

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

O USO DE ANÁLISE FILOGENÉTICA PARA AVALIAR UMA EPIDEMIA DE LARGA
ESCALA CAUSADA PELO SOROTIPO 1 DO DENV.

Marília Mazzi Moraes

Araraquara

2016

Marília Mazzi Moraes

O USO DE ANÁLISE FILOGENÉTICA PARA AVALIAR UMA EPIDEMIA DE LARGA
ESCALA CAUSADA PELO SOROTIPO 1 DO DENV.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista
para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mondini

Araraquara

2016

Sumário

1. Introdução.....	08
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Sequências de DENV-1 de Araraquara	15
3.1.1 Extração	15
3.1.2 Multiplex-Nested-RT-PCR	16
3.1.3 Eletroforese	17
3.1.4. Purificação dos produtos de PCR.....	17
3.1.5. Quantificação e BigDye	17
3.2. Sequências de DENV-1 do GenBank	18
3.3. Sequenciamento	18
3.4. Edição e Alinhamento	18
3.5. Análise Filogenética	18
3.6. Recombinação	19
4. Resultados e Discussão	20
5. Conclusão	31
6. Referências Bibliográficas	32

Resumo

A infecção pelo vírus do Dengue (DENV) pode causar uma doença febril e evoluir para quadros mais graves, ou até mesmo ser assintomática. Os sintomas mais comuns da doença são febre alta, eritemas cutâneos, dor no corpo, mialgia, artralgia, dor de cabeça, náuseas e vômito, podendo evoluir para um quadro de extravasamento plasmático. Os vetores do vírus são os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo o primeiro encontrado predominantemente nas Américas e o segundo, na Ásia. O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e, assim como outros arbovírus, seu genoma codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. Atualmente, 390 milhões de pessoas adquirem dengue ao ano e, apenas 96 milhões dos casos da doença são considerados sintomáticos. Na epidemia de 2015 do Brasil, causada majoritariamente por DENV-1, foi possível observar um número elevado de casos pronunciados da doença e também um maior número de óbitos. Com o objetivo de entender o comportamento dos vírus circulantes em Araraquara – SP e poder associá-lo à grave epidemia de 2015, duas amostras de DENV-1 foram sequenciadas e, posteriormente foram feitas suas análises filogenéticas. Ambas as sequências mostraram pertencer ao genótipo V do sorotipo 1 do DENV. Houve também evidências de recombinação relacionadas à amostra de DENV-1 colhida em 2015. A circulação de cepas de DENV de múltiplas origens aumenta a ocorrência de eventos de recombinação, os quais podem ter implicações diretas na patogenicidade viral. É importante que haja uma vigilância quanto ao genótipo V no Brasil, já que o mesmo é o genótipo que mais circula no país.

Palavras-chave: dengue, análise filogenética, recombinação.

Lista de Figuras

Figura 1. Análise Filogenética feita pelo método de Máxima Verossimilhança.....	21
Figura 2. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método RDP.....	27
Figura 3. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método GENECONV.....	27
Figura 4. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método MaxChi.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação segundo genótipo após análise filogenética das 102 sequências de DENV-1. Local, ano e código de acesso de cada sequência são informados.....	23
Tabela 2. Métodos que detectaram recombinação que gerou Araraquara/2015, através do programa Recombination Detection. São mostrados os respectivos valores de p médios encontrados por cada método.....	28

Lista de Abreviaturas e Siglas

CHIKV	Vírus do Chikungunya
DENV	Vírus do Dengue
DENV-1	Sorotipo 1 do Dengue
DENV-2	Sorotipo 2 do Dengue
DENV-3	Sorotipo 3 do Dengue
DENV-4	Sorotipo 4 do Dengue
ORF	Do inglês, Open Reading Frame ou Fase de leitura aberta, em português
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus do Zika

1. Introdução

A infecção causada pelo Vírus do Dengue (DENV) acomete recém nascidos, crianças, jovens e adultos. A dengue é uma doença de caráter sistêmico e de amplo espectro clínico, podendo levar a manifestações de alta ou de baixa gravidade. Seu início é abrupto, o qual ocorre após o período de incubação viral, e é seguido de três fases: febril, crítica e de recuperação (WHO, 2009; WHO, 2016).

Os sintomas da fase febril têm duração de dois a sete dias. Os mais comuns são febre alta, eritemas cutâneos, dor no corpo, mialgia, artralgia, dor de cabeça, náuseas e vômito. A fase crítica é caracterizada pelo extravasamento plasmático decorrente do aumento da permeabilidade capilar, que ocorre com a queda da temperatura corporal. Leucopenia e plaquetopenia são parâmetros que antecedem o extravasamento plasmático, podendo funcionar como alertas para tal. Se, após 24-48 horas do estabelecimento da fase crítica, a permeabilidade capilar continuar aumentada, pode ocorrer choque por redução de volume plasmático. Quando há gradativa reabsorção de fluidos extra vasculares, num intervalo de 48-72 horas do início da fase crítica, a fase de recuperação da doença é definida, culminando na retomada dos níveis do hematócrito, de glóbulos vermelhos e de plaquetas (WHO, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificada a dengue em dengue com sinais de alarme e dengue sem sinais de alarme, podendo ambas evoluírem para um quadro de dengue grave. Um estudo feito pela própria OMS concluiu que, através de certos parâmetros clínicos e laboratoriais definidos, é possível distinguir aqueles pacientes com dengue grave daqueles com dengue sem gravidade, entretanto, os segundos devem ser divididos entre aqueles com sinais de alarme e sem sinais de alarme. Os sintomas comuns de uma infecção sem sinais de alarme são dores no

corpo e na cabeça, erupções cutâneas, náuseas e vômito. São considerados sinais de alarme: dor abdominal, vômito persistente, acumulação de fluidos, sangramento de mucosas e letargia. A dengue grave é caracterizada por extravasamento plasmático, hemorragia e comprometimento de órgãos, como o fígado (WHO, 2009).

A principal medida de prevenção contra a infecção causada pelo DENV envolve o controle de seus vetores transmissores, já que os mecanismos de proteção associados às vacinas ainda não foram bem compreendidos e não há tratamento farmacológico para a enfermidade, apenas para seus sintomas (MURRELL et al, 2011).

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes. Assim como o vírus da Febre Amarela (YFV), da Febre do Nilo Ocidental (WNV), da Febre do Zika (ZIKV), da Febre do Chikungunya (CHIKV), o Vírus do Dengue (DENV) é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. A infecção dos vertebrados ocorre com a utilização de sangue pelas fêmeas do mosquito para maturação de seus ovos (FIGUEIREDO L.T.M., 2000).

O *Aedes aegypti* atua como principal vetor da dengue nas Américas; originário das selvas africanas, o mosquito foi trazido para o continente nos anos 1600 em navios negreiros. O *Aedes albopictus* é tido como vetor secundário da doença na Ásia, tendo se propagado para a América do Norte e Europa com o comércio de pneus; apesar de ser considerado o único vetor da doença em certas epidemias (GRATZ N.G., 2004; MURRELL et al, 2011; RODHAIN F.; ROMI R., 1995; ROSEN L., 1997; WHO, 2012).

