas pelo vírus dengue, porém quase metade manifestaram vômito e dor abdominal, sendo estes sinais clínicos considerados como de alarme. Este foi um dos motivos para que a maioria destes indivíduos fossem classificados no grupo C de risco e provavelmente isto ocorreu por maior parte estar no terceiro ou quarto dia de infecção, período este caracterizado como de transição da fase febril para a crítica, onde é comum surgir os sinais de alarme para dengue (BRASIL, 2016b).

Por sua vez, observando as manifestações laboratoriais, grande parte (mais de 70%) dos indivíduos com RNA viral detectado desenvolveram leucopenia, com alta contribuição de indivíduos no terceiro ou quarto dia de infecção, possivelmente por estes dias serem o que possuem mais representantes neste estudo.

Além disso, o interessante foi observar que menos da metade das pessoas desenvolveram plaquetopenia, estando a média de contagem de plaquetas (~156 mil/mm³), dentro da faixa de normalidade. Isto porque, em um estudo com pacientes infectados por DENV-4, em período de viremia similar (média de 3,69 dias de doença), observou-se que este induzia não só a apoptose de plaquetas como a fagocitose das mesmas, o que refletiu no estabelecimento do quadro de plaquetopenia nos pacientes, que apresentaram, em média, 45.520/mm³ de plaquetas (ALONZO et al., 2012).

Somado a isto, a maioria dos pacientes estavam no período onde este sinal clínico é comumente observado, o qual inicia a partir do terceiro dia de infecção, perdurando até o fim da fase crítica, no sexto dia (BRASIL, 2016b). Contudo, ao agrupar os pacientes de acordo com o quadro clínico, aqueles que manifestavam a forma grave da doença apresentavam plaquetas mais baixas que os demais.

Isto, junto com a correlação significativa entre a manifestação de dor abdominal e a contagem de plaquetas abaixo da normalidade, reforça que a manifestação de plaquetopenia serve de critério para prognóstico de gravidade da doença e reafirma dor abdominal como um sinal de alarme (BRASIL, 2016b), contribuindo assim com o manejo clínico enquanto o paciente estiver no aguardo do resultado dos exames.

Ainda, neste grupo houve indivíduos com níveis baixos de hematócrito, sendo a maioria pessoas que estavam no terceiro dia de infecção, um achado contrário ao esperado, que seria o acréscimo dos níveis, ou seja, desenvolvimento de hemoconcentração (BRASIL, 2016b). Dessa maneira, vale investigar se a baixa de hematócrito é achado corriqueiro em indivíduos infectados em Alagoas ou em outros estados, visto que usualmente não é incluída como sinal de alarme de dengue apesar de ser indicativo de hemorragias (BRASIL, 2016b).

Somado a isto, boa parte dos indivíduos com RNA viral detectado (44,64%) tiveram elevação nos níveis das transaminases TGO e TGP, o que consiste em uma recente manifestação clínica relacionada às formas graves de dengue (HABARAGAMUWA; DISSANAYAKA, 2014; GUZMAN; HARRIS, 2015), e que acomete até 50% dos pacientes, podendo evoluir para comprometimento severo das funções hepáticas, caso o acréscimo da expressão das aminotransferases esteja aumentado 10 vezes (BRASIL, 2016b). Contudo, vale fazer menção de que apenas o aumento de expressão de TGO, como foi observado em grande parte dos indivíduos desse grupo, não serve por si só como indicativo de dano hepático, pois este também está associado a possíveis lesões no coração, músculos, rim e cérebro (órgãos que também produzem esta enzima) e que geralmente os seus níveis se elevam com frequência e proporção maior que TGP, possivelmente pelo comprometimento que o vírus da dengue provoca nos músculos esqueléticos (MARÍN et al., 2013).

