Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Filogeografia da Febre Amarela na América do Sul

Renato Pereira de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto

São Paulo – SP
2013

Filogeografia da Febre Amarela na América do Sul

Renato Pereira de Souza

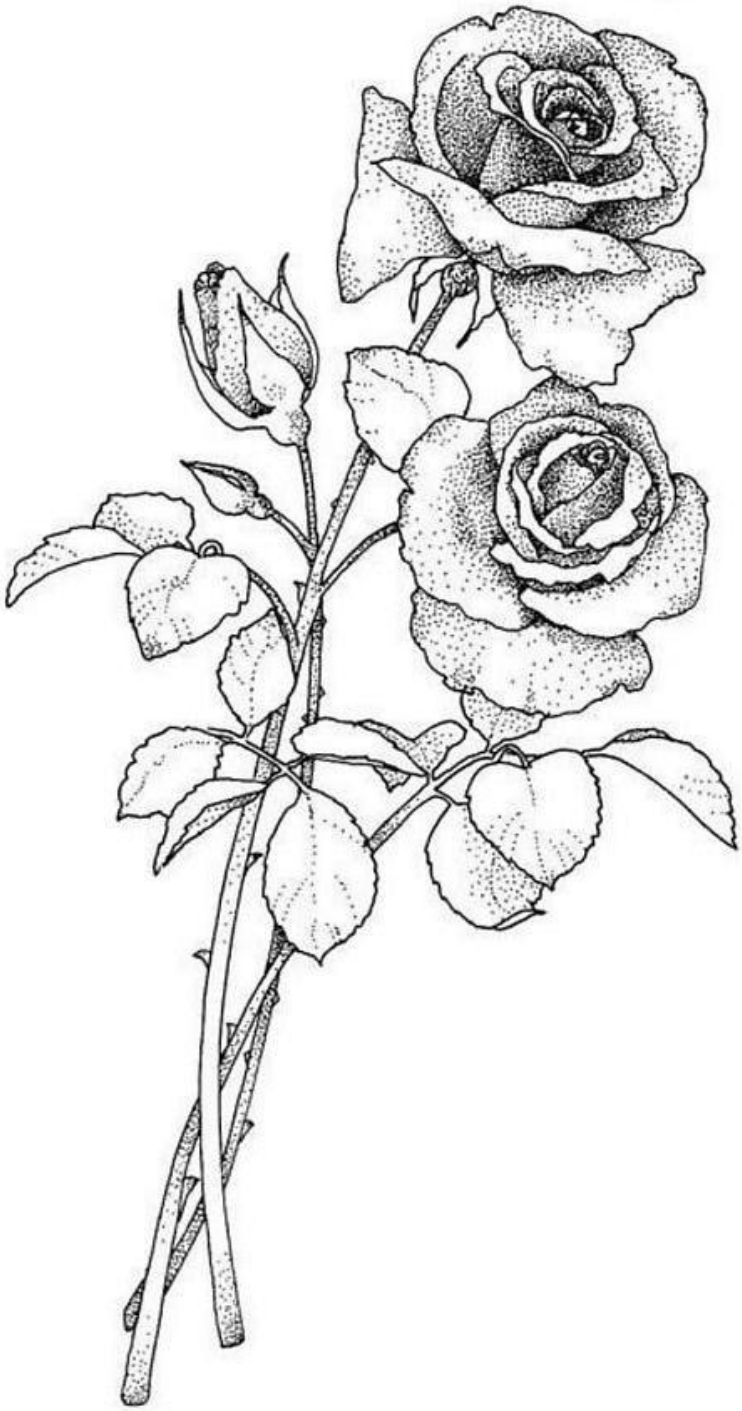
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto

São Paulo – SP
2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.



Para minha esposa **Fabiana Martins Soares de Souza**.

Minha melhor amiga, a mulher da minha vida,

Mais fiel torcedora, apoio incansável e descanso,

Nessa e em todas caminhadas.

"*My angel, my all, my very self.*

All my thoughts are for you, my immortal beloved"

Ludvig van Beethoven

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto, pela amizade, orientação, apoio, incentivo e confiança. Agradeço por ter abraçado meu projeto aos 45 minutos do segundo tempo, e ter acreditado que poderia dar certo. Tem sido verdadeiramente uma ótima experiência.

Aos membros de minha banca examinadora, pelas sugestões valiosas que enriqueceram este trabalho, e pelo interesse e suporte.

Aos Professores do Departamento de Epidemiologia pelos ensinamentos ao longo de todos esses anos, não apenas nas disciplinas e ao longo do curso, mas em todos os contatos que tivemos desde minha graduação.

Aos amigos Prof. Dr. José Maria Soares Barata, Prof. Dr. Delsio Natal, Dr. Paulo Urbinatti e Dr. Walter Ceratti Jr. Com eles comecei minha carreira acadêmica e foi onde me interessei por Saúde Publica e Epidemiologia e fiz boas e grandes amizades. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Delsio Natal e Dr. Paulo Urbinatti por suas sugestões em relação à ecologia e modelagem de nicho ecológica de *Haemagogus sp.*

Ao Prof. Dr. Mario de Vivo por compartilhar seu conhecimento sobre o gênero *Alouatta*, sua distribuição e ecologia. Agradeço pelo acesso a coleção do Museu de Zoologia para conferência das localidades utilizadas durante a modelagem de nicho de *Alouatta* sp.

Agradeço ao Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, pelo apoio, incentivo e interesse em meu crescimento como pesquisador e pelas sugestões em relação à análise concatenada dos fragmentos.

Aos amigos da SUCEN Rosa Maria Tubaki, Regiane Menezes Tironi, Luis Filipe Mucci, Rubens Pinto Cardoso Júnior e Eduardo Sterlino Bergo.

Aos amigos do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” Giselda Katz, Ana Freitas, Ciléia Hatsumi Tengan, Melissa Mascheratti e Roberta Spinola.

Ao amigo Alessandro Pecego Romano, pelas conversas, por dividir sua experiência na vigilância de Febre Amarela, seu apoio e amizade nesses tantos anos de estudo e vigilância de Febre Amarela, Hantavírus e tantas outras histórias.

Aos meus amigos do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial, do Centro de Virologia e do Instituto Adolfo Lutz que apoiaram e favorecerem este trabalho com sua amizade e apoio técnico. O profissionalismo e dedicação desse grupo é base essencial dessa pesquisa e motivo de honra e orgulho de poder me incluir em tal companhia.

Agradeço pelo apoio técnico na realização dos isolamentos virais, PCRs e sequenciamentos a Terezinha Lisieux, Selma Petrella, Vivian Silveira, Iray Maria Rocco, Adriana Maeda e Sarai Joaquim dos Santos. Agradeço a Selma e Lisieux pelo apoio e suporte durante os momentos em que não estive tão presente na rotina por estar me dedicando às disciplinas ou a este trabalho.

Ao corpo diretivo do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio, e em especial a diretora do Centro de Virologia Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky e a Dra. Luiza Teresinha Madia de Souza.

Agradeço à Akemi Suzuki, Diretora do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial, e à Ivani Bisordi pelo apoio integral a esta pesquisa e pelos seus conhecimentos e amizade. Saibam que vocês são exemplos de dedicação e ética de trabalho aos quais realmente admiro.

À minha família na Igreja Metodista em Pinheiros, um abrigo e baluarte constante contra as tempestades deste mundo e aos meus irmãos Eduardo Seixas Jr. E Dani, Josias e Íris, Sydnei e Cida, Rodrigo e Karla, Hélio e Sônia, Rodolfo, Gláucia, Munir e Rosiméia, Teresa Mendonça, Jairma, Pr. Maurício e Talita. Vocês tem sido sustento em oração e amizade.

Aos nossos queridos pastores Pr. Ronald e Pra. Cristiane. Que Deus abençoe vocês e ao Elias.

Ao nosso querido casal Amador e Mônica, pelo exemplo, amizade, carinho e companheirismo.

Aos queridos irmãos e amigos Marco, Cris e Murilo, que tem compartilhado tanto e sido presentes em minha vida e na vida de minha família.

Aos meus amados Geuid Dib Jardim, Ana Maria Marinoni Jardim e Tia Leila, que com a amizade e carinho, incessantes, fizeram momentos difíceis mais fáceis e passageiros, e tornaram os momentos alegres em lembranças eternas. Vocês são, sem dúvida, nossa família também.

Aos meus pais, José Pereira de Souza e Anna Maria Corrêa de Souza, que me apoiaram e incentivaram a buscar e ser exatamente o que sempre sonhei. Creio que eles gostariam muito de poder ver o que tenho feito. As minhas irmãs Valéria e Mirian Carolina, ao meu irmão Bruno e a tia Mirian. Amo vocês.

À minha família em BEAGÁ, que mesmo a distância me apoiaram com carinho, amor e oração e tem me recebido com braços abertos, amorosos e festivos nos momentos de descanso e lazer em que podemos estar juntos... Muito obrigado aos meus sogros, Walter e Lurdes, que tem sido como pais, meus irmãos Aline, Walter, Bia, Railander e Juary e aos nossos sobrinhos Samuel, João Pedro e Isaac que tem tornado a vida algo assim tão

interessante. Espero que vocês saibam o quanto amo vocês e quanto vocês significam em minha vida.

Agradeço à minha esposa, amada e querida Fabiana Martins Soares de Souza, que me apoiou e incentivou em todas as coisas, que esteve presente em cada linha deste trabalho e que me faz desejar e aspirar coisas maiores e melhores... É uma honra poder construir uma vida ao seu lado, um privilégio ter você como esposa e uma alegria ter você como inspiração... Muito obrigado Fabiana, a vida tem sido uma aventura deliciosa ao seu lado. “É na soma do teu olhar que eu vou me conhecer inteiro...” Chico Buarque de Hollanda.

E por fim, à Deus… meu Pai, Amigo, Conselheiro, Consolo e Sustento. “Os céus declaram a glória de Deus e o firmamento anuncia a obra das suas mãos. Um dia faz declaração a outro dia, e uma noite mostra sabedoria a outra noite. Não há linguagem nem fala onde não se ouça a sua voz. A sua linha se estende por toda a terra, e as suas palavras até ao fim do mundo. Neles pôs uma tenda para o sol, O qual é como um noivo que sai do seu tálamo, e se alegra como um herói, a correr o seu caminho. A sua saída é desde uma extremidade dos céus, e o seu curso até à outra extremidade, e nada se esconde ao seu calor. A lei do SENHOR é perfeita, e refrigera a alma; o testemunho do SENHOR é fiel, e dá sabedoria aos símplices. Os preceitos do SENHOR são retos e alegram o coração; o mandamento do SENHOR é puro, e ilumina os olhos. O temor do SENHOR é limpo, e permanece eternamente; os juízos do SENHOR são verdadeiros e justos juntamente. Mais desejáveis

são do que o ouro, sim, do que muito ouro fino; e mais doces do que o mel e o licor dos favos. Também por eles é admoestado o teu servo; e em os guardar há grande recompensa. Quem pode entender os seus erros? Expurga-me tu dos que me são ocultos. Também da soberba guarda o teu servo, para que se não assenhorie de mim. Então serei sincero, e ficarei limpo de grande transgressão. Sejam agradáveis as palavras da minha boca e a meditação do meu coração perante a tua face, SENHOR, Rocha minha e Redentor meu!” Salmos 19:1-14.

Now my own suspicion is that the Universe is not only queerer than we suppose, but queerer than we can suppose.
— J.B.S. Haldane

RESUMO

Os Flavivírus são vírus de 40 – 50 nm de diâmetro, com formas esféricas e RNA de fita simples, com sentido positivo e aproximadamente 11 kb de comprimento. O Vírus da Febre Amarela, protótipo do grupo, é o agente causador da Febre Amarela, uma antiga doença que causou epidemias generalizadas na África, Américas do Norte e do Sul e Europa do século XVII ao início do século XX, e depois ressurgiu nas últimas décadas na África sub-saariana e América do Sul tropical. O presente trabalho busca a reconstrução da transmissão da Febre Amarela na América do Sul, no tempo e espaço, em especial, considerando a provável influência das populações humanas, primatas não humanos e mosquitos, na evolução e distribuição das linhagens genéticas de Febre Amarela, aplicando modelos de inferência Bayesiana para análises filogenéticas e filogeográficas e testando hipóteses de distribuição geográfica com modelagem de nicho ecológico. Os dados dão poucas evidências de que as estratégias de vacinação vigentes tenham efetivamente colaborado para a diminuição da ocorrência de Febre Amarela, indicando possíveis erros na estratégia de vacinação. A partir da análise Coalescente da população viral de Febre Amarela, a população viral apresentou um decréscimo importante iniciado em meados dos anos 90. A análise filogeográfica sugere um padrão geral de transmissibilidade “Source-Sink” destacando a região amazônica como fonte de diversidade para as outras áreas estudadas, com uma estrutura filogeográfica secundária em ondas. Assim, as introduções do vírus em áreas fora da amazônia tem ocorrência

aleatória e podem ser ligadas temporalmente e geograficamente ao norte da America do Sul. Os modelos de distribuição geográfica corroboram esse padrão e indicam uma área possível para circulação da Febre Amarela ampla, englobando diversos ecótonos. Os resultados indicam um possível efeito em longo prazo da vacinação atuando diretamente sobre a evolução e dinâmica filogenética da Febre Amarela e sugere que monitorar a evolução do vírus da Febre Amarela é uma estratégia válida para compreender sua distribuição geográfica e evidenciar mecanismos complexos de transmissão e introdução. Por sua vez, os modelos de Nicho Ecológico mostraram ser ferramentas adequadas para calcular o risco da doença em determinadas áreas, sem sua ocorrência prévia, contribuindo como um modelo preditivos para orgãos de Vigilância prepararem suas estratégias de prevenção e controle no caso de possível introdução de patógenos.

Descritores: Febre Amarela, Filogenética Bayesiana, Filodinâmica viral. Análise Filogeográfica, Modelagem de Nicho Ecológico, *Alouatta, Haemagogus*.

ABSTRACT

The flaviviruses are viruses of 40-50 nm in diameter, with spherical shaped and single-strand RNA with positive sense and approximately 11 kb in length. The Yellow Fever virus is the prototype of the group and the causative agent of Yellow Fever, a disease which caused widespread epidemics in Africa, North America, South America and Europe of the seventeenth century to the early twentieth century. The disease reemerged in recent decades in sub-Saharan Africa and tropical South America. This manuscript aims to reconstruct, in time and space, the transmission of yellow fever in South America, through the applying of a Bayesian inference model, considering the probable influence of human populations, nonhuman primates and mosquitoes on the evolution and distribution of Yellow Fever genetic lineages. Distributional pattern hypothesis will be tested by computational modeling of ecological niche. The data provide little evidence that current vaccination strategies have effectively contributed to reducing the occurrence of Yellow Fever, indicating possible errors in the vaccination strategy. From the analysis of the Yellow Fever population Coalescence, the viral population showed a significant decrease started in the mid-90s. The phylogeographic analysis suggests a general pattern of transmissibility "Source-Sink" highlighting the Amazon region as a source of diversity for the other areas studied, with a secondary phylogeographic wave like structure. Thus, the introductions of the virus into areas outside the Amazon has random occurrence and can be linked temporally and geographically to the north of South America The geographical distribution models corroborate this

pattern and indicate a broad possible area for Yellow Fever circulation, encompassing many ecotones. The results indicate a possible long-term effect of vaccination acting directly on the evolution and phylogenetic dynamics of Yellow Fever and suggests that monitoring the evolution of the Yellow Fever virus is a valid strategy to understand the geographical distribution and highlight complex transmission mechanisms and spatial movements. In turn Ecological Niche models showed as an appropriate tool to calculate disease risk in certain areas without previous occurrence of the disease, working as a predictive model for Surveillance institutions prepare their strategies for prevention and control in the case of possible pathogen introduction.