A fêmea de *Aedes* torna-se infectada quando se alimenta de sangue de um indivíduo infectado pelo DENV, que esteja na fase febril e virêmica da doença. Durante o período extrínseco de incubação, o vírus primeiro infecta as células do intestino

médio e depois se distribui para o restante dos tecidos, chegando cerca de 8-10 dias depois, às glândulas salivares. A chegada até as mesmas é influenciada por fatores como ambiente, temperatura, linhagem viral e competência vetorial. Uma vez nas glândulas salivares, o mosquito pode ser capaz de transmitir o vírus durante o repasto sanguíneo (GUBLER et al, 2014; SILER et al, 1926).

O vírus do dengue (DENV) é membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Os *Flavivirus* têm o genoma composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, de aproximadamente 11 kb. A fase de leitura aberta do genoma (ORF) codifica três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (membrana) e E (envelope), e sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (LINDENBACH et al, 2007; MARKOFF L., 2003).

O DENV apresenta-se sob a forma quatro sorotipos, de acordo com diferenças genéticas na poliproteína viral: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. DENV-1 e DENV-3 são aqueles que mais se assemelham geneticamente, seguidos por DENV-2 e DENV-4, respectivamente (LEWIS et al, 1993; RICO-HESSE, R., 2003; TWIDDY et al, 2003; ZANOTTO et al, 1996).

Diferenças genéticas mais sutis nas regiões do envelope acabam por subdividir os sorotipos de DENV em genótipos. Com base nas sequências completas do gene E, o DENV-1 é agrupado em cinco genótipos distintos, já havendo evidências de um sexto: I (Sudeste Asiático, China e Leste Africano), II (Tailândia), III (Malásia), IV (Sul do Pacífico) e V (Américas/África) (KUKRETI et al., 2009; MYAT THU et al, 2005; PYKE et al, 2016).

Estimativas atuais apontam 390 milhões de infecções causadas por DENV ao ano. Destas, apenas 96 milhões são sintomáticas, o que acaba diminuindo o número real de casos notificados da doença, já que 75% dos infectados não apresentariam

sintomas. A Ásia é a região com as maiores incidências de dengue, seguida da África, das Américas e da Oceania. As áreas com maior probabilidade de ocorrência de doença estão entre os trópicos (BHATT et al, 2013).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), no ano de 2014 foram confirmados 339.295 casos de dengue nas cinco sub-regiões das Américas: Américas do Norte, Central e México; Andes; Cone Sul; Caribe Hispânico e Caribe Europeu. Destes, 16.238 foram considerados casos graves da doença e ocorreram 798 mortes. No ano de 2015, os números de casos confirmados de dengue e de mortes subiram aproximadamente 53% (643.555 casos) e 58,5% (1.368 casos), respectivamente. Até agosto de 2016, foram confirmados 406.014 casos de dengue, sendo 3.434 deles graves, e 830 mortes (PAHO, 2015; PAHO, 2016).

Conforme último Boletim Epidemiológico de 2015, divulgado pelo Ministério da Saúde, foram notificados 1.649.008 casos prováveis de dengue no Brasil, até a semana epidemiológica (SE) 52 (04/01/2015 a 02/01/2016). Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em comparação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%). Dos casos confirmados, 1.569 foram de dengue grave e 20.329 foram de dengue com sinais de alarme (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2016).

No mesmo período de 2014, foram confirmados 764 casos de dengue grave e 8.436 casos de dengue com sinais de alarme. A região com maior número de registros de casos de dengue grave e dengue com sinais de alarme foi a região Sudeste (863 graves; 15.000 com sinais de alarme). O total de óbitos confirmados pela doença foi de 863, o que representa um aumento no país de 82,5% em comparação com o

mesmo período de 2014, quando foram confirmados 473 óbitos. Das 23.196 amostras que foram enviadas para isolamento viral até a SE 52 do ano de 2015, 8.859 foram positivas para dengue (38,2%). Os sorotipos identificados foram DENV-1 (93,8%), DENV-2 (0,7%), DENV-3 (0,4%) e DENV-4 (5,1%) (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2016).

Em 2016, até a semana epidemiológica (SE) 32 (3/1/2016 a 13/08/2016) foram confirmados 728 casos de dengue grave e 7.105 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2015, foram confirmados 1.481 casos de dengue grave e 19.449 casos de dengue com sinais de alarme. A região com maior número de casos graves e com sinais de alarme da doença ainda é a região Sudeste, com 388 e 3.419 casos, respectivamente. Foram confirmados 509 óbitos por dengue, o que representa uma redução no país de 37% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 814 óbitos (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2016).

De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, da Semana Epidemiológica (SE) 01 até a 52 de 2015, foram notificados 1.789 casos de dengue no município de Araraquara. Até julho de 2016, foram confirmados 1.871 casos da doença na cidade (CVE, 2015; CVE, 2016). Localizada na região central do Estado de São Paulo, Araraquara fica cerca de 270 km da capital e conta com uma população de 224.304 habitantes, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Prefeitura Municipal de Araraquara, 2016). Em função de sua localização estratégica, o município possui uma elevada de circulação de pessoas, o que contribui para dispersão viral.

A análise filogenética é uma ferramenta utilizada para estudar a evolução molecular do DENV. Através de análises comparativas de sequências de genomas do

vírus, é possível compreender a dinâmica da doença e a distribuição do DENV em um determinado local e período (COSTA et al, 2012; SABCHAREON et al, 2012; VILLABONA-ARENAS C.J., ZANOTTO P.M.D.A., 2011).

Dado que a epidemia de dengue ocorrida em 2015 no Brasil foi causada predominantemente por DENV-1 e, que manifestações clínicas graves foram observadas em um número significativo de infectados quando comparado ao ano de 2014, o estudo dos diferentes genótipos virais circulantes, através de análises filogenéticas, é de extrema relevância. A descrição de genótipos circulantes no país, feita a partir de comparações com outros genótipos distribuídos por todo o mundo, possibilita a compreensão das razões que levaram ao aumento das taxas de morbidade e de mortalidade, e ao agravamento da sintomatologia da doença, além de dar subsídios sobre a possível origem dos vírus que estão dispersos em uma determinada localidade.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Realizar análise filogenética de sequências de DENV-1 encontradas em amostras de sangue de moradores do município de Araraquara.

2.2. Específicos

- Sequenciar amostras oriundas de pacientes que procuraram os serviços de Saúde de Araraquara;
- Avaliar qual o genótipo de DENV-1 que circula em Araraquara;
- Avaliar evidências de recombinação no município de Araraquara.

3. Materiais e Métodos

3.1 Sequências de DENV-1 de Araraquara

Foi estabelecido um convênio entre a Prefeitura Municipal de Araraquara e o Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para um projeto de vigilância de arbovírus. Para a realização da análise filogenética do presente trabalho, foram selecionadas duas amostras de soro de pacientes que procuraram o serviço público de saúde de Araraquara com sintomas de dengue.