Observamos também, entre indivíduos com RNA viral detectado que tiveram citocinas dosadas, níveis significativos de IL-6, IL-8 e IL-10 em relação aos controles negativos, diferente dos níveis de IL-1 β , IL-12p70 e TNF que não sofreram alteração em comparação aos níveis dos indivíduos saudáveis. Diante do que já foi publicado no Brasil, nossos dados condizem com o observado em Minas Gerais, onde o incremento das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 foram significativos em pacientes com manifestações graves de dengue, relatando ainda que os indivíduos infectados pelo DENV-3 produziram mais IL-10, do que os infectados pelos sorotipos 1 e 2 (IANI et al, 2016).

A respeito da IL-1 β , estudos previamente comprovaram que pacientes infectados pelo vírus dengue não apresentam alterações no nível dessa citocina (HOBBER et al., 1993; LAUR et al., 1998; CHATURVEDI et al., 2000). Por sua vez, há relatos que as citocinas IL-12p70 e TNF são produzidas em resposta a infecção pelo vírus dengue e possuem papel importante na resposta imune inata (CHATURVEDI et al., 2000; PERÉZ et al., 2004; YOU et al., 2010; BOONNAK et al, 2011, ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Além disso, sabe-se que IL-6 é secretada por macrófagos e linfócitos em resposta a lesões ou infecções e o aumento significativo desta em pacientes com dengue têm implicações na gravidade das infecções, desempenhando um papel importante na produção de anticorpos antiplaquetários ou anti-endoteliais, o que acarreta a perda de plasma e hemorragias (HEINRICH et al., 2003; RACHMAN; RINALDI, 2006; BUTTHEP et al, 2012). Entretanto, buscando relação entre esta citocina e os parâmetros mensurados por hemograma foi observada correlação negativa entre o número de linfócitos e os níveis dessa citocina, nos levando a pensar que sua secreção ocorreu por meio de outra fonte.

Quanto a IL-8, esta é produzida pelas células endoteliais e possui papel importante no recrutamento e degranulação de neutrófilos, responsáveis pela vasodilatação e a aumento da permeabilidade vascular em infecções pelo vírus dengue (JUFFRIE et al., 2000; HUANG et al., 2000; LEE et al., 2006). Devido a isto, ela está relacionada aos casos graves de dengue, pois em respostas exacerbadas a infecção, seu papel de ativação de neutrófilos gera extravasamento plasmático,

comprovado pela correlação com a redução de plaquetas, observada neste estudo e por HUANG et al. (2000). Contudo, não observamos nenhuma correlação significativa com os níveis de neutrófilos, tanto imaturos quanto maduros.

Por sua vez a IL-10, produzida por monócitos, macrófagos e células T em resposta de perfil Th2 (ROTHMAN, 2011; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; GUZMAN; HARRIS, 2015; ADIKARI et al., 2016), está associada a casos graves de dengue, por supostamente facilitar a replicação viral durante a resposta secundária a infecção pelo DENV (PÉREZ et al., 2004). Por isto vem sendo indicada como um biomarcador da gravidade de dengue (GREEN et. al., 1999). Isto nos remete a hipótese de que os indivíduos do nosso estudo estão respondendo a uma infecção ao DENV secundária. Ainda observamos correlação negativa significativa com a contagem de plaquetas, assim como MALAVIGE et al. (2004), e com a contagem de leucócitos, bem como observado por MALAVIGE et al. (2013). Ainda houve correlação negativa significativa entre os níveis de IL-10 com o número de monócitos, o que possivelmente caracteriza um efeito de supressão na replicação dessas células, fato que acarretaria em um déficit na resposta imunológica contra a infecção viral.