Descriptors: Yellow Fever, Bayesian phylogeny, Phylogeographic Analysis, Viral Phylodynamic, Ecological Niche Modeling, *Alouatta, Haemagogus*.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO..... 21

1.1. BIOLOGIA MOLECULAR DOS FLAVIVÍRUS..... 21

1.2. EPIDEMIOLOGIA 22

1.3. FEBRE AMARELA – UMA PERSPECTIVA HISTÓRICA DA DOENÇA 31

1.4. FATORES DETERMINANTES DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA ATUAL DA FEBRE AMARELA..... 36

1.5. ECOLOGIA DA FEBRE AMARELA SILVESTRE NA AMÉRICA DO SUL..... 40

1.6. FILOGENIA BAYESIANA, FILODINÂMICA E FILOGEOGRAFIA..... 45

1.7 COALESCÊNCIA 49

1.6. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO..... 50

2. OBJETIVOS..... 54

2.1 HIPÓTESES E OBJETIVO GERAL 54

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 54

3. METODOLOGIA..... 56

3.1. AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS VIRAIS 56

3.2. ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CAMUNDONGOS..... 57

3.3. ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CULTURA DE CÉLULAS..... 58

3.3. EXTRAÇÃO DE RNA, PCR E SEQUENCIAMENTO..... 59

3.4. ALINHAMENTO E CONSTRUÇÃO DAS DATABASES..... 60

3.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA..... 62

3.6. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO..... 64

3.8. COLETA DE DADOS DE *HAEMAGOGUS* SP..... 65

3.9. COLETA DE DADOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS..... 66

3.10. IDENTIFICAÇÃO DE CASOS FEBRE AMARELA..... 68

3.11. DADOS AMBIENTAIS..... 69

4.. RESULTADOS 71

4.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA..... 71

4.2. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO..... 86

5. DISCUSSÃO..... 101

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES..... 112

7. REFERÊNCIAS 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Origem das cepas virais de Febre Amarela utilizadas nesse estudo.	56
Tabela 2.	Cepas virais de Febre Amarela, retiradas do GenBank, utilizadas nesse estudo.	61
Tabela 3.	Sumário de Variáveis ambientais utilizadas na construção dos modelos preditivos de distribuição.	70
Tabela 4.	Contribuição relativa das camadas de dados ambientais para os modelos de distribuição de Alouatta sp, Cebus sp e Haemagogus sp.	88
Tabela 5.	Contribuição relativa das camadas de dados ambientais e dos modelos de distribuição de Alouatta sp, Cebus sp e Haemagogus sp para o modelo de distribuição da Febre Amarela.	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Áreas de risco e de recomendação de vacina contra febre amarela no Brasil, 1997 a 2008. Fonte: SVS/MS.	25
Figura 2	Reconstrução filogenética Bayesiana (àrvore MCC) da Febre Amarela utilizando-se seqüências da região genômica prM/E.	72
Figura 3	Reconstrução filogenética Bayesiana (àrvore MCC) da Febre Amarela utilizando-se seqüências da região genômica 3'NCR.	73
Figura 4	Reconstrução filogenética Bayesiana da Febre Amarela utilizando-se seqüências da região genômica 3'NCR. Intensidade da hachura proporcional à taxa de substituição de nucleotídeos observada em cada clado.	75
Figura 5	Bayesian Skyline reconstruído a partir da analise de coalescência obtida após estudo do fragmento 3'NCR.	76
Figura 6	Bayesian Skyline reconstruído a partir da analise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M.	77
Figura 7	Bayesian Skyrine reconstruído a partir da analise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M.	77
Figura 8	Bayesian Skyride reconstruído a partir da analise de coalescência obtida após estudo do fragmento 3'NCR.	78
Figura 9	Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, relação	79

ao tempo, reconstruídas a partir do estudo do fragmento 3’NCR.

Figura 10 Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo do fragmento prM/E. 79

Figura 11 Incidência de Febre Amarela entre 1990 e 2010 e cobertura vacinal no período de 1995 a 2010, Brasil (SinanWeb Ministério da Saúde / SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net / http://dtr2004.saude.gov. br / sinanweb). 80

Figura 12 Bayesian skyline reconstruído a partir da analise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M e 3’NCR. 81

Figura 13 Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, referente ao acumulo de variantes do gene da PrM, em relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo dos fragmentos concatenados 3’NCR e PrM. 81

Figura 14 Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, referente ao acumulo de variantes do gene da 3’NCR, em relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo dos fragmentos concatenados 3’NCR e PrM. 82

Figura 15 Análise filogeográfica obtida após estudo do fragmento 3’NCR. Cores indicam diferentes componentes de localidade associado a cada seqüência estudada. 84

Figura 16 Detalhe da análise filogeográfica obtida após estudo do fragmento 3'NCR, destacando ramos terminais do clado representativo da linhagem 1E circulante entre 2008 – 2009. 85

Figura 17 Reconstrução da circulação em plano continental a partir de análise filogeográfica discreta, destacando o avanço da transmissão e circulação, ao longo do tempo, em quatro fatias temporais (1948/1968/1997/2004). 85

Figura 18 Distribuição modelada de Alouatta sp (Esquerda) Cebus sp (Centro) e Hemagogus sp (Direita). 87

Figura 19 Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Alouatta sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior) 90

Figura 20 Curva Característica de Operação do receptor "receiver operating characteristic" (ROC) para o modelo de Alouatta sp. 91

Figura 21 Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Cebus sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior) 92

Figura 22 Curva Característica de Operação do receptor "receiver operating characteristic" (ROC) para o modelo de Cebus sp. 93

Figura 23 Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Haemagogus sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior). 94

Figura 24 Curva Característica de Operação do receptor “receiver operating characteristic” (ROC) para o modelo de Haemagogus sp. 95

Figura 25 Área de distribuição provável de Febre Amarela, modelada a partir de dados ambientais e de modelos de distribuição geográfica gerados para *Alouatta sp, Cebus sp e Hemagogus sp*. 97

Figura 26 Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Febre Amarela com dados de treino (Superior) e teste (Inferior). 99

Figura 27 Curva Característica de Operação do receptor “receiver operating characteristic” (ROC) para o modelo de Febre Amarela. 100

1. INTRODUCÃO

1.1. BIOLOGIA MOLECULAR DOS FLAVIVÍRUS

O gênero Flavivírus, anteriormente conhecido como Arbovírus grupo B, compreende mais de 70 agentes com propriedades antigênicas comuns. Os Flavivírus são partículas esféricas de 40 – 50 nm de diâmetro, e são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade, estando associados a quadros encefalíticos, hemorrágicos, doenças hepáticas e quadros febris inespecíficos em vertebrados, incluindo seres humanos (Zanotto et al., 1995).

Os Flavivírus apresentam genoma de RNA de fita simples, com sentido positivo e aproximadamente 11 kb de comprimento, dispostas em uma região curta 5' não-codificante (5'NCR), uma região codificadora com uma única *Open Reading Frame* para codificação das proteínas estruturais do capsídeo (C), Premembrane (Pr/M), membrana (M), envoltório (E), e das proteínas não-estruturais (NS), conhecidas como proteínas NS1, NS2, NS2a, NS2b, NS3, NS4, NS5. Por fim, apresenta ainda uma região 3' não codificante (3'NCR) (Chambers et al., 1990).

As proteínas estruturais formam a estrutura básica da partícula viral, sendo a proteína Pr/M a precursora da proteína da membrana (M), a proteína E precursora do envoltório, e a proteína C codificante do capsídeo viral. São a essas proteínas que o organismo humano responde durante a infecção, produzindo anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH), em resposta às

glicoproteínas do envoltório e anticorpos neutralizantes (N) contra a proteína C do capsídeo (Zanotto et al., 1996). As proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo sua replicação, e os fatores determinantes de virulência e patogenicidade (Chambers et al., 1990).

O Vírus da Febre Amarela (YFV) é o protótipo da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, e foi o primeiro vírus humano a ser isolado (Zanotto et al., 1995).

1.2 – EPIDEMIOLOGIA DA FEBRE AMARELA

O Vírus da Febre Amarela é o agente causador da Febre Amarela, uma antiga doença que causou epidemias generalizadas na África, Américas do Norte e do Sul e Europa do século XVII ao início do século XX, e depois ressurgiu nas últimas décadas na África sub-saariana e América do Sul tropical (Bryant et al., 2007).

Nos seres humanos, a doença está associada a amplo espectro de manifestações clínicas, desde a infecção inaparente ou febre leve a hepatite grave e doença hemorrágica. A taxa de mortalidade entre pacientes sintomáticos que desenvolvem doença visceral varia de 20% a 50% (Monath, 2008 a,b).

Apesar da existência de uma vacina altamente eficaz, disponível desde 1937, e dos esforços na erradicação do *Aedes aegypti*, principal vetor do vírus, a Febre Amarela continua a ser uma preocupação importante de Saúde Pública, causando um número estimado de 200.000 casos e 30.000 mortes por ano (Vainio & Cutts, 1998), principalmente na África, onde a doença circula de forma importante em sua forma urbana, respondendo por mais de 90% dos casos de Febre Amarela anualmente notificados à OMS. (Robertson et al., 1996). De forma geral, esse quadro se agrava pela incapacidade de sustentar os programas de vacinação, pelo risco associado a vacina, principalmente em pessoas imunodeprimidas e o controle ineficaz do mosquito.

Mais de 80% dos casos da doença ocorrem em indivíduos do sexo masculino com idade variando entre 14 a 35 anos, devido principalmente a maior exposição aos fatores de risco ambientais dessa faixa populacional e não a uma maior susceptibilidade ao vírus. O risco de infecção varia, sendo maior para os indivíduos que se expõem sistematicamente ao ambiente silvestre e rural e, praticamente, nulo aos que evitam os ambientes de matas ou que vivem em áreas indenes da virose. Nos últimos 5 anos, observou-se uma tendência de aumento de casos no sexo feminino e entre menores de 15 anos, especialmente nos pacientes oriundos da Amazônia (Vasconcelos 2003; Vasconcelos et al., 2001 a,b).

A mortalidade global da Febre Amarela situa-se entre 5 – 10%, (Vasconcelos, 2003). A letalidade dos casos graves revela-se ainda maior,

sendo no Brasil entre 40% – 60% (Vasconcelos et al., 2001a;b; Vasconcelos et al., 1997 a,b).

A Febre Amarela apresenta dois ciclos epidemiológicos distintos, sendo uma forma silvestre e outra urbana.

A Febre Amarela Silvestre, endêmica em regiões tropicais da África e das Américas, apresenta-se geralmente sob a forma de surtos, com intervalos de 5 a 10 anos, alternados por períodos com menor número de registros. Em geral, epizootias precedem o aparecimento de casos humanos.

No período de 1970 – 2001, foram notificados 4.543 casos de Febre Amarela Silvestre na América do Sul. O Peru, com 2.341 casos (51,5%) e a Bolívia com 912 casos (20,1%), são os dois países que mais reportaram casos. O Brasil ocupa o terceiro lugar com 849 casos (18,7%) notificados no período (PAHO, 2002).

No Brasil, desde os últimos registros de casos de Febre Amarela Urbana, em 1942, só há ocorrência de casos de Febre Amarela Silvestre, e até 1999 os focos endêmicos estavam situados nos Estados das regiões Norte, Centro-Oeste e área pré-amazônica do Maranhão, além de registros esporádicos na parte oeste de Minas Gerais (Vasconcelos 2001a).

Nos surtos ocorridos no período de 2000/2003, observou-se uma expansão da circulação viral no sentido Leste e Sul do País, detectando a

presença do vírus nas áreas silenciosas após várias décadas, o que levou a uma redefinição nas áreas de risco (Ministério da Saúde, 2005 a,b).

Além da ampliação da área de transição, foi estabelecida uma nova área, denominada área indene – mas de risco potencial –, uma área contígua à de transição e com ecossistemas semelhantes, englobando municípios do sul de Minas Gerais e da Bahia e a região centro-norte do Espírito Santo (Ministério da Saúde 2005 a,b).

Na Figura 1 apresenta-se a evolução da área de ocorrência e recomendação de vacina.

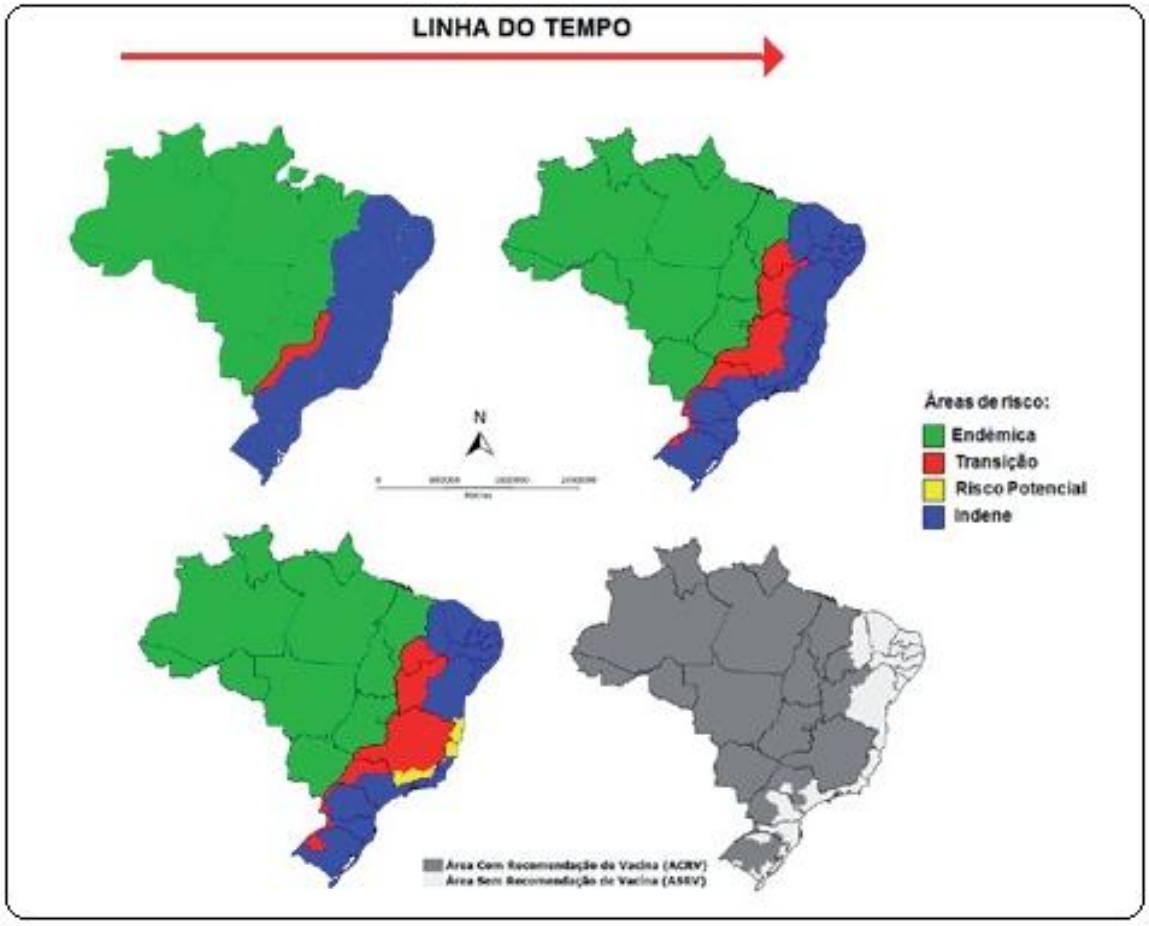


Figura 1. Áreas de risco e de recomendação de vacina contra febre amarela no Brasil, 1997 a 2008. Fonte: SVS/MS.

Admitem-se assim, três áreas epidemiológicas de risco da Febre Amarela: uma área endêmica, uma área de transição (também conhecida como epizoótica ou de emergência) e uma área indene (Costa et al.,2002; Ministério da Saúde 2005 a,b). Atualmente no Brasil, a área endêmica – que inclui as regiões Norte e Centro Oeste e o Estado do Maranhão – abriga uma população aproximada de 30 milhões de habitantes (Funasa, 2001).

Nos últimos anos, face ao significativo aumento na ocorrência e circulação do vírus da Febre Amarela, a área epizoótica aumentou, passando a incluir além da parte ocidental de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, classicamente consideradas áreas de risco, as partes ocidentais dos Estados do Piauí e Bahia no Nordeste, e Santa Catarina e Rio Grande do Sul na região Sul (Figura 1).

Esse aumento da área de transição deu-se pela necessidade de estender a faixa de proteção às áreas com circulação epizoótica recente, inclusive em áreas com coberturas florestais rarefeitas. Outro fator contribuinte a esta expansão foi a grande mobilidade da população. A área de transição conta com cerca de 18 milhões de habitantes. Já a área indene corresponde às áreas da costa brasileira, desde o Piauí até o Rio Grande do Sul, onde vivem cerca de 118 milhões de habitantes (Figura 1).