3.1.1. Extração

A extração do RNA viral foi realizada com QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) segundo as orientações do fabricante. Brevemente, 140 μ L do soro foram adicionados a 560 μ L de tampão AVL contendo RNA *carrier*. A solução foi agitada por 15 segundos (Scientifica Advanced IR Vortex Mixer - ZX4) e depois incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 560 μ L de etanol 100% (Emsure, Merck-Millipore/EUA), agitando a solução por 15 segundos para centrifugá-la (Eppendorf 5418R) a 14,000 rpm. Eluiu-se 630 μ L da solução na coluna fornecida a 8.000 rpm por um minuto. O passo anterior foi repetido e o eluato foi descartado. Foram adicionados 500 μ L do tampão AW1 à coluna para nova centrifugação a 8.000 rpm. Após descarte do eluato, foram adicionados 500 μ L de tampão AW2 e novamente centrifugado a 8.000 rpm. Após descarte do eluato, a coluna foi colocada em um tubo com a identificação final e adicionou-se 60 μ L de tampão AVE à coluna, mantendo-a em temperatura ambiente por um minuto. A coluna foi centrifugada a 8.000 rpm por um minuto e depois descartada. O eluato, contendo o RNA viral, foi utilizado para a reação de transcrição reversa e depois mantido a -80 °C.

3.1.2. Multiplex-Nested-RT-PCR

A detecção viral por PCR foi realizada conforme BRONZONI e colaboradores (2005).

Primeiro foi feita a reação de transcrição reversa (RT), na adiciona-se 8,0 µL do produto de extração, 4,0 µL de tampão 5X concentrado (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1,4 µL de DTT (Ditiotreitol) (0,1M), 1,6 µL de dNTP (Desoxirribonucleotídeos) (25mM), 1 µL de primer FG2 (15pmol), 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (RNaseOUT - Invitrogen, USA), 1,0 µL de enzima transcriptase reversa (Superscript II Reverse Transcriptase - Invitrogen, USA) e água para completar 20 µL. A solução foi incubada a 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos em termociclador T100 (Bio-Rad, EUA).

Foram utilizados 8 µL do produto da RT para realização de Multiplex-PCR, utilizando primer gênero-específico para *Flavivirus*. O produto da RT, juntamente com 5 µL de tampão 10X concentrado (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500mM KCl), 2 µL de MgCl₂ (50mM), 4 µL de dNTP (25mM), 1 µL de primer FG1 (15pmol), 0,2 µL de Taq polimerase (Taq DNA Polymerase Recombinant - Invitrogen, USA) e água para completar 50 µL foram incubados a 90° por um minuto e depois, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 30 ciclos e, 72°C por 5 minutos.

Na reação de Nested-PCR, utilizou-se 3 uL do produto da PCR, 5 µL de tampão 10X concentrado, 2 µL de MgCl₂ (50mM), 4 uL de dNTP (25mM), 1 uL de primer FG1 (15pmol), 1 uL de primer específico para DENV-1, 1 uL de primer específico para DENV-2, 1 uL de primer específico para DENV-3, 1 uL de primer específico para DENV-4, 0,2 µL de Taq polimerase e água para completar 50 µL. A solução foi incubada em termociclador a 94°C por 1 minuto e logo após, a 94° por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por dois minutos durante 25 ciclos e, 72°C por 5 minutos.

3.1.3. Eletroforese

O resultado do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Para preparo do gel, foram diluídos 2g de agarose em tampão TBE 1X, até atingir o volume de 200 mL. Utilizou-se 2 μ L de GelRed (Biotium) como corante intercalante de DNA, juntamente 8 μ L do produto do Multiplex-Nested-RT-PCR, 2 μ L de BlueJuice (Thermo Fisher Scientific) e 4 μ L do marcador (DNA Ladder) de 100 pares de bases. A eletroforese ocorreu a 100 V, por cerca de 40 minutos e posteriormente visualizado em transiluminador com luz ultra-violeta.

3.1.4. Purificação dos produtos de PCR

A preparação das amostras foi feita adicionando-se 50 μ L de acetato de sódio 3M e 100 μ L de etanol 100% ao produto de PCR; após homogeneização, o volume total de cada amostra foi transferido para tubo de 1,5mL e estes foram incubados por uma hora a uma temperatura de - 80°C; em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de etanol 70% gelado; novamente os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C e colocados à temperatura ambiente para secar; o último passo foi ressuspender os precipitados em 20 μ L de água ultrapura.

3.1.5. Quantificação e BigDye

A concentração de ácidos nucleicos nas amostras de DENV-1 foi mensurada (NanoDrop Thermo Scientific 2000c) para otimização da reação de Big Dye, que foi realizada de acordo com as orientações do fabricante. A reação consistiu em adicionar 1 μ L de BigDye Mix, 3,5 μ L de tampão de sequenciamento 5X, 2 μ L de primer espécie-específico para DENV-1 (região da NS5) (3,2 μ M), 2 μ L de amostra purificada e 11,5 μ L de água Milli Q autoclavada. Depois de pronta, a mistura foi incubada em termociclador Bio-Rad T100 Thermal Cycler a 96°C por um minuto (1 ciclo); a 96°C

por 10 segundos, 50°C por cinco segundos, 60°C por quatro minutos (25 ciclos); a 60°C por cinco minutos (1 ciclo) e a 4°C. A última etapa consistiu em fazer a reação de BigDye X Terminator. De acordo com o fabricante, a cada tubo de amostra foram adicionados 45 µL de tampão SAM e 10 µL de BigDye X Terminator; em seguida, os tubos foram deixados sob agitação em agitador (Kasvi K40-10208) por 30 minutos a 13.000 rpm e, por fim, foram centrifugados a 945 rpm por dois minutos.

3.2 Sequências de DENV-1 do GenBank

Foram incluídos 100 genomas completos de DENV-1, depositados no GenBank na análise filogenética, que são representativos de diversas regiões do mundo e que contemplam todos os genótipos descritos de DENV-1.

3.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado com ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). A ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada na confirmação dos resultados obtidos por Multiplex-Nested-RT-PCR.

3.4 Edição e Alinhamento

A edição e o alinhamento das duas sequências de DENV-1 de Araraquara e das 101 sequências de DENV-1 selecionadas do GenBank foram realizados no programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A região alinhada ficou entre o 8.151 nucleotídeo e o 8.594, que compreende parte da NS5.

3.5 Análise Filogenética

A construção da árvore filogenética foi realizada no programa MEGA7, utilizando-se o método Maximum Likelihood, baseado no modelo General Time Reversible. Para melhor visualização, depois de pronta, a árvore filogenética foi editada no programa FigTree.

3.6 Recombinação

Evidências de recombinação foram detectadas através de métodos presentes no Recombination Detection Program v.4.56.