Outra contribuição importante foi identificarmos o sorotipo de dengue que circulou em 2014 em Alagoas, uma informação que não estava disponível nem para os órgãos de vigilância epidemiológicas do estado e município de Maceió. Este estudo mostrou que o sorotipo DENV-4, circulante em Alagoas, pertence ao genótipo II, sendo este, juntamente com o genótipo I, os já relatados como circulantes no Brasil (FARES et al., 2015; PINHO et al., 2015). Somado a isto, devido ao forte agrupamento (98,1) com a estirpe isolada em Boa Vista, Roraima (JN559741) no ano de 2010, onde ocorreu a reemergência do DENV-4 no Brasil e a introdução deste em Alagoas (NUNES et al., 2012; FARES et al., 2015), podemos confirmar que a estirpe circulante no estado foi a introduzida no país em 2010 proveniente da Venezuela.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, identificamos que o sorotipo de dengue circulante em Alagoas em 2014 foi o 4, sendo este último introduzido no Estado em 2010, na reemergência do DENV-4 no Brasil.

Ainda, verificamos que os sintomas comumente relacionados a infecções provocadas pelo vírus dengue foram predominantes. Contudo houve manifestações inesperadas, como decréscimo do nível de hematócrito e plaquetopenia em menos da metade dos casos, porém estes compostos por indivíduos com quadro clínico grave, sugerindo particularidades clínicas aos indivíduos ou estirpe do presente estudo.

Foi constatado também a importância da requisição da quantificação das transaminases, TGO e TGP, pois mais da metade dos indivíduos que tiveram essas enzimas quantificadas apresentaram aumento no nível de expressão de alguma ou de ambas, o que confere risco a lesão hepática ou em outros órgãos como coração, músculos, rim e cérebro.

Além disso, foi possível verificar que a queixa de dor abdominal possuiu forte correlação com a manifestação de plaquetopenia, o que corrobora em este ser um sinal de alarme para dengue e um possível sintoma que indique alta chance de ocorrência de extravasamento plasmático e/ou hemorragia. Somado a isto identificamos altos níveis de IL-10 em indivíduos com dengue grave, o que confirma o uso desta citocina como um biomarcador de gravidade da doença e pode auxiliar na conduta de tratamento adequado.

Após o exposto fica claro que os dados aqui observados são de grande importância para os órgãos de vigilância epidemiológica de Alagoas visto, antes desta, não havia pesquisa voltada ao vírus dengue no estado. Contudo, faz-se necessário mais estudos levando em consideração também os indivíduos com genoma viral não detectado a fim de traçar um perfil clínico da população de Alagoas e poder deixar a par órgãos e profissionais de saúde quanto as manifestações clínicas desenvolvidas pelos casos notificados de dengue.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 7a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ADIKARI, T. N. et al. Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)-10 by monocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, v.184, p.90–100, 2016.

ALONZO, M. T. G. et al. Platelet Apoptosis and Apoptotic Platelet Clearance by Macrophages in Secondary Dengue Virus Infections. **Int. J. Infect. Dis.**, v.205, p.1321–1329.

ANDERSON, C.R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad. West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.10, p.574–578, 1961.

ANEZ, G. et al. Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. **ISBT Science Series**, v.7, p.274–282, 2012.

BALEOTTI, F.G; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian *Flavivirus* Phylogeny Based on NS5. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.98, n.3, p.379-382, 2003.

BARRETO, M.L; TEIXEIRA M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. Av.**, v.22, n.64, 2008.

BARROS, V.E.D. et al. An Experimental Model of Meningoencephalomyelitis by Rocio Flavivirus in Balb/C Mice: Inflammatory Response, Cytokine Production, and Histopathology. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.2, p.363–373, 2011.

BASTOS, M. de S. et al. Short Report: Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the Cerebrospinal Fluid of Three Patients in the Amazonas, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.86, n.4, p.732–735, 2012.

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

BOONNAK, K. et al. Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J. Virol**, p. 1671–1683, 2011.

BRASIL. Lei nº 8.069, de 13 de julho de 1990. Dispõe sobre o Estatuto da Criança e do Adolescente e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 13 jul. 1990. Seção 1, p. 13563.

BRASIL. Lei nº 10.741, de 1º de outubro de 2003. Dispõe sobre o Estatuto do Idoso e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 01 out. 2003. Seção 1, p. 1.