A imunidade das populações que vivem nessas áreas varia consideravelmente. Na área endêmica estima-se que cerca de 95% da população já tenha sido vacinada contra a Febre Amarela (Vasconcelos, 2003). Observa-se índice similar ou ligeiramente inferior na área de transição. Já na área indene, a cobertura vacinal é baixa ou praticamente nula (Costa et al.,2002), com exceção no Estado da Bahia, onde o governo instituiu a vacinação de toda a população há alguns anos.

A maior freqüência da doença ocorre nos meses de Janeiro a Abril, associada aos elevados índices pluviométricos e de densidade vetorial, também coincidente com a época de maior atividade agrícola (Vasconcelos 2003, Ministério da Saúde, 2005 a,b).

Na África, por sua vez, há diferentes níveis de transmissão: silvestre, rural ou peri-urbana e urbana (Digoutte et al.,1995; Barret & Higgs, 2007). A transmissão silvestre em áreas florestais e de savanas úmidas se faz principalmente pelo *Aedes africanus*, mosquito de hábitos silvestres. Em áreas de savanas, em geral da África Ocidental, os transmissores são principalmente o *Ae. furcifer* e o *Ae. taylori* (Vasconcelos, 2003; Barret & Higgs 2007). Nas savanas secas o *Ae*. *luteocephalus* é o transmissor, ocorrendo em vilas localizadas próximo de florestas, em particular na Nigéria. Na África Oriental e Central, *Ae. africanus* e *Ae. pseudoafricanus* tem sido os vetores mais associados aos surtos de Febre Amarela Silvestre (Vasconcelos, 2003; Digoutte et al.,1995).

Na África Oriental, o *Ae. simpsoni* atua como um vetor de ligação entre os ciclos urbano e silvestre, por transitar entre os ambientes de mata e periferias das cidades. A espécie pode inclusive manter a transmissão urbana contínua nessas áreas (Vasconcelos, 2003).

Nas Américas outras espécies de mosquitos são responsáveis pela transmissão da forma silvestre da Febre Amarela, sendo os gêneros: *Haemagogus* (*Hg. janthinomys, Hg. albomaculatus, Hg. Leucocelaenus*) e *Sabethes* (*Sa. chloropterus, Sa. soperi*, *Sa. Cyaneus)* (Degallier et al.,1992; Forattini 2002) os de maior importância.

Cerca de 98% de todos os isolamentos de Febre Amarela procedentes de mosquitos, obtidos no Instituto Evandro Chagas – Belém/PA, originaram-se desses gêneros. Excepcionalmente espécies de outros gêneros foram encontradas infectadas. É o caso do *Aedes fulvus, Ae. scapularis* e *Psorophora albipes*, cada um com um único isolamento (Vasconcelos, 2003). No Estado de São Paulo, *Haemagogus leucocelaenus* foi encontrado naturalmente infectado com o vírus e associado à transmissão silvestre (Souza et al., 2011).

Tanto na África quanto na América, os hospedeiros silvestres primários do vírus da Febre Amarela são primatas não humanos. No continente africano, os primatas mostram-se mais resistentes ao vírus e, ainda que desenvolvam a infecção, raramente morrem em decorrência da doença (Monath, 1988 a,b; Vasconcelos, 2003).

Nas Américas, alguns primatas mostram grande susceptibilidade e sensibilidade à infecção, por exemplo, o Guariba ou Bugiu (gênero *Alouatta*). Já outros apresentam grande resistência, como a exemplo do macaco prego (gênero *Cebus* e *Sapajus*) (Ministério da Saúde, 2005).

A Febre Amarela Urbana não ocorre no País desde 1942 (Monath, 1988). Enquanto o *Aedes aegypti* encontrava-se erradicado, não existia o risco de reurbanização da doença. Entretanto, a reinfestação de extensas áreas do nosso território por esta espécie de mosquito, acarreta o risco de restabelecimento da transmissão urbana do vírus da Febre Amarela.

A Febre Amarela faz parte da lista de doenças de notificação compulsória e como tal, casos suspeitos devem ser imediatamente notificados à autoridade sanitária local, estadual ou nacional e esta notificar os organismos internacionais. Após a confirmação laboratorial, a notificação do caso é confirmada e a autoridade nacional ratifica a autoridade sanitária internacional (Robertson 1993, Ministério da Saúde 2005 a).

O método mais eficaz para prevenção da Febre Amarela ainda é a vacinação. Atualmente, duas cepas são usadas na produção de vacinas: 17DD no Brasil e 17D-204 no resto do mundo (Galler et al.,2001). A OMS recomenda que sejam vacinadas todas as pessoas hígidas com mais de 6 meses de idade, que residam nas áreas de risco ou que se dirijam a elas.

Uma única dose da vacina protege o indivíduo por pelo menos 10 anos, quando então é recomendada a aplicação de nova vacinação (Robertson et al.,1993).

Como a vacina é produzida com vírus vivo atenuado, não é recomendada a vacinação de pessoas imunodeprimidas, devido ao risco de doença associada à reversão da virulência. A vacina é contra recomendada a pacientes com SIDA/AIDS, câncer e em uso de medicação imunossupressora, salvo em casos particulares e após cuidadosa avaliação dos riscos e benefícios (Martins et al.,2007).

Embora seja esperado um quadro de reações normais a vacina, que vão desde dor local, inflamação, mialgia, febre baixa e outros sintomas de pouca importância detectáveis entre 1 – 2 dias após a vacinação, existe um risco baixo de eventos adversos graves (Barret & Teuwen, 2009).

Existem basicamene dois tipos de eventos adversos graves, a Doença Neurotrópica e a Doença Viscerotrópica. A primeira caracteriza-se pela neuroinvasão do vírus atenuado, causando encefalite, principalmente em primo-vacinados, com uma taxa de letalidade de 5%. Por sua vez, a doença viscerotrópica apresenta-se como uma infecção sistêmica, com envolvimento inicial hepático, cursando de forma semelhante a doença associada ao vírus selvagem, de alta letalidade (60%) (Barret & Teuwen, 2009). A freqüência estimada para a doença viscerotrópica é de 0,3 – 0,5 casos para 100 000 doses aplicadas, e imunossupressão, idade e histórico de doença no Timo

aparecem como fatores de risco ao desenvolvimento de reações adversas graves (Barret & Teuwen, 2009).

Pessoas com antecedentes de alergia à proteína do ovo também não devem ser vacinadas pelo risco de desenvolverem reação alérgica e choque anafilático (Kelso et al.,1999). Finalmente, gestantes não devem ser vacinadas, considerando o risco de transmissão para o feto (Robert et al.,1999; Tsai et al.,1993). Abaixo de seis meses há maiores riscos de desenvolvimento de encefalite pós vacinal (Jennings et al.,1994; Martins et al.,2007).

Outro procedimento que pode prevenir a ocorrência da Febre Amarela é o combate aos vetores e o uso de medidas de proteção individual. No entanto, o combate aos vetores silvestres deve ser considerado inviável e apenas o combate ao vetor urbano, *Aedes aegypti*, pode ser efetuado. No entanto, o controle desse vetor tem se mostrado difícil, como a expansão urbana da Dengue vem demonstrar.

1.3. FEBRE AMARELA – UMA PERSPECTIVA HISTÓRICA DA DOENÇA

Entre as últimas décadas do século XIX e os primeiros anos do século XX, a Febre Amarela foi de grande importância para a Saúde Pública, como uma das principais moléstias de caráter epidêmico em circulação no Brasil.

Ainda em 1685 ocorreram epidemias em Recife e outras regiões do Estado do Pernambuco. Um ano depois, foi detectado um grande surto na Bahia (Franco, 1969).

De forma geral, o período colonial foi marcado por um silêncio em relação à doença, até 1849, quando foi detectada na Bahia, espalhando-se a seguir ao longo da região litorânea. A doença se tornou uma grande preocupação para as regiões portuárias, e uma grande epidemia ocorreu em 1849, no Rio de Janeiro (Franco, 1969; Benchimol, 1999).

Em São Paulo, a Febre Amarela surgiu nas regiões portuárias de Santos, atingidas por constantes surtos da doença a cada verão desde 1850, quando a doença era trazida por tripulantes dos navios recém-chegados (Franco, 1969; Teixeira, 2001).

No ano de 1889, um surto iniciou-se na cidade de Santos, movendo-se em direção ao oeste do Estado de São Paulo, chegando a Campinas, que foi atingida por sucessivas epidemias em 1889, 1890, 1892, 1896 e 1897 (Ribeiro, 1993). Nos anos 1895 e 1898 foram detectados surtos no município de Araraquara (Teixeira, 2001; Ribeiro, 1993).

Dado a gravidade da doença, foram iniciadas diversas campanhas para erradicar o vetor e assim eliminar a transmissão. Em 1902, em Sorocaba (SP), foi realizado o 1º Combate ao vetor da doença, sob a orientação de Emílio Ribas (Almeida, 2000). No ano seguinte, Oswaldo Cruz iniciou a Campanha

contra a Febre Amarela no Rio de Janeiro. Desde então, após grande esforço e uma ampla campanha de combate ao *Aedes aegypti*, essa espécie foi declarada erradicada do Brasil, na XV Conferência Sanitária Pan-americana, realizada em 1957. Em 1942 relata-se o último caso de Febre Amarela Urbana no Brasil, em Sena Madureira, município do Estado do Acre (Monath, 1988).

No Estado de São Paulo, por sua vez, em 1953 é registrado o último caso de Febre Amarela Silvestre autóctone (Teixeira, 2001), até seu reaparecimento em 2000. Nesse momento, a Febre Amarela Urbana foi erradicada, porém, o vírus já havia encontrado vetores competentes no meio silvestre e novos hospedeiros, retornando a uma característica silvestre.

A Febre Amarela aparentemente retrocedeu sua área de ocupação, permanecendo endêmica na Região Norte do País, onde se passa a relatar casos esporádicos de doença humana e epizootias periódicas, com casos ocasionais na região Centro-Oeste e mais raramente na Região Sudeste (Ministério da Saúde, 2005).

Apesar disso, a Febre Amarela aparentemente vem sofrendo expansão de seu território, podendo-se observar um aumento gradual de casos da doença nas regiões próximas às fronteiras tradicionais, delimitada como zona enzoótica, assim como casos reportados para algumas áreas distantes do território tradicional da doença, como casos nos estados do Rio Grande do Sul (FUNASA, 2005) e Minas Gerais (Filippis et al.,2002) em 2000 e 2001, respectivamente.

A alta mobilidade de população humana susceptível em regiões de transmissão, uma cobertura vacinal variável em grande parte do território e a extensa distribuição do *Aedes aegypti* no país (Vasconcelos, 2002) representam um risco real para a reurbanização da Febre Amarela.

No ano 2000 foram registrados 2 casos autóctones de Febre Amarela Silvestre no Estado de São Paulo (Rocco et al. 2003). Em 2003, o Ministério da Saúde implantou a vigilância de epizootias a partir da notificação de morte de macacos.

O ano de 2007 transcorreu com características de endemicidade para Febre Amarela Silvestre até meados de Dezembro, quando casos da doença começaram a ser detectados. No período foram registrados seis casos humanos e notificadas mortes de primatas não humanos em 73 localidades de 9 estados brasileiros, com maior concentração na região Centro Oeste (DATASUS 2008). No Estado de São Paulo foram registrados na área de transição para Febre Amarela 140 macacos mortos no período de Janeiro a Junho de 2008, com pelo menos 4 isolamentos de Febre Amarela a partir de indivíduos de *Alouatta* sp (Moreno et al., 2008, 2013). Ainda foram detectados 10 casos humanos confirmados, sendo 2 autóctones e 8 importados (Moreno et al., 2008). Os casos autóctones, provenientes dos municípios de Luís Antônio e área rural de São Carlos, divisa com o município de Rincão, encontraram-se associados à mesma região florestada da reserva ecológica estadual de Jataí (Moreno et al., 2008).

No ano seguinte, entre Fevereiro e Abril de 2009, foram confirmados 28 casos da doença no Estado de São Paulo, sendo 11 com evolução para o óbito, e todos fora da área de recomendação de vacinação contra Febre Amarela, delimitada em 2008. Os locais prováveis de infecção (LPI) foram os municípios de Avaré, divisa com Itatinga, Sarutaiá, Piraju, Tejupá e Buri, onde houve associação com atividades de lazer e/ou trabalho em área rural (Secretaria de Estado da Saúde, 2009).

Na mesma época, após o início da campanha extensiva de vacinação, foram notificados 3 casos confirmados de doença viscerotrópica aguda e 2 casos prováveis. Foram ainda identificados 2 casos de meningite linfomonocitária e 1 caso de reação de hipersensibilidade imediata pós-vacinal no período entre Outubro de 2008 e Agosto de 2009 (Secretaria de Estado da Saúde, 2009). A ocorrência destes eventos alertou o sistema de vigilância quanto à necessidade de se desenhar um esquema de vacinação mais adequado.

Ainda no período, foi possível isolar o vírus da Febre Amarela de um mosquito *Haemagogus leucocelaenus*, sendo este o primeiro isolamento em mosquito vetor da Febre Amarela no Estado de São Paulo (Souza et al., 2011).

1.4. FATORES DETERMINANTES DA DISTRIBUICÃO GEOGRÁFICA ATUAL DA FEBRE AMARELA

Os padrões de atividade viral na África e na América do Sul são bastante diferentes. No continente Africano, ocorrem epidemias regulares, no meio rural e urbano, enquanto na América do Sul, a última grande epidemia urbana associada ao vetor *Aedes aegypti* ocorreu em 1928 no Brasil (Soper, 1977). Desde então, casos esporádicos, no Brasil (Figueiredo, 2000), Trinidad (Monath, 1988) e Bolívia (Van der Stuyft et al., 1999), representam a circulação urbana da Febre Amarela.

Por sua vez, a atividade epizoótica tem ocorrência regular em áreas de florestas neotropicais, com repercussões ocasionais em populações humanas em zonas rurais circundantes. Estas epizootias parecem ser de natureza cíclica, ocorrendo aproximadamente a cada 5 – 10 anos, em uma determinada área geográfica (Vasconcelos et al. 2001a).

A mais recente epizootia de Febre Amarela inciou-se em 2007 e atingiu a Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela e Trinidad (Paho, 2009). O aparecimento destas epizootias é sinalizado pela notificação de primatas não humanos mortos em áreas florestadas. A maioria dos primatas do Novo Mundo são altamente suscetíveis à infecção pela Febre Amarela com alta letalidade, especialmente nos primatas do gênero *Alouatta.* Evidências recentes indicam inclusive que a circulação da Febre Amarela representa um risco pertinente à conservação desses primatas em vida livre, principalmente em regiões onde

suas populações foram fragmentadas pelo avanço da agricultura e pecuária (Holzmann et al., 2010).

Tem-se sugerido que a periodicidade observada nas epizootias deve-se ao tempo necessário para a renovação do estoque de suscetíveis na população de primatas não humanos (Chippaux, 1995; Vasconcelos et al., 1997b). No entanto, não se tem certeza de como o vírus da Febre Amarela sobrevive durante períodos interepizoóticos. Bryant et al. (2003) destaca quatro possibilidades: a primeira, a de Epizootias Errantes que movem-se continuamente em toda a Amazônia entre populações suscetíveis (Bryant et al., 2003). Uma segunda possibilidade seria a manutenção de Infecção Persistente em algumas espécies de primatas. No entanto, esta hipótese pode não ser efetivamente possível, visto que os níveis de viremia mantidos, de forma persistente, parecem não ser suficientes para infectar vetores (Penna & Bittencourt, 1943; Xie et al., 1998).

Uma terceira possibilidade seria a manuenção do vírus pela Transmissão vertical ou transovariana em mosquitos, evento já relatado na América do Sul para *Haemagogus* (Dutary & LeDuc, 1981). Outra evidência que reforça esta possibilidade foi o isolamento do vírus em fêmeas nulíparas de *Haemagogus janthinomys* (Mondet et al., 2002). Sall et al. (2009) sugere que a baixa taxa evolutiva observada para vírus da Febre Amarela quando comparada a taxa evolutiva do vírus da Dengue pode ser uma consequência direta da transmissão vertical, visto que o vírus passaria por um período quiescente, com abaixa atividade. Por fim, ainda existe a possibilidade da

existência de ciclos de manutenção alternativos, ainda não descritos ou pouco conhecidos, com a participação de vertebrados ou vetores não descritos até o momento.