4. Resultados e Discussão

A utilização de pequenas regiões do genoma de dengue pode fornecer informações importantes com relação à presença de diferentes linhagens circulando em um ambiente urbano. No presente trabalho, utilizou-se uma pequena região da proteína NS5 para avaliar a qual genótipo o DENV-1 que circula em Araraquara pertence. Um estudo mostrou, ao menos, três linhagens de DENV-3 (MONDINI et al, 2009) no município de São José do Rio Preto utilizou-se da mesma região para análise filogenética. Estudo posterior (VILLABONA-ARENAS et al, 2013), utilizando-se de genomas completos corroborou o encontrado anteriormente.

As sequências foram selecionadas de modo que houvesse uma amostragem adequada dos seis genótipos de DENV-1, com o propósito de se analisar em quais genótipos estariam classificadas as amostras de Araraquara. Uma sequência do Vírus da Febre Amarela foi utilizada como grupo externo (Figura 1).

Com base na análise filogenética de parte da região NS5, foi possível alocar as 102 sequências de DENV-1 em seis genótipos distintos: 37 sequências no genótipo I, duas sequências no genótipo II, uma sequências no genótipo III, 12 sequências no genótipo IV, 49 sequências no genótipo V e uma sequência no genótipo VI (Tabela 1).

No Brasil, DENV-1 foi detectado pela primeira vez na região Norte do país, na década de 80; pouco tempo depois o sorotipo distribuiu-se e alcançou a região Sudeste (DRUMOND et al, 2012; FIGUEIREDO L.T.M., 2000; OSANAI et al, 1983). Análises filogenéticas de isolados de DENV-1 no Brasil e no restante das Américas revelaram que os mesmos pertenciam ao genótipo V (MENDEZ et al, 2010; DRUMOND et al, 2012). Como esperado, as duas amostras de DENV-1 de Araraquara pertencem ao genótipo V e fazem parte de uma das várias linhagens já descritas anteriormente (DRUMOND et al, 2012).

Figura 1. *Análise Filogenética feita pelo método de Máxima Verossimilhança. A história evolutiva foi inferida utilizando-se o Método de Verossimilhança, baseado no modelo General Time Reversible. A árvore com maior log de verossimilhança é mostrada (-3880.8382). Uma discreta distribuição Gamma foi utilizada para determinar diferenças de taxas evolutivas entre os sítios (6 categorias (+G, parâmetro = 0.4821)). A árvore foi feita em escala, com comprimentos dos ramos medidos no número de substituições por sítio. A análise envolveu 103 sequências com 443 nucleotídeos cada. A análise evolutiva foi conduzida no Programa MEGA7. Para melhor visualização, a árvore foi editada no Programa FigTree.*

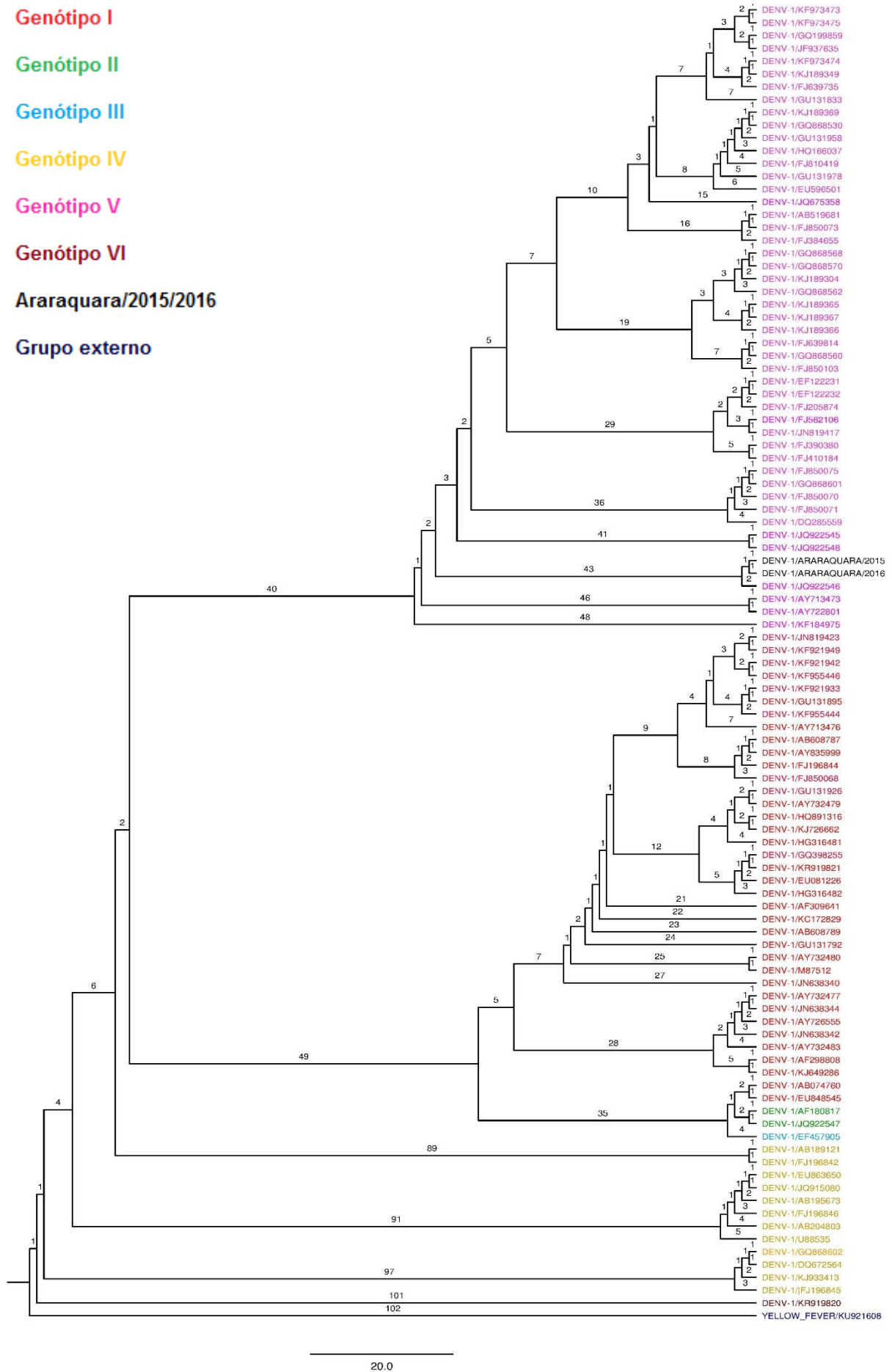


Tabela 1. Classificação segundo genótipo após análise filogenética das 102 sequências de DENV-1.

Local, ano e código de acesso de cada sequência são informados.