BRASIL. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança** [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 4ªed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. 2015. **Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014**. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Incidencia-dengue-at-2014.pdf>>. Acessado em 07.04.2016.

BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v.46, n.3, 2015.

BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a Semana Epidemiológica 52. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v.47, n.3, 2016a.

BRASIL. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança** [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 5ªed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016b.

BRONZONI, R. V. M. 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, 2005.

BURKE, D.S.; MONATH, T.P. Flaviviruses. In: **Fields Virology**. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap.33, p.852 – 920.

BUTTHEP P. et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Pediatr Infect Dis J.**, v.31, n.12, p232–238, 2012.

CARDOSO, T.A.O.; NAVARRO, M.B.M.A. Emerging and Reemerging Diseases in Brazil: Data of a Recent History of Risks and Uncertainties. **Braz. j. infect. dis**, v.11, n.4, p.430-434, 2007.

CARDOSO, B.F et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.110, n.6, p.745-754, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2015. **International catalog of arboviruses including certain other viruses of vertebrates**. Disponível em: <<http://wwwn.cdc.gov/Arbocat/Default.aspx>>. Acesso em 12.12.2015.

CHÁVEZ, J.H. et al. Influence of the CCR-5/MIP-1 α Axis in the Pathogenesis of Rocio Virus Encephalitis in a Mouse Model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.89, n.5, p.1013–1018, 2013.

CHATURVEDI, U. C. Shift to Th2 cytokine response in dengue haemorrhagic fever. **Indian J. Med. Res.**, v.129, p.1-3, 2009

CHATURVEDI, U. C et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.28, p.183-188, 2000.

CLETON, N. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, v.55, p.191– 203, 2012.

DIAZ, L.A. et al. Exploring Genomic, Geographic and Virulence Interactions among Epidemic and Non-Epidemic St. Louis Encephalitis Virus (Flavivirus) Strains. **PLoS ONE**, v.10, n.8, 2015.

DICK, O.B. et al. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.87, n.4, p.584–593, 2012.

EIFAN, S. et al. Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions. **Viruses**, v.5, p.2447-2468, 2013.

ELLIOTT, R.M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.12, p.673-685, 2014.

FARES, R.C.G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Biomed Res Int**, 2015.

FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian viruses in the family Bunyaviridae. *Rev Medicina-Ribeirão Preto*, v.32, p.154-158, 1999.

FIGUEIREDO, L.T.M. Saint Louis encephalitis virus and other arboviruses in the differential diagnosis for dengue. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.47, n.5, p.541-542, 2014.

FIGUEIREDO, L.T.M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, n.48, v.3, p.233-234, 2015.

FULOP, L. et al. Rapid identification of flaviviruses based conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.

GREEN, S et al. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **J Med Virol**, v.59, n.3, p.329–334, 1999.

GUBLER, D.J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Ann N Y Acad Sci**. p.13-24, 2001.

GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v.385, p.453–65, 2015.

HABARAGAMUWA, BWP; DISSANAYAKA, P. N-ACETYLCYSTEIN in dengue associated severe hepatitis. **Indian J Crit Care Med**, v.18, n.3, p.181–182, 2014.

HALL, B.G. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. **Mol Biol Evol**, 2013.

HANG, J. et al. Genomic characterization of group C Orthobunyavirus reference strains and recent South American clinical isolates. **PLoS ONE**, v.9, n.3, 2014.

HEINEN, L.B.S. et al. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.57, n.3, p.215-220, 2015.

HEINRICH, P.C et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem. J.**, v.374, p.1–20, 2003.

HEINZ, F.X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v.30, p.4301– 4306, 2012.

HENRIQUES, D.F. **Infecção persistente pelos Flavivírus Ilhéus e Rocio em Hamsters dourados jovens (Mesocricetus auratus)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Núcleo de Medicina Tropical, Universidade do Pará, Pará, 2009.