É possivel ainda que dois ou mesmo todos os fatores possam estar associados a manutenção do vírus e os cenários provavelmente variam de local para local. Um acompanhamento mais efetivo visando o controle da Febre Amarela depende do desenvolvimento de programas específicos apropriados as situaçãoes locais de transmissão e manutenção do vírus.

A ocorrência de um aumento gradual na circulação silvestre do vírus da Febre Amarela além das fronteiras tradicionais da zona enzoótica, como os relatados nos estados do Rio Grande do Sul (Vasconcelos et al. 2003), e em Minas Gerais em 2000 e 2001 (Filippis et al., 2002), foi indicada como possivelmente associada à alta mobilidade dos seres humanos sensíveis nas regiões onde a Febre Amarela é endêmica (de Souza et al., 2010; Auguste et al., 2010). Tais movimentações associadas ao trânsito de seres humanos pode contribuir com a introdução do vírus no ambiente urbano e seu deslocamento amplo para novas áreas não interligadas (de Souza et al., 2010; Auguste et al., 2010). No entanto, o exato mecanismo ou evidências diretas deste transporte não foram ainda divulgadas. Como o vírus da Febre Amarela circula em várias regiões do Brasil, a presença do *Aedes aegypti* pode ser considerada uma ameaça real para a reurbanização da doença.

Os estudos moleculares epidemiológicos revelaram que as cepas isoladas de Febre Amarela na África e na América do Sul são geneticamente distintos. Na África, cinco genótipos foram identificados: os genótipos Oeste Africano I e II, o genótipo Leste Africano, no leste, o genótipo Centro Africano e o genótipo Angola (Wang et al., 1996; Mutebi et al., 2001).

Na América do Sul, dois genótipos foram registrados: o genótipo da América do Sul I, que inclui cepas isoladas do Brasil, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela e Trinidad, e o genótipo América do Sul II, incluindo os vírus isolados principalmente no Peru (Wang et al., 1996).

Recentemente, Vasconcelos et al. (2004) analisaram a diversidade genética de várias cepas de Febre Amarela isoladas ao longo dos últimos 67 anos no Brasil. Eles mostraram que, com exceção de uma cepa de 1983, que pertence ao genótipo América do Sul II, todas as demais amostras que circularam no Brasil de 1935 a 2001 estão agrupadas no genótipo América do Sul I. Há duas subclasses dentro da clade principal composto do Sul genótipo Americano I. Um subclado contém cepas isoladas do Pará, de 1954 até 1968, e o segundo maior subclado é formado por linhagens que circularam de 1969 a 2001.

A hipótese de que o vírus da Febre Amarela tenha evoluído na África antes da sua introdução na América do Sul foi reforçada por um estudo recentemente publicado por Bryant et al. (2007). Este estudo sugere que as cepas de Febre Amarela que circulam surgiram na África nos últimos 1.500

anos e surgiram nas Américas cerca de 300 – 400 anos atrás, como uma consequência do tráfico de escravos. Após sua introdução, o vírus teve sua propagação para o oeste, e fixou-se nas florestas em ciclos enzoóticos (Bryant et al. 2007).

A epizootia de 2008, que foi associada ao aparecimento de casos humanos foi associada a uma linhagem nova, detectada dentro do genótipo I da América do Sul (de Souza et al., 2010). Estes resultados indicam que apesar de sua circulação antiga já ser conhecida, o vírus da Febre Amarela continua a evoluir e diversificar-se.

1.5. ECOLOGIA DA FEBRE AMARELA SILVESTRE NA AMÉRICA DO SUL.

Os dois componentes principais da ecologia da Febre Amarela silvestre são os mosquitos e os primatas não humanos. Os fatores ecológicos que influenciam essas populações atuam diretamente na ocorrência da Febre Amarela.

Os mosquitos são os reservatórios naturais do vírus da Febre Amarela (Hervé et al., 1986). Para a Febre Amarela Silvestre, no Brasil, destacam-se quatro espécies com capacidade de desempenhar um papel importante na ecologia da Febre Amarela, o *Haemagogus janthinom*ys, *Haemagogus* leucoce*laenus, Sabethes Chloropterus, e o Haemagogus albomaculatus* (Hervé et al., 1986).

Diversas características do ciclo biológico dos mosquitos e de seu comportamento e ecologia os tornam excelentes vetores e reservatórios. O período virêmico é curto nos primatas, durando de 3 – 6 dias, ao passo que os mosquitos, após infecção, podem manter o vírus por meses, tendo sido recuperado experimentalmente sessenta dias após o repasto infectante, mantendo a capacidade de transmitir o vírus durante toda sua vida (Hervé et al., 1986).

Com relação à reprodução, as fêmeas de *Haemagogus,* após repasto sanguíneo, depositam seus ovos nas paredes de ocos de árvores e de bambus cortados. Os ovos ficam aderidos até serem submergidos pela água acumulada nos criadouros pela chuva, quando então as larvas eclodem e se desenvolvem rapidamente (Foratini, 1965, Ministério da Saúde, 2005).

A resistência dos ovos de *Haemagogus* à dissecação permite aos mesmos se manterem em diapausa durante períodos muito longos, o que oferece outra vantagem adaptativa ao vírus (Hervé et al., 1986). A transmissão transovariana, embora evento raro, já foi demonstrada ocorrendo naturalmente tanto em *Aedes* como em *Haemagogus*, a partir do isolamento viral obtido em machos de mosquitos ou de fêmeas nulíparas (Hervé et al., 1986).

Os mosquitos ainda podem apresentar um papel disseminador visto que *Haemagogus janthinomys* pode percorrer mais de onze quilômetros e o *Haemagogus leucocelaenus,* quase seis quilômetros (Hervé et al., 1986).

Fatores como a longevidade dos mosquitos, que pode ser surpreendentemente elevada, ou sua taxa de sobrevivência, os tornam importantes reservatórios e excelentes vetores (Hervé et al., 1986). Sabe-se por exemplo que cerca de 1% das fêmeas de uma dada população de *Haemagogus janthinomys* ultrapassam a idade de três meses (Hervé et al., 1986).

Na região Sul e Sudeste do Brasil, *Haemagogus. leucocelaenus* aparenta ser o vetor de Febre Amarela. A espécie já foi encontrada infectada no Rio Grande do Sul (Vasconcelos et al. 2003) e em São Paulo (Souza et al., 2011).

O comportamento das espécies de *Haemagogus* tem sido descrito como oportunista, explorando múltiplas fontes de alimento, com hábitos primatofílicos e ornitofílicos mais destacados, mas não exclusivos (Alencar et al., 2008).

De forma geral, os *Haemagogus* são mosquitos primariamente acrodendrófilos (Foratini, 1965), mas adaptáveis frente aos ambientes antropizados, apresentando uma estrutura de estratificação das populações das diferentes espécies de *Haemagogus* (Pinto et al., 2009). *Haemagogus leucocelenus* é uma espécie freqüente no solo das matas da Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil, principalmente nos meses de chuvas mais intensas (Pinto et al., 2009), enquanto *Haemagogus janthinomys* ocupa a copa e os estratos mais elevados.

A freqüência relativamente baixa da doença em humanos e a natureza episódica de epizootias podem ser associadas a uma possível menor competência vetorial de *Haemagogus leucocelaenus* em comparação ao *Haemagogus janthinomys*, o principal vetor de Febre Amarela (Souza et al., 2011). No entanto, são necessários mais estudos para compreender adequadamente o papel dos mosquitos na transmissão da Febre Amarela, principalmente nas regiões extra amazônicas.

Outro componente ecológico da Febre Amarela são os primatas não humanos. De forma geral, as espécies com ocorrência para a América do Sul, são susceptíveis ao vírus da Febre Amarela. As espécies mais freqüentemente implicadas pertencem ao gênero *Alouatta, Cebus e Callithrix* (Hervé et al., 1986).

A resposta à infecção pelo vírus vária de acordo com a espécie, mas geralmente desenvolvem doença com alta mortalidade, marcadamente *Alouatta*, onde a circulação epizoótica do vírus pode representar inclusive uma preocupação em relação a sua conservação (Holzmann et al., 2010, De Almeida et al., 2011; Fialho et al., 2012, Moreno et al., 2013). *Cebus* aparentemente é mais resistente, com o encontro de anticorpos indicando indivíduos sobreviventes a infecção (Lima et al., 2010).

Nos primatas a viremia varia entre 2 – 6 dias. Este curto período virêmico, e o desenvolvimento de imunidade permanente ou morte após a infecção tornam os primatas não humanos hospedeiros pouco adequados para

atuarem como reservatório do vírus. Seu papel no entanto seria de um amplificador, visto que cada primata infectado poderia servir de repasto a um grande número de mosquitos, o que por sua vez, mesmo considerando o curto período virêmico, aumentaria efetivamente a população de mosquitos infectados, intensificando a circulação do vírus (Hervé et al., 1986).

Outro papel atribuído aos primatas seria o de disseminador, visto seu potencial de carregar o vírus por um vasto território (Hervé et al., 1986). No entanto, a intensa degradação ambiental e a territorialidade naturalmente demonstrada dos bandos de primatas limitam esta ação.

Apesar disso, é estratégico compreender a dinâmica da circulação do vírus nos primatas e sua ocorrência, tanto como um mecanismo para mapear a circulação viral, como para compreender sua evolução e ecologia. Esse conhecimento é necessário para a correta seleção das estratégias de vacinação a serem aplicadas.

Dado a sensibilidade dos primatas à infecção pela Febre Amarela, principalmente *Alouatta*, o monitoramento dessas populações fornece um sinalizador seguro da circulação viral, sendo importante para que as ações de vigilância e controle sejam acionadas de forma efetiva e rápida.

1.6. FILOGENIA BAYESIANA, FILODINÂMICA E FILOGEOGRAFIA

O presente estudo busca elucidar as relações de isolados brasileiros da Febre Amarela e compreender os fatores que possam estar associados à distribuição geográfica na América do Sul. Para tanto, utilizamos a metodologia filogenética para acessar relações evolutivas no tempo e espaço.

Filogenética é o estudo das relações evolutivas entre grupos de organismos. Nesta metodologia, o processo evolutivo é reconstruído a partir de dados de sequências moleculares e/ou matrizes de dados morfológicos obtidos a partir dos organismos estudados. A evolução pode ser considerada um processo de ramificação, em que as populações dividem-se em ramos separados ao longo do tempo, hibridizando-se, ou extinguindo-se (Lemmey et al., 2009).

O processo evolutivo pode ser representado, dentro desta metáfora de ramificação, por uma árvore filogenética, que trata-se de uma representação gráfica do processo evolutivo, desenvolvido a partir das matrizes de caracteres de dados aplicando-se um modelo matemático específico (Lemmey et al., 2009).

Existem muitas abordagens diferentes para a construção de uma árvore filogenética. Os métodos mais comuns são: a parcimônia, máxima

verossimilhança e a Inferência Bayesiana. Todos dependem da aplicação de modelos matemáticos que descrevam a evolução dos caracteres selecionados para estudo.

Por se tratar de uma análise estatística de relação entre dados, não há nenhuma maneira de medir se uma hipótese filogenética é precisa ou não, a menos que as verdadeiras relações entre a táxons examinados já sejam conhecidas, o que é um evento extremamente difícil de ocorrer para a grande maioria dos organismos. O grau de confiabilidade de uma dada árvore filogenética é mensurado pelo grau de suporte dos ramos determinado pelo modelo matemático aplicado (Lemmey et al., 2009).

Os métodos de inferência filogenética buscam selecionar a melhor árvore de acordo com critérios de otimização (máxima verossimilhança, máxima parcimônia) ou por algoritmo de agrupamento (métodos de “neighbor-joining” ou de distância). A incerteza pode então ser avaliada por um procedimento subsequente, tal como o “bootstrap” (Lemmey et al., 2009).

A técnica leva em consideração, por exemplo a reamostragem de dados dentro do conjunto de dados gerais, a repetição da análise e comparação com o resultado original. O valor expresso de “Bootstrap” pode ser considerado como uma representação do número de vezes que aquele resultado em questão foi recuperado, considerando um certo número de reamostragens.

Desta forma, um “bootstrap” elevado significa uma análise precisa e robusta, já que os dados, quando re-amostrados e re-analizados, produziram o mesmo resultado diversas vezes. Muitas vezes o “bootstrap” é normalizado e apresentado em termos de porcentagem (Lemmey et al., 2009).

Em contraste, a abordagem Bayesiana para a reconstrução filogenética expressa a incerteza da filogenia e os parâmetros do modelo de substituição com uma distribuição de probabilidades posteriores. A inferência Bayesiana é um método de inferência na qual o Teorema de Bayes é utilizado para atualizar a estimativa de probabilidade para uma hipótese como prova adicional conforme novos dados são agregados ao modelo (Lemmey et al., 2009).

A filogenética tornou-se uma ferramenta essencial para a compreensão de variação dentro de sequências gênicas. Recentemente, um enorme progresso foi feito no desenvolvimento de métodos de inferência filogenética que estimem com mais precisão a data de divergência entre as sequências analisadas (Lemmey et al., 2009).

Os modelos recentes de estudos filogenéticos incluem a aplicação de um relógio molecular. O relógio molecular é uma técnica que usa restrições fósseis e taxas de variação molecular para deduzir o tempo na história geológica da relação filogenética entre organismos. Ele é utilizado para estimar o tempo de ocorrência de eventos como a especiação. Os dados moleculares utilizados para tais cálculos são geralmente sequências gênicas e a taxa de substituição de nucleotídeos ao longo do tempo.

Um número significativo de abordagens estatísticas foram desenvolvidas, incluindo técnicas de máxima verossimilhança e modelagem Bayesiana (Lemmey et al., 2009). Em particular, os modelos que têm em conta a variação da taxa entre linhagens têm sido propostos a fim de obter melhores estimativas dos tempos de divergência. Estes modelos são chamados relógios moleculares relaxados (Lemmey et al., 2009).

Os estudos filogenéticos podem acessar não só informações referentes a linha de tempo dos eventos evolucionários, mas também em relação a uma área geográfica. A filogeografia é o estudo dos processos históricos que podem ser responsáveis pela atual distribuição geográfica das espécies e populações (Avise, 2000, Knowles, 2002). De forma geral, a filogeografia busca descrever os eventos históricos e expansão das populações, recuperando a ocorrência de gargalos populacionais, eventos de vicariância ou mesmo o efeito das migrações (Avise, 2000, Knowles, 2002).

Abordagens recentemente desenvolvidas buscam integrar a estes modelos a teoria coalescente ou a história genealógica dos alelos (Lemmey et al., 2009). A teoria coalescente é um modelo retrospectivo de genética de populações. Ele tenta rastrear a ocorrência de todos os alelos de um determinado gene presentes em uma população, supondo-se a existência de uma única cópia ancestral, conhecida como o ancestral comum mais recente (MRCA). As relações de herança entre alelos são representadas como uma genealogia, semelhante na forma a uma árvore filogenética. Esta genealogia é conhecida como coalescente (Lemmey et al., 2009).

Devido à sua taxa de mutação rápida e tempo de geração rápido, os vírus são excelentes modelos para estudar a dinâmica do processo evolutivo no tempo e espaço e entender o processo evolutivo em um nível populacional (Holmes, 2004; Kühnert et al., 2011). A filogeografia é uma ferramenta útil na compreensão das origens e distribuições de diferentes cepas virais. A abordagem filogeográfica tem sido aplicada para muitas infecções virais que ameaçam a saúde humana, incluindo a dengue, raiva, Influenza e HIV (Holmes, 2004; Kühnert et al., 2011).

1.7. COALESCÊNCIA

A teoria da coalescência propõe um modelo retrospectivo a fim de estudar genética de populações em um contexto histórico - temporal. O coalescente retrocede os modelos de deriva genética no tempo para investigar a genealogia de antecedentes e suas relações (Hein & Wiuf, 2004).

No caso mais simples, a teoria coalescente assume a não existência de recombinação, nenhuma seleção natural, e inexistência de fluxo de genes ou de estrutura da população. Uma população ideal seria pontuada por uma evolução neutralista (Hein & Wiuf, 2004).