Sorotipo	Genótipo	Local	Ano	Código de Acesso
DENV-1	I	Japão	1943	AB074760
DENV-1	I	EUA/Havaí	1944	EU848545
DENV-1	I	Tailândia	1981	AY732483
DENV-1	I	Tailândia	1990	JN638342
DENV-1	I	Tailândia	1991	AY732477
DENV-1	I	Tailândia	1994	AY732480
DENV-1	I	Tailândia	1995	JN638344
DENV-1	I	Tailândia	1997	JN638340
DENV-1	I	Tailândia	2001	AY732479
DENV-1	I	Tailândia	2010	HG316482
DENV-1	I	Tailândia	2010	HG316481
DENV-1	I	Singapura	1990	M87512
DENV-1	I	Singapura	2005	EU081226
DENV-1	I	China/Taiwan	1994	AB608789
DENV-1	I	China	2004	AY835999
DENV-1	I	China	2006	FJ196844
DENV-1	I	China/Taiwan	2008	AB608787
DENV-1	I	Camboja	1998	AF309641
DENV-1	I	Camboja/Laos	2008	KC172829
DENV-1	I	Camboja	2009	GU131895
DENV-1	I	Djibouti	1998	AF298808
DENV-1	I	Myanmar	1998	AY726555
DENV-1	I	Myanmar	2001	AY713476
DENV-1	I	Sri Lanka	2009	HQ891316
DENV-1	I	Sri Lanka	2012	KJ726662
DENV-1	I	Arábia Saudita	2011	KJ649286
DENV-1	I	Austrália	2008	KR919821
DENV-1	I	Vietnã/Sul	2008	GU131792
DENV-1	I	Camboja	2006	GU131926
DENV-1	I	Camboja	2001	JN819423
DENV-1	I	Camboja	2007	KF955444
DENV-1	I	Camboja	2007	KF921933
DENV-1	I	Singapura	2008	GQ398255
DENV-1	I	Vietnã	2008	KF921949
DENV-1	I	Vietnã	2008	KF955446
DENV-1	I	Vietnã	2008	KF921942
DENV-1	I	Tailândia	2001	FJ850068
DENV-1	II	Tailândia	1960	JQ922547
DENV-1	II	Tailândia	1964	AF180817
DENV-1	III	Malásia	1972	EF457905
DENV-1	IV	Nauru	1974	U88535
DENV-1	IV	China	1991	FJ196845
DENV-1	IV	China	1995	FJ196846

DENV-1	IV	China	2003	FJ196842
DENV-1	IV	China	2012	KJ933413
DENV-1	IV	Indonésia	1998	AB189121
DENV-1	IV	Havaí	2001	DQ672564
DENV-1	IV	Chile/Ilha de Páscoa	2002	EU863650
DENV-1	IV	Secheles	2003	AB195673
DENV-1	IV	Micronésia/Yap	2004	AB204803
DENV-1	IV	Nova Caledônia	2010	JQ915080
DENV-1	IV	Filipinas	2004	GQ868602
DENV-1	V	Angola	2013	KF184975
DENV-1	V	Brasil/Nordeste	2000	FJ850070
DENV-1	V	Brasil/Nordeste	2001	FJ850073
DENV-1	V	Brasil/Nordeste	2002	FJ850075
DENV-1	V	Brasil/Norte	2000	FJ850071
DENV-1	V	Brasil/Brasília	2001	FJ384655
DENV-1	V	Brasil/Brasília	2001	AB519681
DENV-1	V	Colômbia/Santander	2007	GQ868568
DENV-1	V	Colômbia/Santander	1998	GQ868560
DENV-1	V	Colômbia/Santander	2005	GQ868562
DENV-1	V	Colômbia/Santander	2008	GQ868570
DENV-1	V	Venezuela/Aragua	1997	FJ639735
DENV-1	V	Venezuela/Aragua	2000	GU131833
DENV-1	V	Venezuela/Aragua	2008	FJ850103
DENV-1	V	Venezuela/Aragua	2005	FJ639814
DENV-1	V	Nicarágua/Managua	2004	EU596501
DENV-1	V	Nicarágua/Carazo	2006	FJ810419
DENV-1	V	Nicarágua/Managua	2009	JF937635
DENV-1	V	Nicarágua/Managua	2008	GQ199859
DENV-1	V	México/Yucatan	2006	GU131958
DENV-1	V	México/ Yucatan	2007	GU131978
DENV-1	V	México/Yucatan	2008	HQ166037
DENV-1	V	México/Yucatan	2008	GQ868530
DENV-1	V	EUA/Porto Rico	1993	FJ410184
DENV-1	V	EUA/Porto Rico	1998	FJ390380
DENV-1	V	EUA/Porto Rico	1995	FJ205874

DENV-1	V	Ilhas Virgens/Tortola	1985	GQ868601
DENV-1	V	Guiana Francesa	-	EF122231
DENV-1	V	Guiana Francesa	-	EF122232
DENV-1	V	Ilha Reunião	2004	DQ285559
DENV-1	V	Myanmar	1976	AY722801
DENV-1	V	Myanmar	1971	AY713473
DENV-1	V	EUA/Florida/Key West	2010	JQ675358
DENV-1	V	Nicarágua	2012	KF973475
DENV-1	V	Nicarágua	2012	KF973473
DENV-1	V	Nicarágua	2012	KF973474
DENV-1	V	México	2011	KJ189369
DENV-1	V	México	2011	KJ189349
DENV-1	V	Porto Rico	2010	KJ189367
DENV-1	V	Porto Rico	2010	KJ189365
DENV-1	V	Porto Rico	2010	KJ189366
DENV-1	V	Colômbia	2005	KJ189304
DENV-1	V	El Salvador	1993	JN819417
DENV-1	V	EUA	1986	FJ562106
DENV-1	V	Índia	1971	JQ922546
DENV-1	V	Índia	1982	JQ922545
DENV-1	V	Índia	2005	JQ922548
DENV-1	V	Brasil/Araraquara	2015	-
DENV-1	V	Brasil/Araraquara	2016	-
DENV-1	VI	Brunei	2014	KR919820
YELLOW FEVER	-	China	2016	KU921608

Três sequências de DENV-1 de origem indiana, com os respectivos códigos de acesso, JQ922546, JQ922545, JQ922548, foram alocadas dentro do clado do genótipo V. AFREEN e colaboradores (2013) mostraram que todas as amostras positivas para DENV-1 de seu estudo pertenciam ao genótipo V (Américas/África) em Nova Delhi – Índia. A amostra JQ922546 agrupou-se no mesmo clado que as duas amostras de Araraquara, evidenciando um parentesco.

Na epidemia causada pelo DENV no ano de 2013 em Myanmar, foram notificados 20.255 casos da doença e, 84% dos infectados foram a óbito. Das 39 sequências do vírus que foram isoladas no estudo de NGWE TUN e colaboradores (2016) no mesmo ano, 58.9% foram de DENV-1. Na análise feita no trabalho, as amostras de sangue positivas para o sorotipo foram agrupadas dentro dos genótipos I e V. Na Figura 1, as sequências que tiveram origem em Myanmar, AY722801 e AY713473, agruparam-se ao genótipo V, ficando próximas às sequências de Araraquara.