HOBBER, D. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1L (IL-1 β) in dengue infected patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.48, p.324-331, 1993.

HOLLIDGE, B.S; GONZÁLEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S.S. Arboviral encephalites: transmission, emergence, and pathogenesis. **J Neuroimmune Pharmacol**, v.5, p.428–442, 2010.

HUANG, YNG-HUEY et al. Dengue virus infects human endothelial cells and induces il-6 and il-8 production. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.63, n.1-2, p. 71–75, 2000.

IANI, F. C. M. et al. Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 2016.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). 2014. **Virus Taxonomy: 2014 Release.** Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em 08.01.2016.

INYOO, S.; SUTTITHEPTUMRONG, A.; PATTANAKITSAKUL, S. Synergistic effect of TNF- α and dengue virus infection on adhesion molecule reorganization in human endothelial cells. **Jpn J Infect Dis**, 2016.

IVERSSON L.B. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na Região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975- 1978. **Ver. Saúde Pública**,14:9-35, 1980.

JOHNSON, B.W et al. Ilheus Virus isolate from a human, Ecuador. **Int J Infect Dis**, v.13, n.6, p. 956-958, 2007.

JUFFRIE, M. et al. Inflammatory Mediators in Dengue Virus Infection in Children: Interleukin-8 and Its Relationship to Neutrophil Degranulation. **Infect. Immun.**, p. 702–707, 2000.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates.** 3 ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine & Hygiene, 1985, 1147 p.

KUCZERA, D. et al. Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. **Virology**, 2016.

LAEMMERT, H.W.JR; HUGHES, T.P. The virus of Ilhéus encephalitis; isolation, serological specificity and transmission. **J Immunol**, v.55, n.1, p.61–67, 1947.

LAUR, F. et al. Plasma levels of tumour necrosis factor- α and transforming growth factor L-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.92, p.654-656, 1998.

LEE, ING-KIT et al. Increased production of interleukin-4, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by type 2 diabetes' mononuclear

cells infected with dengue virus, but not increased intracellular viral multiplication. **Biomed. Res. Int.**, 2013.

LEE, Y.R. et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. **J Gen Virol**, v.87, p.3623–3630, 2006.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. **Fields Virology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2007. cap.33, 1101-1152p.

LOPES, O. de S. et al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I – Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. **Amer. J. Epidem.**, v.107, p.444-449, 1978.

LUO, L. et al. Molecular characterization of the envelope gene of dengue virus type 3 newly isolated in Guangzhou, China, during 2009–2010. **Int. J. Infect. Dis**, v.17, p.498-504, 2013.

LUO, D.; VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. The flavivirus NS2B–NS3 protease–helicase as a target for antiviral drug development. **Antiviral Research**, v.118, p.148–158, 2015.

MAIA, F.G.M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **Int J Infect Dis**, v.26, p.96-97, 2014.

MALAVIGE, G.N. et al. Dengue viral infections. **Postgrad Med J.**, v.80, p.588-601, 2004.

MALAVIGE, G.N. et al. Serum IL-10 as a marker of severe dengue infection. **BMC Infect. Dis**, v.13, p.341, 2013.

MARÍN, J et al. Compromiso gastrointestinal agudo en pacientes con dengue por serotipo 4. Comunicación de un caso y revisión de la literatura. **Rev Chilena Infectol**, v.30, n.5, p.541-547, 2013.

MELTZER, E. Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers (VHF). **Infect Dis Clin N Am**, v.26, p.479–496, 2012.

MENDEZ, J.A. et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Viol. J.**, v.7, p.226, 2010.

MESSINA, J.P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*, v.22, n.3, 2014.

MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.13, n.1, p.176-178, 2007a.

MODINI, A et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, v.40, 2007b.

MULLER, D.A.; YOUNG, P.R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Res**, v.98, p.192–208, 2013.

NUNES, M.R. et al. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p.1610-1613, 2005.