Através da reconstrução dos relacionamentos ancenstrais, tenta-se rastrear todos os alelos de um determinado gene compartilhado por todos os membros de uma dada população até sua uma única cópia ancestral, conhecido como o ancestral comum mais recente ou MRCA (Hein & Wiuf,

2004). O ancestral comum mais recente (MRCA) de qualquer conjunto de organismos é o indivíduo mais recente do qual todos os organismos do grupo são descendentes diretos (Hein & Wiuf, 2004).

As relações de herança entre alelos ou genes normalmente são representados como uma genealogia, semelhante na forma a uma árvore filogenética, construida através de modelos matemáticos semelhantes aos utilizados na construção de arvores filogenéticas. Estas genealogias de genes são também conhecidas como coalescente (Hein & Wiuf, 2004).

A teoria da coalescência também permite o cálculo empírico do tamanho efectivo da população (Ne), uma medida referente a diversidade genética e variabilidade, e normamente não relacionada ao tamanho real da população em número de indivíduos. O tamanho efetivo da população é geralmente estimado como a diversidade genética dividida pela taxa de mutação (Hein & Wiuf, 2004) e pode ser representado ao longo do tempo em gráfico que permite acompanhar sua variação.

1.8. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO

A modelagem de nicho ambiental, também conhecida como modelagem de distribuição de espécies, ou modelagem de nicho ecológico, refere-se ao processo de utilização de algoritmos de computador para prever a distribuição de espécies no espaço geográfico, com base em uma representação matemática da distribuição conhecida no espaço ambiental (Lozier et al., 2009).

A partir dessa proposta, aplicamos esta metodologia a fim de testar hipoteses em relação a quais fatores bióticos e abióticos poderiam estar influenciando a ocorrência da Febre Amarela

Modelos de nicho ecológico usam dados de ocorrência em conjunto com dados ambientais para fazer um modelo correlativo das condições ambientais que atendam aos requisitos ecológicos de uma espécie, e prever a adequação relativa dos habitats (Peterson et al., 2006; Lozier et al., 2009).

O ambiente é, na maioria dos casos, representado por dados climatológicos (tais como temperatura e precipitação), mas outras variáveis tais como o tipo de solo, profundidade da água, cobertura do solo, vegetação, altitude, hidrografia podem também ser utilizados (Phillips et al., 2006).

A natureza, complexidade e a precisão dos modelos utilizados irá determinar se os dados modelados refletem a distribuição real das espécies. Neste caso, é de fundamental importância a qualidade dos dados disponíveis em camadas ambientais e a disponibilidade de dados de distribuição geográfica de espécies suficientes e viáveis para o uso (Lozier et al., 2009).

Modelos de Nichos Ecológicos são mais frequentemente utilizados para estimar a adequação relativa de habitat conhecido por ser ocupada pela espécie ou para estimar mudanças na adequação de habitat ao longo do tempo dado um cenário específico para a mudança ambiental (Phillips et al., 2006, Carnaval et al., 2008). O método pode também ser usado para estimar a

aptidão relativa de habitat em áreas geográficas que não são conhecidas por serem ocupados pela espécie, e assim ser capaz de prever a ocorrência de determinadas espécies em novas áreas (Peterson et al., 2006).

Uma das ferramentas mais utilizadas para este fim é o algorÍtimo Maxent (Phillips et al. 2006). Maxent utiliza o princípio da entropia máxima na presença apenas de dados para estimar um conjunto de funções que se relacionam com variáveis ambientais e adequação do habitat, a fim de aproximar o nicho de espécies e distribuição geográfica potencial (Phillips et al. 2006).

Os modelos de distribuição gerados a partir dos dados, embora produzam resultados muitas vezes acurados de distribuição, devem ser criteriosamente analizados, principalmente no tocante aos dados utilizados para a construção do modelo (Lozier et al., 2009). Uma fonte potencial de erro em dados publicamente disponíveis, e que podem afetar a precisão dos modelos de nicho ecológico, e muitas vezes, difícil de corrigir, é a sistemática incompleta ou mesmo incorreta (Lozier et al., 2009).

É necessário, na construção do modelo, uma avaliação cuidadosa dos registros da base de dados antes de serem utilizados em modelagem, especialmente quando a presença de espécies crípticas é suspeita ou quando muitos registros são baseados em evidência indireta.

O uso da Modelagem de Nicho Ecológico tem se ampliado recentemente em diversas áreas (Peterson, 2006). Inclusive, a metodologia tem sido utilizada para estudar sistemas de transmissão de doenças no ponto de vista da Saúde

Pública e Epidemiologia, interessados em compreender a Ecologia das Doenças. Em muitos casos, os detalhes dos parâmetros ecológicos associados com a ocorrência de doenças ou de espécies que participam na transmissão da doença (por exemplo, vetores, hospedeiros, patógenos) podem não ser claros devido ao pequeno número de amostras, elaboração de relatórios parciais, ou simplesmente pela falta de informação geográfica detalhada ou análise ecológica ampla. Estudos que buscam acessar tais informações já foram realizados previamente abordando por exemplo, vetores da doença de Chagas no Brasil (Costa et al., 2002) ou a caracterização ecológica de focos de Febre Hemorrágica causada pelos vírus Ebola e Marburg (Peterson et al., 2004a,b, 2006). Estudos envolvendo hantavírus na Ásia (Wei et al., 2011) e América do Sul, (Donalisio et al., 2011) já foram realizados, assim como um estudo da distribuição continental da Encefalite Japonesa na Ásia e Oceania (Miller et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESES E OBJETIVO GERAL

Observou-se uma rápida movimentação e disseminação da Febre Amarela durante os últimos anos. É possível que fatores ambientais, geográficos e temporais possam estar influenciando a evolução e ecologia do vírus.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a circulação da Febre Amarela no contexto evolutivo, ecológico e geográfico, avaliando os possíveis fatores que possam estar influenciando esta dinâmica na América do Sul a partir dos eventos recentes de epizootias e epidemias detectadas entre 2008 e 2009.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1 - Estabelecer as relações filogenéticas entre os isolados brasileiros do vírus da Febre Amarela, tanto no contexto recente, como em relação à circulação histórica do vírus, e estimar as taxas de evolução e do tempo de emergência e divergência entre os subtipos de Febre Amarela.

2 – Descrever a estrutura da população do vírus da Febre Amarela, considerando diversos modelos de crescimento demográfico em suas áreas de circulação.

3 – Reconstruir a cadeia de transmissão da Febre Amarela na América do Sul, no tempo e espaço, considerando a provável influência das populações humanas, primatas não humanos e mosquitos.

4 – Avaliar fatores ambientais e possíveis fatores de pressão seletiva que estejam atuando na população do vírus da Febre Amarela, tanto no contexto ambiental ecológico como no de sua dinâmica populacional.

3. METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM E SELECÃO DE SEQUÊNCIAS VIRAIS

Foram utilizadas cepas de Febre Amarela detectadas entre 2008 e 2009 e mais três de infecção de seres humanos detectados em 2000 e 2004 no Brasil. As amostras geradas para este estudo estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Origem das cepas virais de Febre Amarela utilizadas nesse estudo

Cepa	Número de Acesso GenBank		Estado/Ano[a]	Fonte
	Pr/M	3'UTR		
SPH188002	FJ875515	FJ875521	SP/2000	Humano
SPH188057	FJ875516	FJ875522	SP/2000	Humano
SPH258595	FJ875517	FJ875523	AM/2004	Humano
SPH287923	Nd	FJ875524	MT/2008	Humano
SPH287992	Nd	FJ875525	MS/2008	Humano
SPH288116	Nd	FJ875526	GO/2008	Humano
SPH288294	Nd	FJ875527	GO/2008	Humano
SPAn288183	FJ875518	FJ875528	SP/2008	PNH
SPAn288184	FJ875519	FJ875529	SP/2008	PNH
SPAn289562	Nd	FJ875530	SP/2008	PNH
SPAn289568	FJ875520	FJ875531	SP/2008	PNH
SPAr303739	Nd	b	Buri/SP/2009	*Hg. leucocelaenus*

[a] SP, São Paulo; AM, Amazonas; MT, Mato Grosso; MS, Mato Grosso do Sul;GO, Goiás/ Ano de isolamento. [b] GenBank não enviada.
PNH: Primata não humano

3.2. ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CAMUNDONGOS

Amostras de sangue/soro humano, necropsia de macacos e humanos e mosquitos foram submetidos à tentativa de isolamento viral em camundongos Swiss, de 1 a 3 dias de idade.

Fragmentos de necropsia de macacos e de humanos foram homogeneizados para o preparo de suspensões para inoculação: suspensão de fígado, de cérebro, baço e pool de vísceras (rins, pulmões e coração). Cada suspensão foi inoculada separadamente em leitos de camundongos (1 mãe + 6 filhotes). Na disponibilidade de amostras de sangue ou soro, essas amostras foram inoculadas separadamente, tanto puras como diluídas (50% em solução de albumina bovina a 0,75).

Mosquitos coletados no mesmo local, na mesma data e horário foram processados em grupos - *pools.* Cada *pool* foi constituído de 1 até 50 indivíduos, todos da mesma espécie ou, em casos em que a definição da espécie não é possível, constitui-se o *pool* com espécimes do mesmo gênero.

Fragmentos de tecido e mosquitos foram macerados e suspensos em solução de albumina bovina 0,75% e 1,8%, respectivamente. Após centrifugação (3000 rpm para suspensões de tecidos e 10000 rpm para suspensões de mosquitos) o sobrenadante foi separado para inoculação. Cada suspensão foi inoculada, via intracerebral, em 6 camundongos lactentes na

dose de 0,02 ml/camundongo. Os animais foram observados por período de 14 dias.

Camundongos que apresentaram sinais de doença (paralisia dos membros posteriores, tremores, prostração) tiveram seus cérebros colhidos e submetidos a passagens subseqüentes (Beaty et al.,1989; Travasssos da Rosa et al.,1994).

3.3. ISOLAMENTO DE VÍRUS EM CULTURA DE CÉLULAS

As mesmas suspensões preparadas para isolamento em camundongos foram submetidas à tentativa de isolamento viral em cultura de células.

Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi inoculada em tubos semeados com cultura de células de mosquitos *Aedes albopictus*, clone C6/36 (Igarashi, 1978). As células foram semeadas em tubos de ensaio 24 horas antes, em 1 ml de meio Leibovitz (L-15), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fosfato, 10% de soro bovino fetal (SBF) e antibióticos. No dia da inoculação foi acrescentado 1 ml de meio L-15 sem soro em cada tubo. Os tubos foram incubados por 9 dias a 28° C e então agitados e centrifugados por 5 minutos. Os sobrenadantes foram guardados em tubos de hemólise a –70° C. As células foram o ressuspendidas em PBS pH 7.5 e depositados em lâminas com 12 orifícios paralelos para o teste de imunofluorescência indireta, seguindo a técnica padronizada por GUBLER et al.,(1984), utilizando anticorpo policlonal anti-flavivírus para Dengue,

produzidos no Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz e imunoglobulina anti-camundongo conjugada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA). As amostras positivas para flavivírus foram identificadas, também por imunofluorescência, com anticorpos monoclonais para Febre Amarela (Centers for Disease Control and Prevention).

3.4. EXTRACÃO DE RNA, PCR E SEQUENCIAMENTO

O RNA viral foi extraído a partir do soro de pacientes infectados ou fluido sobrenadante de células C6/36 infectadas com o QIAmp Viral RNA Extraction Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração do RNA viral do cérebro e do fígado de camundongos lactentes, infectados com o tecido da autópsia de primatas não humanos, foi utilizado o QIAmp Sangue Viral RNA Extraction Kit. A RT–PCR foi realizada em RNA viral purificada com o SuperScriptTM – step RT – PCR com PlatiniumR Sistema Taq (Invitrogen / Life Technologies, Carlbad, CA). Utilizamos primers descritos por Jennings et al. (1994) desenhados para amplificar um fragmento de 670 pb, cobrindo a região da junção prM/E genômico de Febre Amarela.

O segundo conjunto de estudos centrados na região 3'NCR utilizou primers universais para Flavivirus EMF1 e VD8 descrito por Pierre et al. (1994) para amplificar um fragmento do genoma da Febre Amarela compreendendo a parte distal do gene NS5 ao final do elemento CS2 localizado na região 3'NCR que corresponde à sequência de nucleotídeos complementares VD8.

Os parâmetros utilizados para a amplificação da junção prM/E e sequências 3'NCR foram as descritas por Jennings et al. (1994) e Deubel et al. (1997), respectivamente. Os produtos amplificados foram sequenciados diretamente usando a "ABI PrismR Big DyeM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, na presença dos primers utilizados na amplificação. As sequências foram determinadas usando o sequenciador ABI 377 (PE Applied Biosystems).

Sequências determinadas no estudo foram depositadas no GenBank, com exceção da sequência SPAr303739, referente ao vírus isolado em mosquitos Hg. Leucocelaenus em Buri, SP, que aguarda envio.

3.5. ALINHAMENTO E CONSTRUCÃO DAS DATABASES

O alinhamento das sequências foi realizado manualmente, utilizando o software BioEdit (Hall, 1999).

Os genes selecionados foram analisados em separado, cada um produzindo resultados específicos. Após uma análise inicial, tendo se constatado a ausência de evidências de recombinação ou reassortamento genético, a mesma análise foi realizada para as sequências concatenadas dos fragmentos.

Tabela 2 - Cepas virais de Febre Amarela retiradas do GenBank, utilizadas nesse estudo

Isolado	Sequencia ID	Origem/Ano de isolamento	Fonte	GenBank no.	
				Junção prM/E	3'NCR
JSS	Brazil35	Brazil/1935	Humano	-	U52390
BeH111	Brazil54	Brazil/1954	Humano	AY540437	AY541335
BeAn23536	Brazil60	Brazil/1960	Cebus spp.	AY540441	AY541338
BeAr44824	Brazil62	Brazil/1962	Haemagogus spp.	AY540443	AY541340
BeH203416	Brazil71	Brazil/1971	Humano	AY540449	AY541344
BeAr233436	Brazil73A	Brazil/1973	Haemagogus spp.	AY540452	AY541347
BeH233393	Brazil73B	Brazil/1973	Humano	Y540453	AY541348
BeH350698	Brazil78	Brazil/1978	Humano	-	AY541352
BeH379501	Brazil80	Brazil/1980	Humano	AY540456	AY541358
BeH413820	Brazil83	Brazil/1983	Humano	AY540457	AY566273
BeH 425381	Brazil84A	Brazil/1984	Humano	AY540458	-
BeAr424492	Brazil84B	Brazil/1984	Hg. janthinomys	-	AY541366
BeH422312	Brazil84C	Brazil/1984	Humano	-	AY541369
BeAr 424083	Brazil84D	Brazil/1984	Hg. albomaculatus	AY540459	-
BeH511843	Brazil91	Brazil/1991	Humano	AY540461	AY541377
BeAr512943	Brazil92A	Brazil/1992	Hg. janthinomys	AY540463	AY541379
BeH512772	Brazil92B	Brazil/1992	Humano	AY540465	AY541381
BeAr527198	Brazil94	Brazil/1994	Haemagogus spp.	AY540469	AY541387
BeH 535010	Brazil95	Brazil/1995	Humano	AY540471	-
BeAr 544276	Brazil96A	Brazil/1996	Hg. janthinomys	AY540472	-
Tennessee	Brazil96B	Brazil/1996	Humano	AY540473	-
BeAn604552	Brazil98A	Brazil/1998	Alouatta belzebul	-	AY541394
BeH603325	Brazil98B	Brazil/1998	Humano	-	AY541397
BeH605427	Brazil98C	Brazil/1998	Humano	-	AY541398
BeAr614320	Brazil99	Brazil/1999	Haemagogus spp.	-	AY541399
BeAR628124	Brazil00A	Brazil/2000	Hg. janthinomys	AY540436	AY541328
BeAr630768	Brazil01A	Brazil/2001	Hg. janthinomys	-	AY541332
BeAr631464	Brazil01B	Brazil/2001	Sa. chloropterus	-	AY541333
BeAr645693	Brazil01C	Brazil/2001	Haemagogus sp	-	AY541334
V528A	Colombia79	Colômbia/1979	Humano	AY540475	AY541403
Trinidad79	Trinidad79A	Trinidad/1979	Hg. spegazzini	-	U52420
CAREC 788379	Trinidad79B	Trinidad/1979	Haemagogus	DQ872412	-
1345	Ecuador81	Ecuador/1981	Humano	AY540477	AY541405
OBD 5041	Ecuador97	Ecuador/1997	Humano	AY540478	AY541406
614819	Panama74	Panamá/1974	Humano	AY540479	AY541412
1368	Peru77	Peru/1977	Humano	AY161928	AY541414
1899/81	Peru81A	Peru/1981	Humano	-	U52411
1914	Peru81B	Peru/1981	Camundongo sentinela	AY161933	-
Peru95(153)	Peru95A	Peru/1995	Humano	-	U52407
ARV 0548	Peru95B	Peru/1995	Humano	AY161946	AY541430
03-5350-98	Peru98A	Peru/1998	Humano	AY161948	AY541432
IQT 5591	Peru98B	Peru/1998	Humano	AY161950	AY541434
OBS7687	Bolivia99A	Bolívia/1999	Humano	AY540431	AY541326
OBS8026	Bolivia99B	Bolívia/1999	Humano	AY540434	AY541327
35720	Venezuela98	Venezuela/1998	Humano	AY540489	AY541443

3.6. ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA

A extensão da estrutura geográfica da filogenia da Febre Amarela a partir de sequências da região prM/E e sequências da região 3'NCR foi avaliada com o auxílio do programa Beast, utilizando inferência Bayesiana e gerando árvores de Máximo Credibilidade de Clado (MCC Trees) (Drummond & Ramabut, 2007) aplicando-se análise filogeográfica discreta.