Apesar de ter os EUA como local de origem, o genoma de DENV-1 EU848545 foi incluído no genótipo I, onde normalmente estão inclusas sequências do Sudeste Asiático, China e Leste Africano. Tal classificação ocorreu por causa da infecção por DENV de norte-americanos nos países asiáticos durante a Segunda Guerra Mundial (GIBBONS et al, 2012; HOTTA S., 1952).

Como previsto, duas das sequências que tiveram sua origem na Tailândia pertenciam ao genótipo II; a originária da Malásia pertencia ao genótipo III. Todas as 12 sequências alocadas no genótipo IV foram originárias de países do Pacífico Sul, incluindo a China (PYKE et al, 2016).

Corroborando o estudo feito por PYKE e colaboradores (2016), a sequência KR919820 mostrou-se diferente dos demais genótipos, à medida que ficou em um clado separado, configurando o sexto genótipo de DENV-1. Era esperado que a sequência KF184975, de origem Africana pertencesse ao genótipo I, porém, a mesma se mostrou dentro do clado do genótipo V (PYKE et al, 2016). É importante ressaltar que este resultado pode ter sido consequência da utilização de apenas parte do genoma viral, e não de seu genoma completo na análise filogenética do trabalho.

A circulação concomitante de diferentes populações de DENV, incluindo diferentes genótipos, é um fator que aumenta as chances de ocorrência de infecções mistas, tanto no vetor quanto no hospedeiro humano do vírus (AASKOV et al, 2007; A-NUEGOONPIPAT et al, 2004). Esta situação pode favorecer a ocorrência de recombinação, como ocorrido com as sequência Araraquara/2015 (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 2. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método RDP.

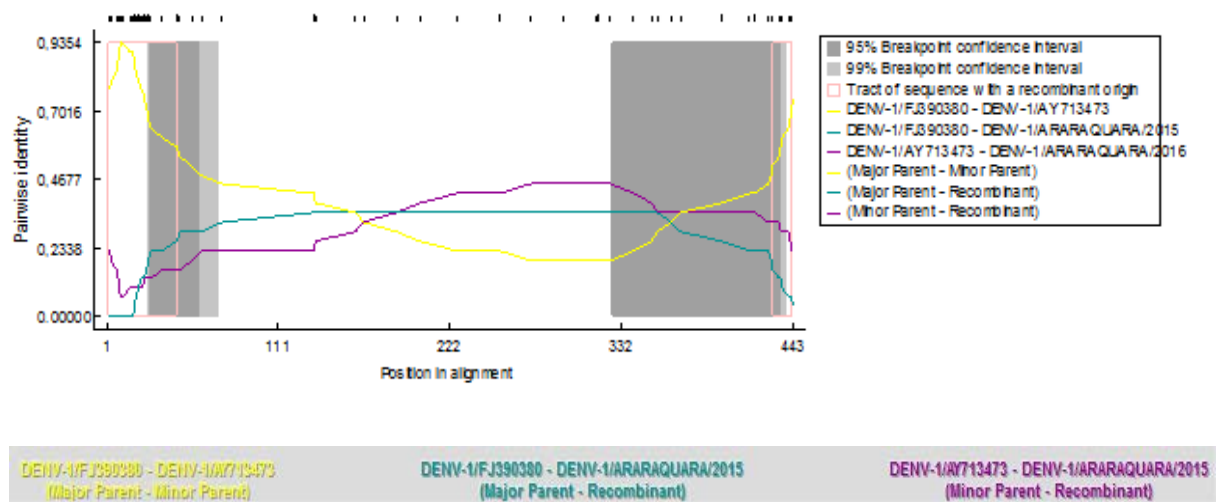


Figura 3. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método GENECONV.

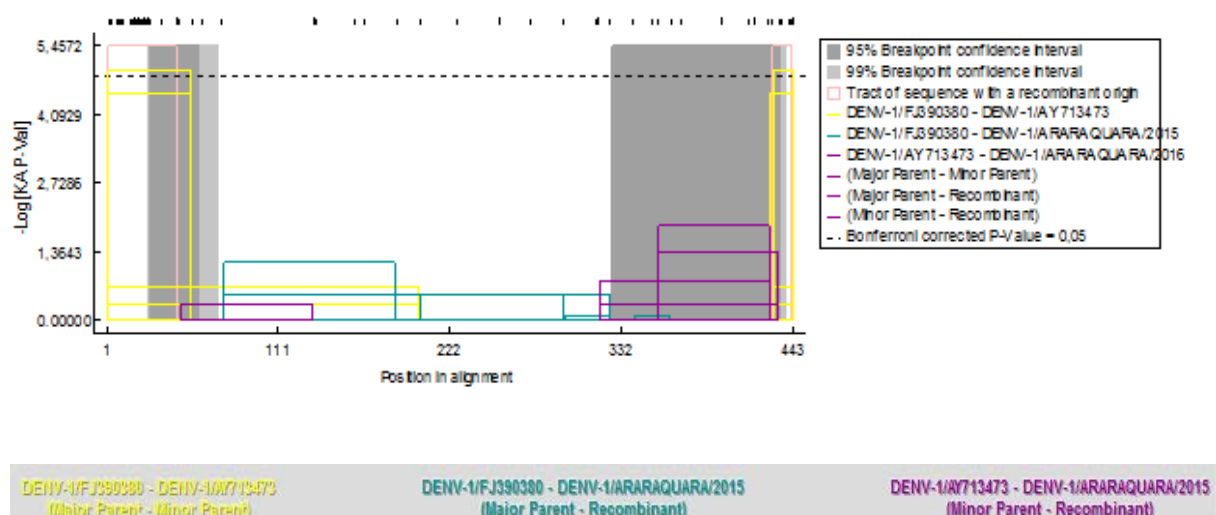
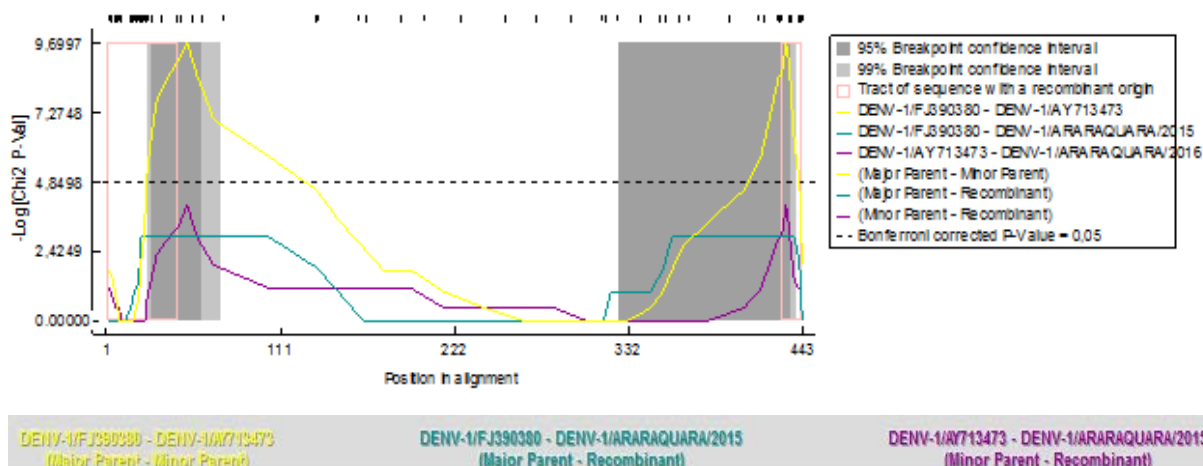


Figura 4. Representação gráfica de recombinação detectada pelo Recombination Detection Program v.4.56. através do método MaxChi.