NUNES, M.R.T. et al. Phylogeography of Dengue Virus Serotype 4, Brazil, 2010–2011. **CDC**, v.18, n.11, p.1858-1864, 2012.

OLIVEIRA, R. A. S et al. Primary dengue haemorrhagic fever in patients from northeast of Brazil is associated with high levels of interferon- β during acute phase. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.111, n.6, p.378-384, 2016.

OSANAI, C.H. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.25, n.1, p.53–54, 1983.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1947. I Direct Council of the Pan American Health Organization. Resolution CD1.R1. Continental *Aedes aegypti* eradication. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/1733>. Acessado em 29.08.2016.

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

PEREIRA, L.E. et al. Arbovírus Ilheus em aves silvestres (*Sporophila caerulescens* e *Molothrus bonariensis*). **Rev Saúde Pública**, v.35, n.2, p.119-123, 2001.

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

PÉREZ, A. B. et al. IL-10 Levels in Dengue Patients: Some Findings From the Exceptional Epidemiological Conditions in Cuba. **J. Med. Virol**, v.73, p.230–234, 2004.

PINHEIRO, F.P. et al. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Ver. Serv. Esp. Saúde Públ.**, v.12, p.15–23, 1962.

PINHEIRO, F.P. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.30, p.145–148, 1981.

PINHEIRO, F.P. et al. Oropouche virus. I - A review of clinical, epidemiological and ecological findings. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.149–60, 1981.

PINHEIRO, F.; NELSON, M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bull**, v. 21, p. 16–24, 1997.

PINHO, A.C.O et al. Asian genotypes of dengue virus 4 in Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v.143, p.3114–3117, 2015.

RACHMAN, A.; RINALDI, I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. **Acta Med Indones**, v. 38, p.105–108, 2006.

RAISEN, W.K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. **Adv Virus Res**, v.61, p.139–183, 2003.

ROCCO, I.M. et al. St. Louis Encephalitis Virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.47, n.5, p.281-285, 2005.

RODRIGUES, A.H. et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Virus Res.**, v.155, p.35–41, 2011.

ROMANOS, M.T.V. Febre Amarela e Dengue. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap 13, 399-409.

ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.11, 2013.

ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v.11, p.532-543, 2011.

SAEED, M.F. et al. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.743-748, 2000.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. 2001. **A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences**. Pan American Health Organization (PAHO), Division of Disease Prevention and Control. Disponível em: http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue_timeline.xls. Acessado em 24.03.2016.

SHOPE, R.E. Epidemiology of other arthropod-borne flaviviruses infecting humans. In: CHAMBERS, T.; MONATH, T. **The flaviviruses: detection, diagnosis and vaccination development**. v. 61. Amsterdam: Elsevier Academic, 2003. p.386–387.

SIERRA, B. et al. Variation in inflammatory / regulatory cytokines in secondary, tertiary, and quaternary challenges with dengue virus. **Am J Trop Med Hyg**, v.87, n.3, p.538-547, 2012.

SILVA, J.R. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.47, n.4, p.414-417, 2014.

STRAATMANN, A. et al. Evidências sorológicas da circulação do arbovírus Rocio (*Flaviviridae*) na Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.6, p.511-515, 1997.

TERZIAN, A.C.B. et al. Sporadic Oropouche Virus Infection, Acre, Brazil. **CDC**, v. 15, n.2, p.348-350, 2009.

TERZIAN, A.C.B. et al. Detection of Saint Louis Encephalitis Virus in Dengue-Suspected Cases During a Dengue 3 Outbreak. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.11, n.3, p.291-300, 2011.

TIRIBA, A. de C. et al. Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v.22, p.415, 1976.

TWIDDY, S.S et al. Phylogenetic Relationships and Differential Selection Pressures among Genotypes of Dengue-2 Virus. **Virology**, v.298, p63–72, 2002.

VASCONCELOS, P.F.C et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998, p.72-99.