Esta abordagem representou as incertezas em filogenias subjacentes e as inferências sobre todas as árvores plausíveis proporcionando intervalos de confiança de 95% para cada estatística e estimando a incerteza filogenética através da integração de todas as árvores plausíveis. A estrutura geográfica global foi investigada através da atribuição de um estado a cada sequência de caracteres que representa a sua localidade de origem.

A reconstrução Filogeográfica da propagação da Febre Amarela através do tempo e do espaço foi realizada no pacote de software Beast v1.62 (Drummond & Rambaut, 2007), incluindo um modelo de difusão discreta espacial, descrita por Lemey et al. (2009), que pode quantificar a movimentação e variação das linhagens virais entre os locais estudados. Para a análise filogeográfica de cada sequência de Febre Amarela foi atribuído um "estado de caráter" específico com base na sua origem geográfica.

Em duas análises separadas (entre países e entre regiões), consideraremos o movimento entre os países (8 estados de caráter, ou seja,

Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Panamá, Peru, Trinidad e Venezuela) e entre as regiões afetadas com base na localização geográfica e agrupamento dos isolados disponíveis. Para cada taxon incluído nos conjuntos de dados foram atribuídas coordenadas (latitude e longitude) para os respectivos países/regiões.

A metodologia escolhida permitiu estimar as taxas de substituição de nucleotídeos, os tempos de divergência, a difusão espacial e a história demográfica a partir de sequências amostradas de Febre Amarela, considerando a incerteza filogenética resultante tanto da sequência de dados eo processo de difusão espacial.

As análises foram realizadas usando um modelo geral de tempo reversível para reconstrução da coalescência da Febre Amarela e um modelo de relógio molecular relaxado lognormal (Drummond et al., 2006), em modelo populacional *Bayesian Skyline* (BSP) e *Bayesian Skyride* (Drummond et al., 2005).

Para cada análise, foram realizadas três Corridas de Cadeia de Markov Montercarlo, em 10 milhões de gerações, e o resultado analisado em conjunto. Convergência dos parâmetros durante as corridas foram avaliados pelo tamanho efetivo da amostra (ESS), sendo que foram inclusos no estudo apenas resultados em que os valores ESS atingindos estivessem acima de 200, calculadas pelo Tracer 1.5 V (Drummond e Raumbaut, 2007) em todos os paramêtros.

O programa TreeAnnotator, versão 1.6.2 (http://beast.bio.ed.ac.uk), foi utilizado para resumir a distribuição posterior da árvore, e o FigTree, versão 1.3.1 (http://beast.bio.ed.ac.uk), para visualizar as árvore MCC geradas.

3.7. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO

O software de modelagem Maxent 3.2.1 (http://www.cs.princeton.edu/ ~ schapire/MaxEnt/) foi utilizado para modelar a distribuição de *Alouatta* sp, *Cebus* sp, *Haemagogus* sp, com base em localizações geográficas previamente obtidas. O modelo para a ocorrência de Febre Amarela teve como base não apenas os dados ambientais, mas também os mapas gerados em ASCII para distribuição de *Alouatta, Cebus* e o próprio *Haemagogus*.Maxent utiliza um algoritmo de máxima entropia para analisar os valores das camadas em locais ambientais conhecidos de ocorrência da espécie, a fim de estimar a ocorrência de espécies ao longo de uma região geográfica. O modelo usado baseia-se somente em dados de presença e a distribuição é modelada como um mapa da probabilidade estimada (Phillips et al. 2006).

O programa Maxent calcula a importância de cada uma das variáveis ambientais na elaboração de modelos preditivos de distribuição através do teste Jackkniffe que mede a importância de cada variável. O teste Jackkniffe executa o modelo, uma vez com todas as variáveis e, em seguida, de novo, desta vez abandonando cada variável, e em uma terceira corrida, com uma única variável de cada vez. Variáveis são consideradas de importância se produzirem altos valores de ganhos de treinamento quando isoladas no modelo gerado. Uma variável é também importante se o ganho de formação é baixo

quando a variável é removida do modelo. Para validar a precisão do modelo, 25% dos pontos de ocorrência foram coletados aleatoriamente e usados como pontos de teste. Usando várias definições, um conjunto de limiares busca dividir os valores de probabilidade contínua do modelo em "presença ou ausência". Maxent então calcula o valor de *p* baseado na hipótese nula de que pontos de teste serão previstos como "presentes" não sendo portanto melhor do que um modelo aleatório (Phillips et al. 2006). A saída dessa validação é um gráfico comparativo das curvas de teste e treinamento e uma curva onde se considera a probabilidade de 50% de distribuição, representando um limite de uma distribuição que seria completamente aleatória. Para cada curva foi calculado um valor de área abaixo da curva, no original AUC ou "area under the curve", que representa a precisão e confiabilidade do modelo.

3.8. COLETA DE DADOS DE *HAEMAGOGUS* SP

Os mosquitos do gênero *Haemagogus* foram selecionados pelo seu papel como principal vetor de Febre Amarela (Hervé et al., 1976). O conjunto de dados foi montado considerando a ocorrência do gênero, visto que muitas espécies estão associadas com a transmissão da Febre Amarela (Hervé et al., 1976). Para acessar o risco de transmissão no continente sul-americano foi necessário um conjunto de dados amplos, que, caso se limitasse a apenas algumas espécies, certamente poderia empobrecer a análise.

O gênero apresenta características ecológicas semelhantes ao longo de sua distribuição geográfica, o que torna válido uma análise que considere a

distribuição geográfica do gênero (Foratini, 1965). Os pontos de dados geográficos para a distribuição de *Haemagogus* foram obtidos a partir dos dados do portal GBFI (http://www.gbif.org/). 145 registros de presença foram usados para treinamento e 48 para teste do modelo. Os pontos foram obtidos através do banco de dados do portal GBFI dos Instituto de Ciencias Naturales, http://data.gbif.org/datasets/resource/2559, NMNH Entomology Collections, http://data.gbif.org/datasets/resource/9156, Colección nacional de zoología, http://data.gbif.org/datasets/resource/13478, Mosquito Occurrence Dataset, http://data.gbif.org/datasets/resource/2478 e do Especímenes INBio, http://data.gbif.org/datasets/resource/13473.

3.9. COLETA DE DADOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS

O conjunto de dados de primatas não humanos reconstrói a ocorrência para o nível de gênero, para melhor acessar o nicho ecológico completo das muitas espécies com presença registrada na América do Sul. Os gêneros selecionados foram *Alouatta* sp, *Cebus* sp e *Sapajus* sp. *Cebus* e *Sapajus* foram considerados, para os fins desta análise, sob a designação antiga *Cebus* (Lynch-Alfaro et al., 2012). O conjunto de dados de *Alouatta* também permitiu cobrir apenas o nível genérico, uma vez que as espécies apresentam nichos ecológicos similares em toda sua distribuição geográfica. Os pontos de dados geográficos para a distribuição de primatas não humanos foram obtidos a partir dos dados do portal GBFI (http://www.gbif.org/). Locais adicionais para *Alouatta* sp foram recuperados de Gregorin (2006). O modelo construído para *Alouatta* sp utilizou-se de 432 registros de presença para treinamento e 143 para o teste

do modelo. Os pontos foram obtidos através de dados do portal GBIF dos bancos: Mammal specimens, http://data.gbif.org/datasets/resource/801), Museum of Comparative Zoology, Harvard University, http://data.gbif.org/datasets/resource/14100), NMNH Vertebrate Zoology Mammals Collections, http://data.gbif.org/datasets/resource/1837), Mamíferos de la colección del Instituto Alexander von Humboldt, http://data.gbif.org/datasets/resource/14427), Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, http://data.gbif.org/datasets/resource/2619), Field Museum of Natural History (Zoology) Mammal Collection, http://data.gbif.org/datasets/resource/14349), Denver Museum of Nature and Science Mammal Collection, http://data.gbif.org/datasets/resource/14150), UMZC Zoological Specimens, http://data.gbif.org/datasets/resource/14193), Registros biológicos en áreas protegidas obtenidos de documentos impresos, http://data.gbif.org/datasets/resource/10869), Colección Nacional de Mastozoología - Museo Argentino de Ciencias Naturales 'Bernardino Rivadavia', http://data.gbif.org/datasets/resource/9115), Zoological Museum Amsterdam, University of Amsterdam (NL) – Mammalia, http://data.gbif.org/datasets/resource/12489), Santa Barbara Musem of Natural History, http://data.gbif.org/datasets/resource/646), Lund Museum of Zoology (MZLU), http://data.gbif.org/datasets/resource/1533), UNSM Vertebrate Specimens, http://data.gbif.org/datasets/resource/812), Division of Mammals, Museum of Southwestern Biology, Albuquerque, NM., http://data.gbif.org/datasets/resource/980).

O modelo construído para *Cebus* sp foi montado a partir de 279 registros de presença de treinamento e 93 para o teste. Os pontos foram obtidos através de dados do portal GBIF dos Museum of Comparative Zoology, Harvard University, http://data.gbif.org/datasets/resource/14100), NMNH Vertebrate Zoology Mammals Collections, http://data.gbif.org/datasets/resource/1837), Mamíferos de la colección del Instituto Alexander von Humboldt, http://data.gbif.org/datasets/resource/14427), Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, http://data.gbif.org/datasets/resource/2619), Field Museum of Natural History (Zoology) Mammal Collection, http://data.gbif.org/datasets/resource/14349), Colección Nacional de Mastozoología - Museo Argentino de Ciencias Naturales 'Bernardino Rivadavia', http://data.gbif.org/datasets/resource/9115), Lund Museum of Zoology (MZLU), http://data.gbif.org/datasets/resource/1533) e do Division of Mammals, Museum of Southwestern Biology, Albuquerque, NM., http://data.gbif.org/datasets/resource/980).

3.10. IDENTIFICAÇÃO DE CASOS FEBRE AMARELA.

Localizações aproximadas de casos humanos, assim como localidades que originaram isolamento do vírus a partir de mosquitos e de primatas foram determinadas utilizando locais previstos na literatura de 1935 a 2009. Locais adicionais de casos confirmados de Febre Amarela também foram determinadas através dos conjuntos de dados fornecidos pelo Ministério da Saúde, pelo Sistema SinanWeb (Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net/http://dtr2004.saude.gov.

br/sinanweb). Exatas coordenadas geográficas não foram reportadas em alguns dos casos documentados e foram, portanto, extrapoladas utilizando a ferramenta de geo Loc (http://splink.cria.org.br/geoloc?criaLANG=pt) para obter as coordenadas de latitude/longitude da cidade vila ou aldeia em que Febre Amarela foi documentada. O modelo foi criado após 69 registros de presença usados para treinamento e 23 usados para teste controle do modelo

3.11. DADOS AMBIENTAIS.

Mapas com 5 quilômetros de resolução contendo dados de vegetação, clima e altitude foram obtidos a partir do site do software Maxent (http://www.cs.princeton.edu/~schapire/MaxEnt/). Os dados selecionados, compuseram um banco de apoio, juntamente com dados obtidos a partir do IPCC Centro (http://www.ipcc-data.org/obs/index.html) e no site da AMBDATA (www.dpi.inpe.br/Ambdata/). As descrições das variáveis bioclimáticas e geográficas utilizadas para este estudo estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Sumário de Variáveis ambientais utilizadas na construção dos modelos preditivos de distribuição.

Variável	Descrição
Cld6190_ann	Cobertura de nuvens, anual
Dtr6190_ann	Faixa de temperatura diurna, anual
Ecoreg	Distribuição de vegetação potencial
Frs6190_ann	Frequência de Geada, anual
H_dem	Elevação
Pre6190_ann	Precipitação anual
Pre6190_I1	Precipitação – Janeiro
Pre6190_I4	Precipitação – Abril
Pre6190_I7	Precipitação – Julho
Pre6190_I10	Precipitação – Outubro
Tmn6190_ann	Temperatura média anual
Tmp6190_ann	Temperatura mínima, anual
Tmx6190_ann	Temperatura máxima anual
Vap6190_ann	Pressão de vapor, anual

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA

Foi obtido um fragmento de 670 bp, que inclui os últimos 108 nucleotídeos do gene da proteína codificadora pr/M, a totalidade dos 225 nucleotídeos do gene da proteína M de codificação, e os primeiros 337 nucleotídeos do gene da proteina E provenientes de nove cepas incluídas no presente estudo. Também foi sequenciado um fragmento de cerca de 300 pb, começando com o stop códon do gene NS5 até a extremidade do motivo CS2 para as nove cepas de Febre Amarela.

As topologias geradas pelas análises Bayesianas com um modelo de relógio molecular relaxado tanto dos fragmentos da prM/E como das sequências 3'NCR foram praticamente idênticos e fortemente sustentadas (Figs. 2 e 3). A probabilidade posterior obtida para a árvore MCC da prM/E foi de 0,865 e para as sequências 3'NCR foi de 0,861, após a Corrida da Cadeia de Markov Montercarlo ter sido executado três vezes, em 10 milhões de gerações. Convergência dos parâmetros durante as corridas foram avaliados pelo tamanho efetivo da amostra (ESS), sendo aceitas apenas quando os valores ESS atingindos estivessem acima de 200, calculadas pelo Tracer 1.5 V (Drummond e Raumbaut, 2007) em todos os paramêtros.

Figura 2 - Reconstrução filogenética Bayesiana (árvore MCC) da Febre Amarela utilizando-se sequências da região genômica prM/E.