O Programa de Detecção de Recombinação é capaz de detectar sinais de recombinação por meio de diversos métodos. A recombinação que gerou a sequência Araraquara/2015 foi detectada por três métodos: RDP, GENECONV e MaxChi. Cada método confirma uma recombinação através do cálculo do valor de p (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos que detectaram recombinação que gerou Araraquara/2015, através do programa Recombination Detection. São mostrados os respectivos valores de p médios encontrados por cada método.

Tabela de Confirmação		
Métodos	# de sequências detectadas	Valor de p Médio
RDP	1	$2,171 \times 10^{-03}$
GENECONV	1	$4,025 \times 10^{-02}$
BootScan	--	--
MaxChi	1	$4,668 \times 10^{-07}$
Chimaera	--	--
SiScan	--	--
PhylPro	--	--
LARD	--	--
3Seq	--	--

O método RDP separa as sequências já alinhadas em tripletos. Em qualquer triplete particular, haverá duas sequências, A e B, mais estreitamente relacionados

entre si, e uma sequência C. É feita uma varredura nas três sequências, nucleotídeo por nucleotídeo, e uma porcentagem média de identidade é calculada entre cada um dos três possíveis pares formados a partir das combinação entre as sequências. O valor de p é calculado com base na probabilidade de ocorrência ao acaso de sítios de recombinação, e no número de tripletos que continha o alinhamento (RDP4: INSTRUCTION MANUAL).

O método GENECONV olha para as regiões dentro de um alinhamento de sequências, de modo que os pares de sequências sejam suficientemente semelhantes para suspeitar que possam ter surgido por recombinação. São consideradas apenas as regiões polimórficas entre as sequências alinhadas; para cada par de sequências são identificadas regiões idênticas e similares, sendo que a similaridade depende a quantidade de sítios polimórficos entre elas. O valor de p é atribuído às regiões com elevado grau de polimorfismos (RDP4: INSTRUCTION MANUAL).

Dado um alinhamento, MaxChi examina pares de sequências e procura identificar os pontos de interrupção de recombinação, através de regiões polimórficas. São considerados apenas os sítios polimórficos e, para cada provável par de sequências encontrado no alinhamento, é feito o estudo de cada um de seus nucleotídeos. O valor de p é calculado como uma expressão da diferença no número de sítios variáveis entre os pares de sequências. Quando representados graficamente, estes valores são equivalentes a picos, que indicam potencial de recombinação (RDP4: INSTRUCTION MANUAL).

A presença de diferentes linhagens do genótipo V de DENV-1 no Brasil contribui para elevar a diversidade genética entre cepas do sorotipo circulantes no país. Uma recombinação resultante em uma linhagem mais resistentes pode favorecer a ocorrência de epidemias mais graves da doença. As Figuras 2, 3 e 4 sugerem que

a sequência Araraquara/2015 foi oriunda de uma recombinação entre as sequências FJ390380, de Porto Rico e AY713473, de Myanmar.

O dengue é endêmico em Porto Rico desde a década de 60 (NOYD D.H., SHARP T.M., 2015; SHARP et al, 2013). O primeiro caso de dengue com sinais alarme foi notificado pela primeira vez no país em 2010 (SOLER ROSARIO et al, 2010). De acordo com ELLIS e colaboradores (2016), a maior parte dos doentes que apresentaram a forma com sinais de alarme da doença, foram infectados durante a epidemia de 2012-2013, onde o principal sorotipo circulante em Porto Rico foi DENV-1. Como já citado anteriormente, 84% dos casos de dengue em Myanmar em 2013 resultaram em mortes e, das 39 sequências de DENV-1 analisadas por NGWE TUN e colaboradores (2016), 58.9% foram de DENV-1. Considerando que a sequência Araraquara/2015 tenha sido resultado da recombinação viral destes dois países, é possível compreender o grande aumento da mortalidade por dengue e o agravamento da sintomatologia da doença no ano de 2015 no Brasil.

5. Conclusão

A análise filogenética das sequências Araraquara/2015 e Araraquara/2016 mostrou que ambas pertenciam ao genótipo V. Estando as duas no mesmo clado que a sequência JQ922546, da Índia.

A sequência Araraquara/2015 parece ser resultado de uma recombinação entre as sequências FJ390380 e AY713473, com origem em Porto Rico e em Myanmar, respectivamente. Tal fato pode explicar a maior virulência da cepa e a grave epidemia de dengue de 2015 no Brasil, causada predominantemente por DENV-1.

É importante destacar a necessidade de vigilância ao genótipo V, já que o mesmo mostrou estar circulando nas duas últimas epidemias no Brasil. A circulação de cepas de DENV de múltiplas origens no país eleva as chances de ocorrência de eventos de recombinação, os quais podem ter implicações na evolução e patogenicidade dos vírus, e no desenvolvimento de vacinas eficazes contra a dengue.

6. Referências Bibliográficas

- AASKOV J., BUZACOTT K., FIELD E. et al. **Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient.** J Gen Virol. doi:10.1099/vir.083122-0, 2007.
- AFREEN N., NAQVI I.H., BROOR S., AHMED A., PARVEEN S. **Phylogenetic and Molecular Clock Analysis of Dengue Serotype 1 and 3 from New Delhi, India.** PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0141628. eCollection, 2015.
- A-NUEGOONPIPAT A, BERLIOZ-ARTHAUD A., CHOW V. et al. **Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains.** Virology 239:505–512, 2004.
- BHATT, S.; GETHING, P.W.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; FARLOW, A.W.; MOYES, C.L.; DRAKE, J.M.; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; SANKOH, O.; et al. **The global distribution and burden of dengue.** Nature. 496, 504–507, 2013.
- BRONZONI, R.V.M., BALEOTTI, F.G., NOGUEIRA, R.M.R., NUNES, M., FIGUEIREDO, L.T.M. **Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses.** J. Clin. Microbiol. 43, 696–702, 2005.
- COSTA R.L.; VOLOCH C.M.; SCHRAGO C.G.. **Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. Infection, genetics and evolution.** Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 12: 309–314, 2012.
- CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. **Dengue - Distribuição dos casos de dengue autóctones no Estado de SP, segundo o município de residência, por semana epidemiológica de início de sintomas, ano de 2015.** 2015.

CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. **Distribuição dos casos de dengue notificados e confirmados (autóctones e importados) no Estado de SP, segundo o município de residência, por mês de início de sintomas, ano 2016.** 2016.