VASCONCELOS, H.B. et al. Oropouche fever epidemic in northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **J. Clin. Virol.**, v.44, n.2, p.129–33, 2009.

VASCONCELOS, H.B. et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.17, p.800-806, 2011.

VENEGAS, E.A et al. Ilheus Virus infection in human, Bolivia. **Int J Infect Dis**, v.18, n.3, p.516-518, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Handbook for clinical management of dengue**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2012.

WU, D. et al. Policresulen, a novel NS2B/NS3 protease inhibitor, effectively inhibits the replication of DENV2 virus in BHK-21 cells. **Acta Pharm Sin**, v.36, p.1126–1136, 2015.

YOU, J. et al. A shift from a Th1 to a Th2 immune response in patients with dengue virus infection. **Abstracts**, 4th, DICID, 2010.

YOUNG, P.R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J.Clin.Microbiol**, v.38, p.1053–1057, 2000.

YU, I-Mei et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, v.319, p.1834, 2008.

APENSO

FICHA DE INVESTIGAÇÃO PARA ARBOVIROSES e/ou MENINGOENCEFALITES - nº Lapevi_____

DADOS PESSOAIS DO PACIENTE

NOME:_____REGISTRO_____ do
hospital:_____
DATA NASC:_____ SEXO:_____ OCUPAÇÃO:_____
END:_____
BAIRRO_____MUNICÍPIO:_____
TELEFONE:_____ () TIM; () OI; () CLARO; () VIVO

I. INDAGAÇÕES AO PACIENTE

- I.1. Data dos primeiros sintomas:_____
- I. 2. Doenças pré-existentes:
() hipertensão; () diabetes; () HIV+; () Doença de Chagas; () leishmaniose; ()
esquistossomose; () outras (especificar)_____
- I. 3. Viagem recente (no último mês)? Onde?_____
- I. 4. Vacinado para febre amarela?_____ano em que tomou a vacina_____
- I. 5. Há outras pessoas na residência apresentando os mesmos sintomas? () Sim() Não
- I. 6. Teve febre mais de uma vez neste ano? () Sim() Não
- I. 7. Você já teve dengue? () sim () não
- I.7.1 Quantas vezes?
() uma vez() três vezes
() duas vezes () mais de duas vezes
- I. 8. Há quanto tempo foi o seu último caso de dengue?
() neste ano() há 4 anos
() ano passado() há 5 anos
() há 2 anos() há mais de 5 anos
() há 3 anos
- I. 10. Antes de chegar aqui no hospital, você foi a quantas unidades de atendimento?_____
Quantas vezes em cada?_____Quais foram as unidades?_____
- I. 11. Local da habitação: () rural urbano ()
- I. 12. Há depósito de água na ou próximo a residência? () Sim() Não
- I. 13. O imóvel possui área externa? () Sim() Não
- I. 14. Na área externa possui:
() jardim () planta em vaso () piscina () reservatório com água
- I. 15. Perdeu dias de trabalho ou estudo por causa da doença? () sim () não. Quantos dias?_____

II. INDAGAÇÕES CLÍNICAS

- II. 1. Sinais e sintomas:
() cefaleia () febre () náuseas/vômitos () exantema
() artralgia () astenia () diarreia
() dor retro-orbitária () dor abdominal () mialgia

II. 1.1. sinais hemorrágicos: () sim () não

II. 1. 1. 1. Quais? () petéquias () hematótese () melena () epistaxe () gengivorragia () equimoses

II. 2. Alterações neurológicas:

() convulsão

() rigidez de nuca

() desorientação

() kerning/brudzinski

() abaulamento de fontanela

() agitação

() coma

() alteração do nível de consciência () letargia

Punção lombar para exame de líquido? () sim () não

observações: _____

II. 3. Exames complementares

(anotar os resultados dos exames complementares, como hemograma, enzimas hepáticas, etc.)

Tipo de exame	Resultado	Data