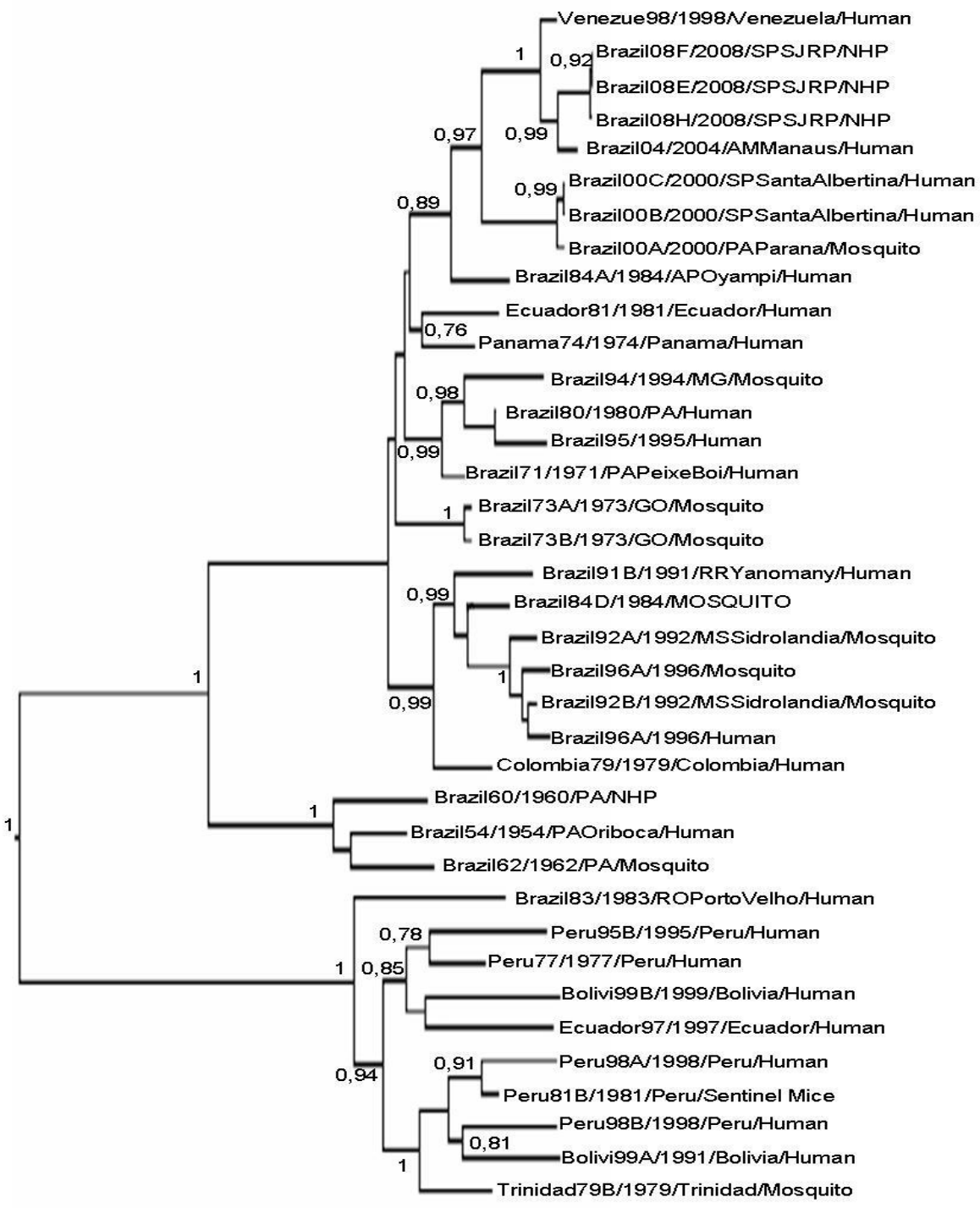
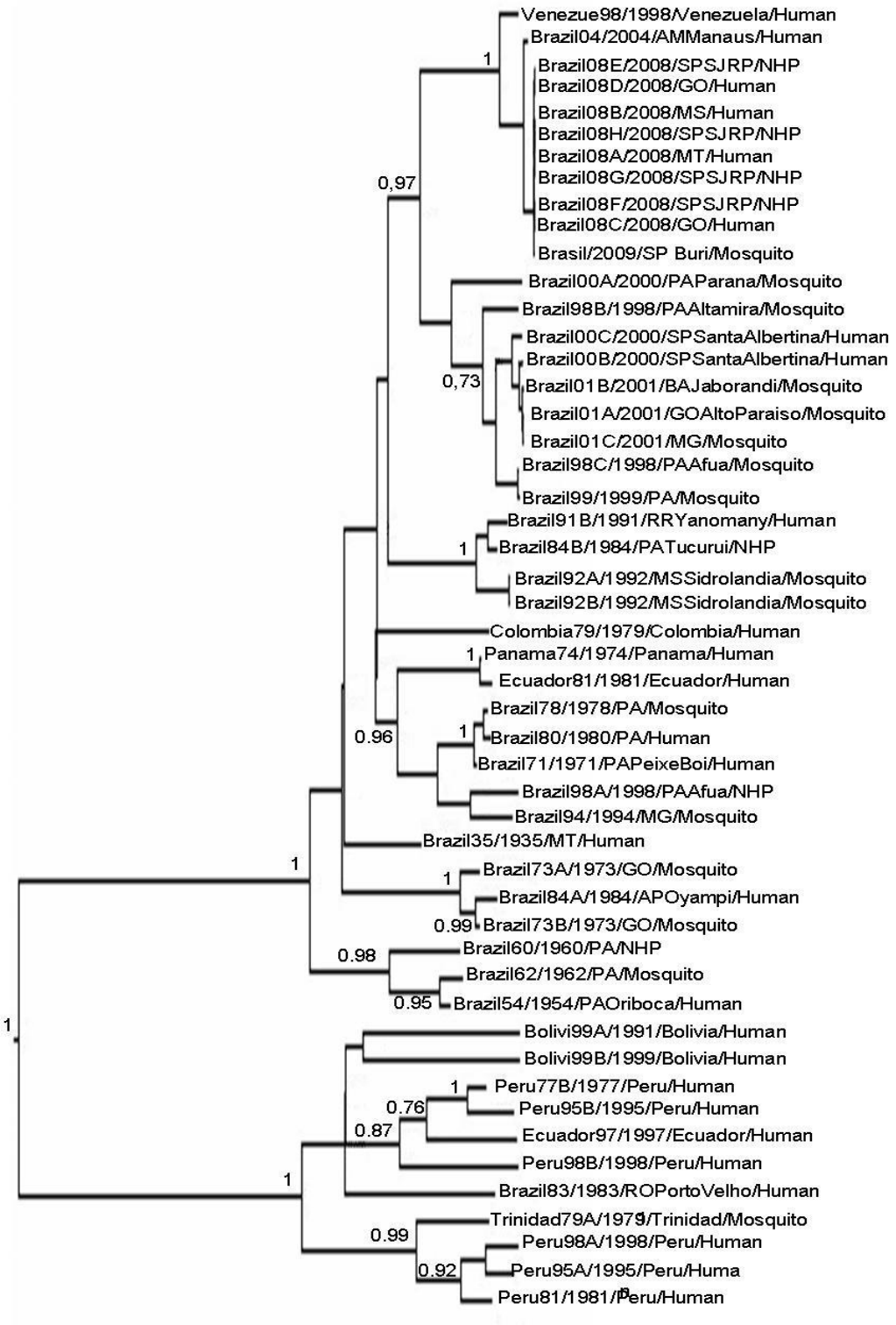


Figura 3 - Reconstrução filogenética Bayesiana (árvore MCC) da Febre Amarela utilizando-se sequências da região genômica 3'NCR.

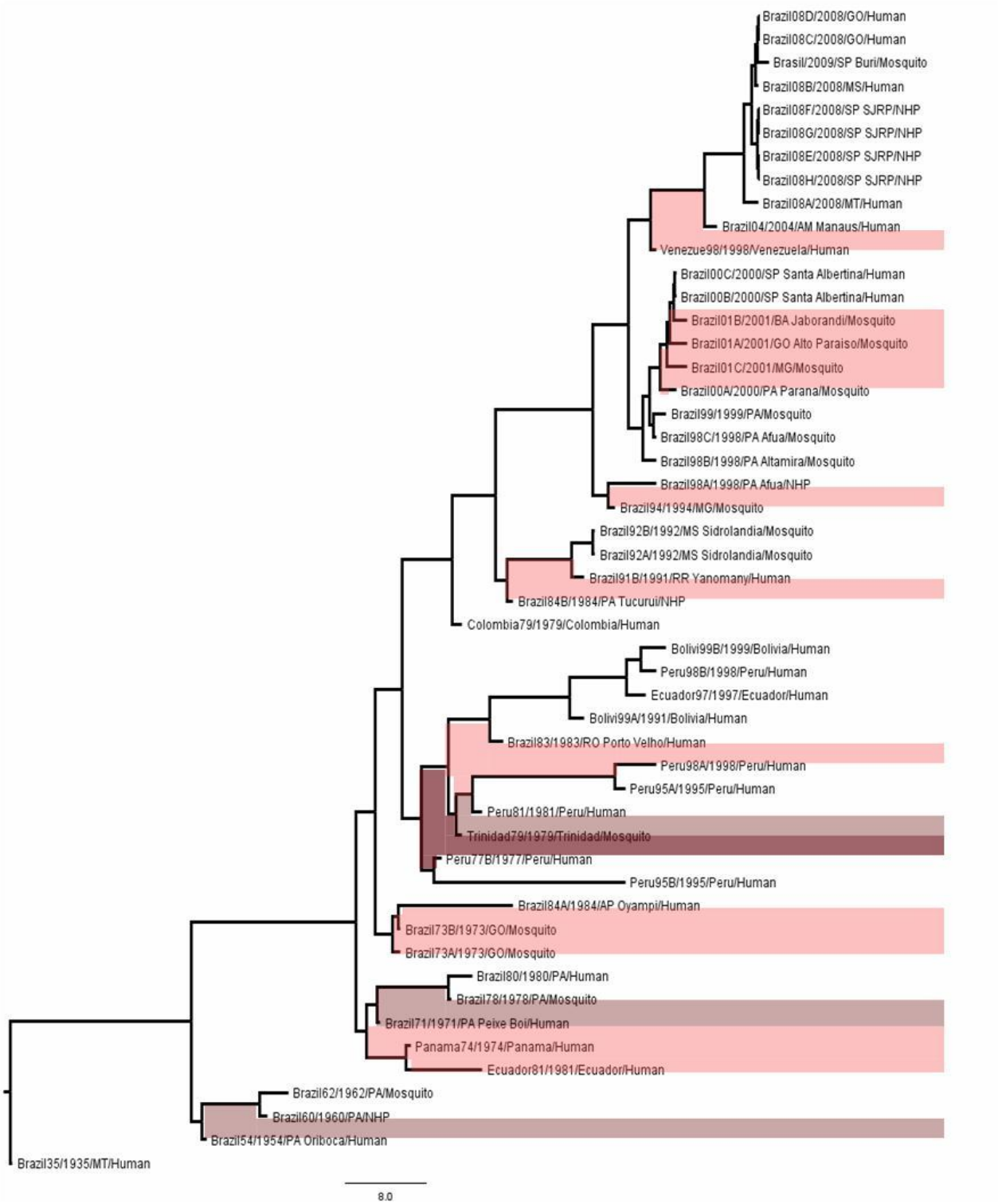


A análise filogenética Bayesiana indicou que as sequências geradas entre 2004 – 2009 formam uma subclado monofilético designado como 1E, descrito anteriormente (Souza et al., 2010). O tempo de origem dos dois genótipos da América do Sul foi calculado em cerca de 1843 (95% de HPD 1789-1895). Considerando-se as cepas brasileiras de Febre Amarela, nossas análises sugerem que muitos eventos independentes de diversificação ocorreram e cada clade surgiu em um determinado momento, como visto nas Figuras 2 e 3.

Estima-se que o subclado 1E esteja associado com as recentes epidemias de 2008 – 2009 e que começaram a divergir dos outros isolados recentes brasileiros aproximadamente em 1976 (95% HPD, 1963-1985). Dentro do subclado 1E, os isolados brasileiros divergiram a partir de uma população viral representada aqui por uma única cepa venezuelana aproximadamente em 1988 (95% HPD, 1978-1992), dados estes que corroboram o tempo estimado anteriormente descrito (Souza et al., 2010).

A árvore MCC para a sequência 3'NCR (Figura 4) destaca as taxas de substituição calculadas a partir do relógio molecular relaxado, indicando que as linhagens com evolução mais rápida estão localizadas nas bases das topologias e de cada ramo, e correspondem a amostras com origem na região Amazônica, enquanto as taxas mais lentas são observadas em áreas fora da região amazônica. Estes padrões são observados em todos os subtipos e sugerem que um forte padrão geográfico “Source-Sink” (Holmes, 2009) é determinante na circulação da Febre Amarela.

Figura 4 - Reconstrução filogenética Bayesiana da Febre Amarela utilizando-se sequências da região genômica 3'NCR. Intensidade da hachura proporcional à taxa de substituição de nucleotídeos observada em cada clado.



As maiores taxas são provavelmente associadas com regiões de fonte de diversidade genética e com a circulação dentro de uma zona endêmica “Source”, enquanto que as áreas de recepção “Sink” apresentam uma transmissão limitada, associada a taxas mais lentas de evolução e extinção de linhagens ao longo do tempo .

A reconstrução demográfica sob um modelo Bayesiano Skyline e Bayesiano Skyride para as sequências 3'NCR mostrou uma população estável durante a maior parte do período considerado, mas com uma diminuição acentuada após a década de 90 (Fig. 5). O mesmo padrão foi observado para as sequências de prM, e em ambos os modelos de reconstrução (Fig.5 a 8) (Bayesian Skyline e Bayesian Skyride) a curva de população efetiva da Febre Amarela mudou de uma população estável para uma evidente curva em declínio iniciando-se na última década do século 20.

Figura 5 - Bayesian Skyline reconstruído a partir da análise de coalescência obtida após estudo do fragmento 3’NCR.

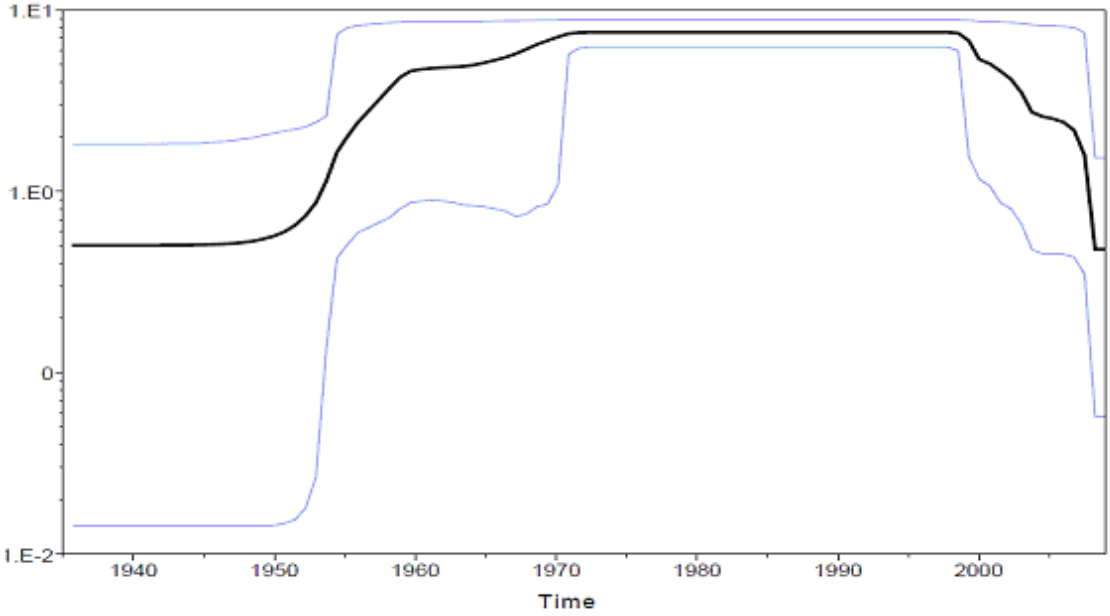


Figura 6 - Bayesian Skyline reconstruído a partir da análise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M.

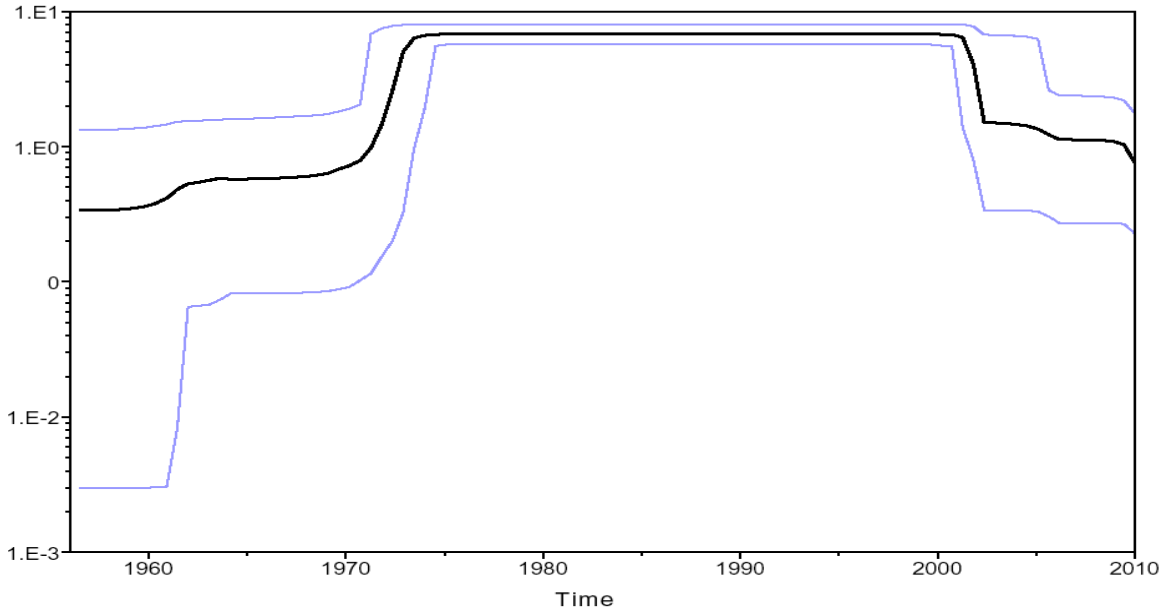


Figura 7 - Bayesian Skyrine reconstruído a partir da análise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M.