DRUMOND B.P.; MONDINI A.; SCHMIDT D.J.; BOSCH I.; NOGUEIRA M.L. **Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by cocirculation and strain/lineage replacement.** Arch Virol 157: 2061–2073, 2012.

ELLIS E.M., SHARP T.M., PÉREZ-PADILLA J., GONZÁLEZ L., POOLE-SMITH B.K., LEBO E., BAKER C., DELOREY M.J., TORRES-VELASQUEZ B., OCHOA E., RIVERA-GARCIA B., DÍAZ-PINTO H.5, CLAVELL L., PUIG-RAMOS A., JANKA G.E., TOMASHEK K.M. **Incidence and Risk Factors for Developing Dengue-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Puerto Rico, 2008 - 2013.** PLoS Negl Trop Dis. doi: 10.1371/journal.pntd.0004939. eCollection, 2016.

FIGUEIREDO L.T.M.. **The Brazilian flaviviruses.** Microbes and Infection 2: 1643–1649, 2000.

GRATZ N.G.. **Critical review of the vector status of Aedes albopictus.** Med. Vet. Entomol. 18:215–27, 2004.

GUBLER, D. J.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S; FARRAR, J. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** CAB International 1–29, 2014.

LEWIS J.A.; CHANG G.J.; LANCIOTTI R.S.; KINNEY R.M.; MAYER L.W. et al. **Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses.** Virology 197:216–24, 1993.

LINDENBACH B.D., THIEL H.J., RICE C.M. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M. (eds) Fields virology, 5th edn. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 810–851, 2007.

MARKOFF L.. **5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA.** Adv Virus Res; 59:177–228, 2003.

- MENDEZ, J.A., USME-CIRO, J.A., DOMINGO, C., REY, G.J., SANCHEZ, J.A., TENORIO, A., GALLEG0-GOMEZ, J.C. **Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia.** Virol J 7, 226, 2010.
- MONDINI A., DE MORAES BRONZONI R.V., NUNES S.H., CHIARAVALL0TI NETO F., MASSAD E., ALONSO W.J., LÁZZARO E.S., FERRAZ A.A., DE ANDRADE ZANOTTO P.M., NOGUEIRA M.L. **Spatio-Temporal Tracking and Phylodynamics of an Urban Dengue 3 Outbreak in São Paulo, Brazil.** PLoS Negl Trop Dis. doi: 10.1371/journal.pntd.0000448, 2009.
- MURRELL, S., WU, S. C. & BUTLER, M. **Review of dengue virus and the development of a vaccine.** Biotechnol. Adv. 29, 239–247, 2011.
- NGWE TUN M.M., KYAW A.K., MAKKI N., MUTHUGALA R., NABESHIMA T., INOUE S., HAYASAKA D., MOI M.L., BUERANO C.C., THWE S.M., THANT K.Z., MORITA K. **Characterization of the 2013 dengue epidemic in Myanmar with dengue virus 1 as the dominant serotype.** Infect Genet Evol. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.025. Epub, 2016.
- NOYD D.H., SHARP T.M. **Recent Advances in Dengue: Relevance to Puerto Rico.** P R Health Sci J. PMID: 26061055, 2015.
- OSANAI C.H.; TRAVASSOS DA ROSA A.P.; TANG, A.T.; DO AMARAL R.S.; PASSOS, A.D.; TAUIL P.L. **Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima.** Preliminary report. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 25, 53–54, 1983.
- Pan American Health Organization (PAHO). **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country.** 2015.
- Pan American Health Organization (PAHO). **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country.** 2016.

Prefeitura Municipal de Araraquara. Disponível em: <
<http://www.araraquara.sp.gov.br/Pagina/Default.aspx?IDPagina=4301>>. Acesso em:
 agosto, 2016.

PYKE A.T.; MOORE P.R.; TAYLOR C.T.; HALL-MENDELIN S.; CAMERON J.N.;
 HEWITSON G.R.; PUKALLUS D.S.; HUANG B.; WARRILOW D.; VAN DEN HURK
 A.F. **Highly divergent dengue virus type 1 genotype sets a new distance record.**
 Sci Rep. doi: 10.1038/srep22356, 2016.

RDP4: INSTRUCTION MANUAL. Disponível em: <
<http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/RDP4Manual.pdf>>. Acesso em setembro, 2016.

RICO-HESSE R. **Microevolution and virulence of dengue viruses.** Adv Virus Res.;
 59:315-41, 2003.

RODHAIN F.; ROSEN L. **Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships.**
 pp. 45–60, 1997.

ROMI R. **History and updating on the spread of Aedes albopictus in Italy.**
 Parassitologia 37:99–103, 1995.

SABCHAREON A.; WALLACE D.; SIRIVICHAYAKUL C.; LIMKITTIKUL K.;
 CHANTHAVANICH P. et al. **Protective efficacy of the recombinant, live-
 attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a
 randomised, controlled phase 2b trial.** Lancet 380: 1559–1567, 2012.

SANTIAGO L.M., RIVERA A., et al. **Virus-specific differences in rates of disease
 during the 2010 Dengue epidemic in Puerto Rico.** PLoS Negl Trop Dis. 7(4):e2159.
 doi: 10.1371/journal.pntd.0002159 PMID: 23593526; PubMed Central PMCID:
 PMC3617145, 2013.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015.** Volume 47, N° 3, 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016.** Volume 47, N° 33, 2016.

SHARP T.M., HUNSPERGER E., SANTIAGO G.A., MUNOZ-JORDAN J.L., SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. **Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention.** Philippine J. Sci. 29, 1–304, 1926.

SOLER ROSARIO Y., GARCIA R., FERNANDEZ SEIN A. **Dengue virus associated hemophagocytic syndrome in children: a case report.** Bol Asoc Med P R.; 102(1):49–54. PMID: 20853575, 2010.

TWIDDY S.S.; HOLMES E.C.; RAMBAUT A. **Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution.** Mol. Biol. Evol. 20:122–29, 2003.

VILLABONA-ARENAS C.J., MONDINI A., BOSCH I., SCHIMITT D., CALZAVARA-SILVA C.E., et al. **Dengue Virus Type 3 Adaptive Changes during Epidemics in São Jose de Rio Preto, Brazil, 2006–2007.** PLOS ONE 8(6). doi: 10.1371/annotation/5b2477b7-f68d-4800-a17e-fd85f5ad8311, 2013.

VILLABONA-ARENAS C.J.; ZANOTTO P.M.D.A. **Evolutionary history of Dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics.** Infection, genetics and evolution. Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases: 1–8, 2011.

World Health Organization (WHO). **Dengue and severe dengue.** 2016.

World Health Organization (WHO); Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. ISBN 978 92 4 154787 1, 2009.

World Health Organization (WHO). **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. ISBN 978 92 4 150403 4, 2012.

ZANOTTO P.M.; GOULD E.A.; GAO G.F.; HARVEY P.H.; HOLMES E.C. **Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:548–53, 1996.

Araraquara, 11 de janeiro de 2017.

Marília Mazzi Moraes

De acordo,

Prof. Dr. Adriano Mondini