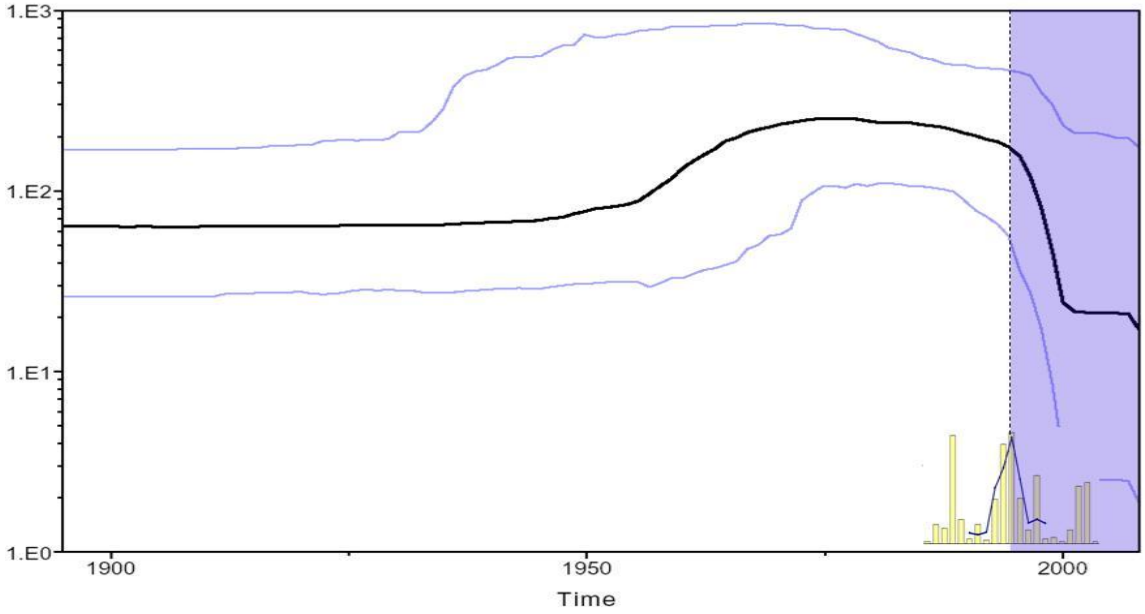
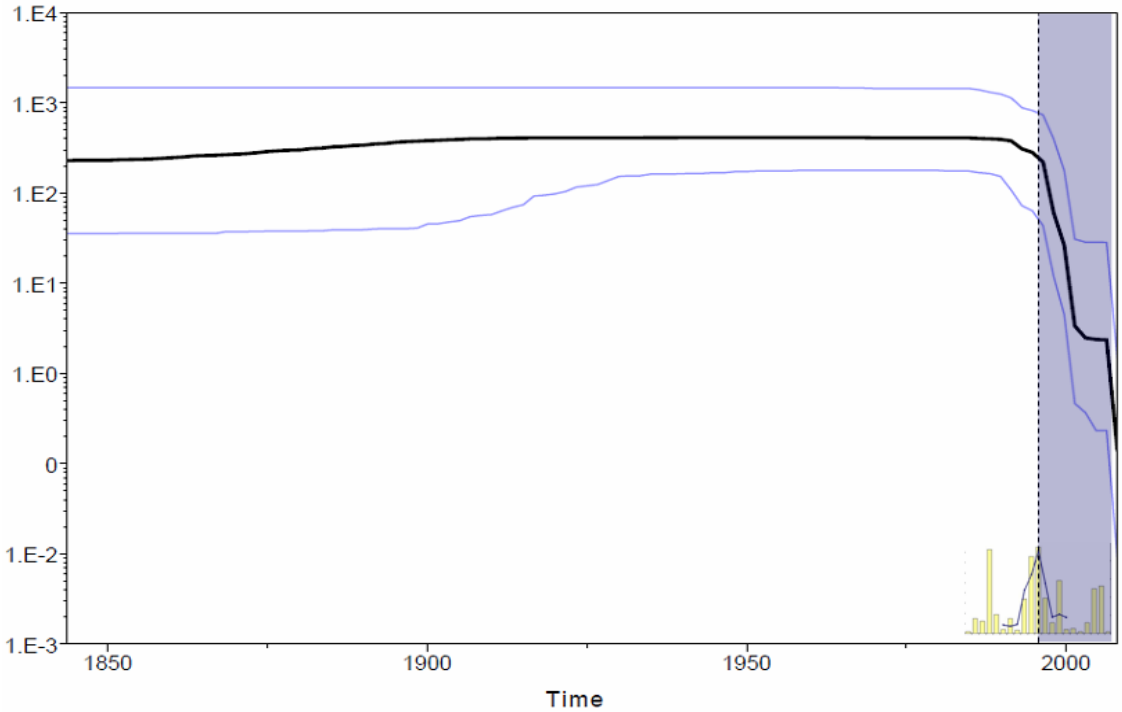


Figura 8 - Bayesian Skyride reconstruído a partir da análise de coalescência obtida após estudo do fragmento 3’NCR.



A estimativa do número de linhagens de 3'NCR (Fig. 9) e os de pr/M (Fig. 10) indicam um acúmulo de linhagens ao longo do período de tempo, mas ambas as curvas estão aparentemente caminhando na direção de um platô estável até ao final do período de estudo.

Figura 9 - Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo do fragmento 3'NCR.

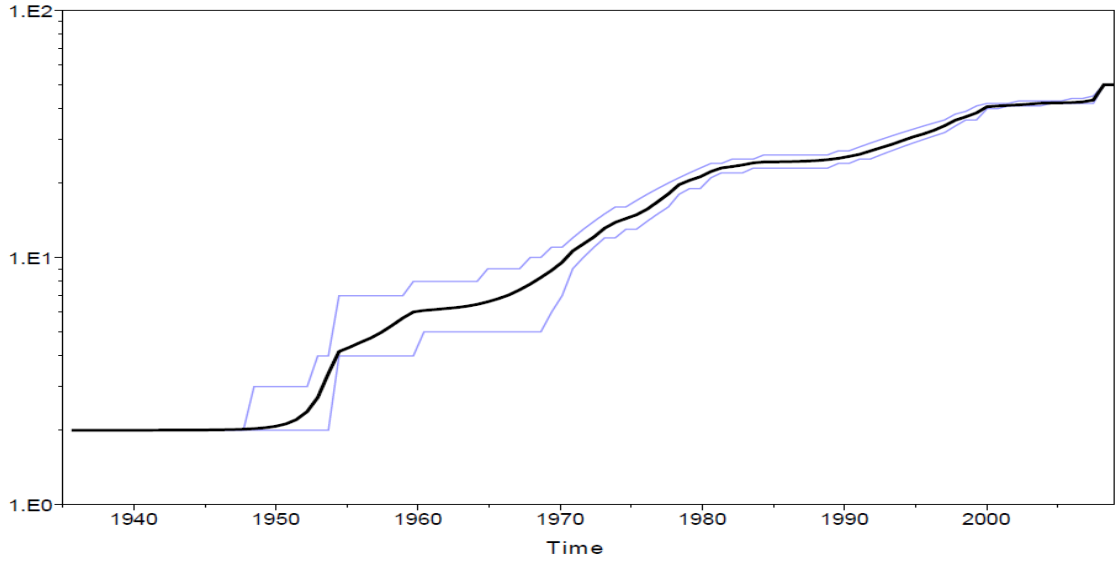


Figura 10 - Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo do fragmento prM/E.

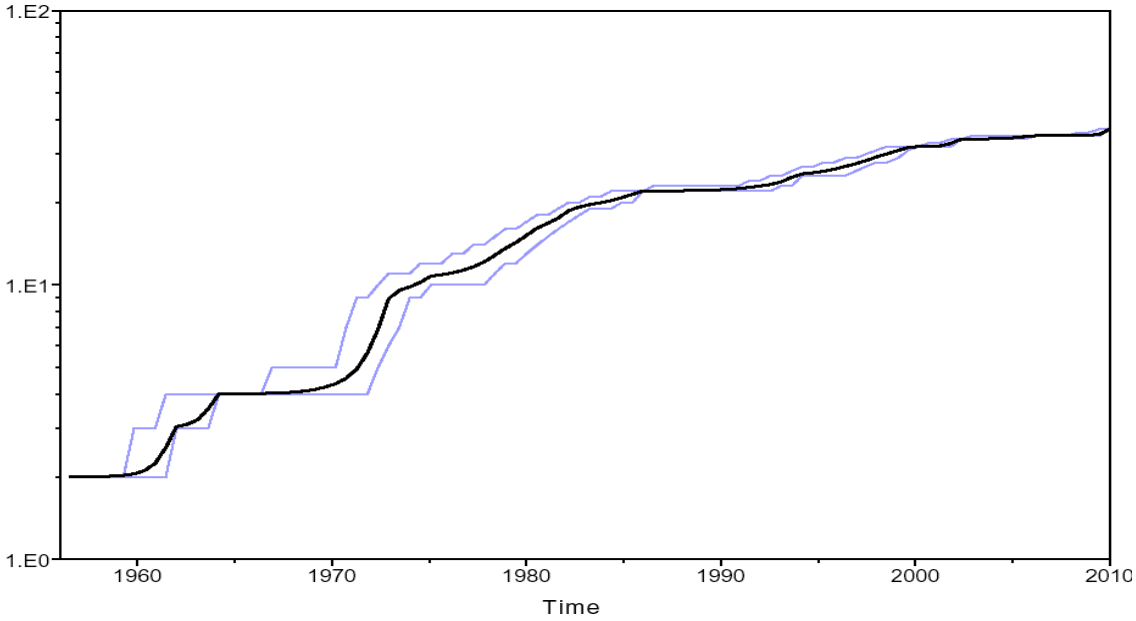
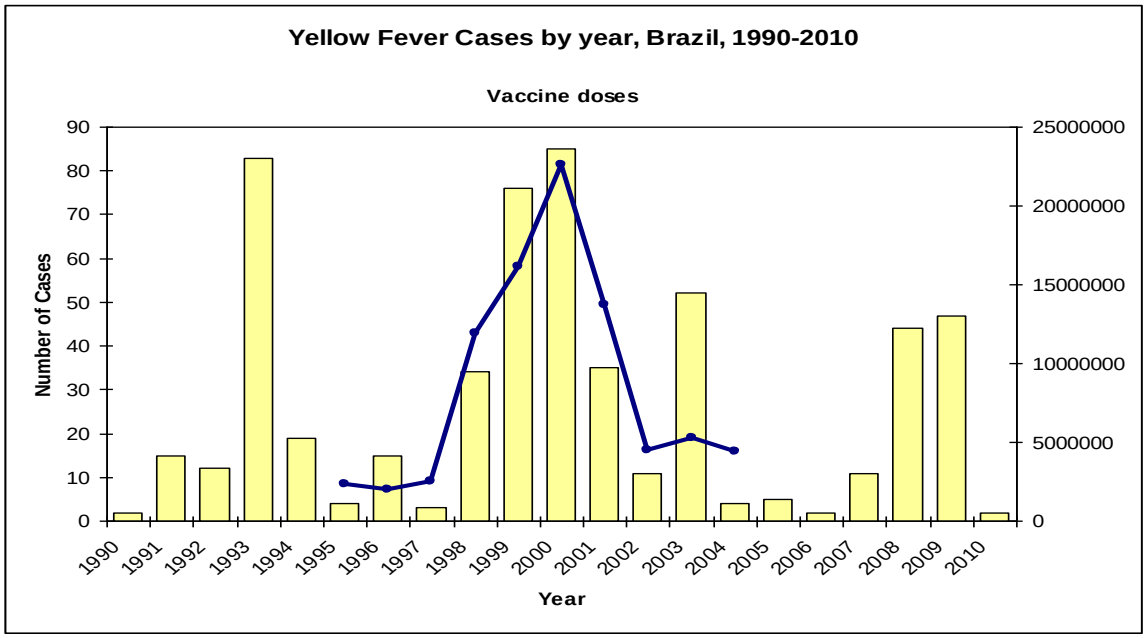


Figura 11 - Incidência de Febre Amarela entre 1990 e 2010 e cobertura vacinal no período de 1995 a 2010, Brasil (SinanWeb Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net/http://dtr2004.saude.gov. br/sinanweb).



Mesmo considerando a análise dos fragmentos Pr/M e 3'NCR concatenados, temos um declínio a partir da última década do século, após um período relativamente longo de população equilibrada e constante (Figura 12). Nas curvas de acúmulo de linhagens (Figuras 13 e 14), o padrão se repete quando consideramos os fragmentos concatenados, corroborando o observado com a análise dos fragmentos em separado.

Figura 12 - Bayesian Skyline reconstruído a partir da análise de coalescência obtida após estudo do fragmento pr/M e 3'NCR.

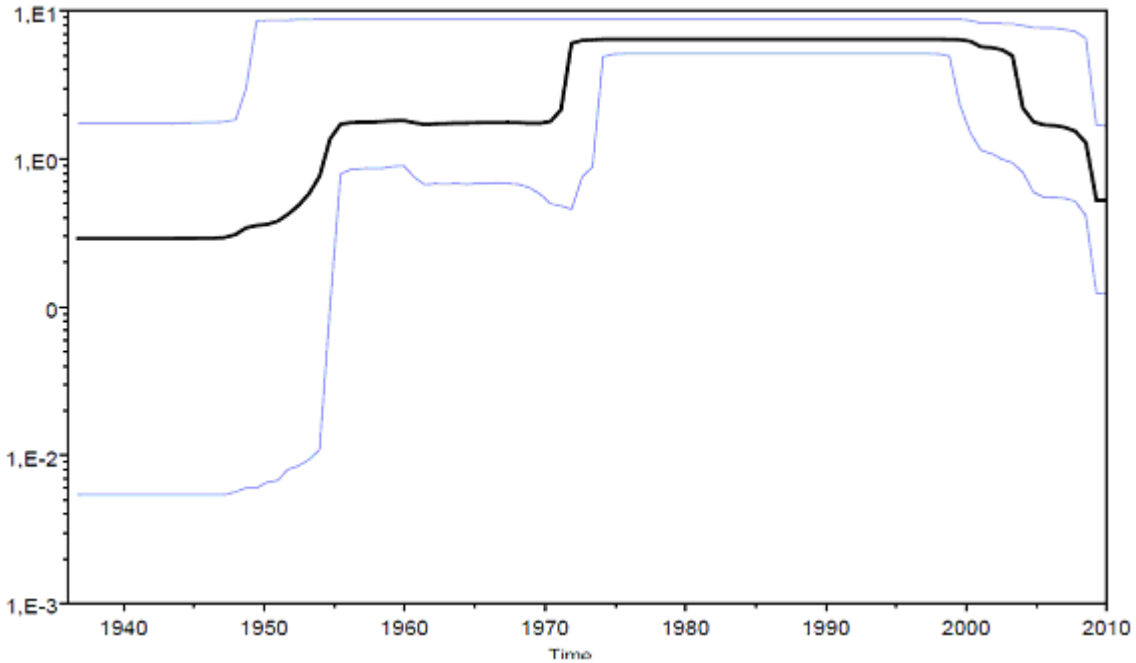


Figura 13 - Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, referente ao acúmulo de variantes do gene da PrM, em relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo dos fragmentos concatenados 3'NCR e PrM.

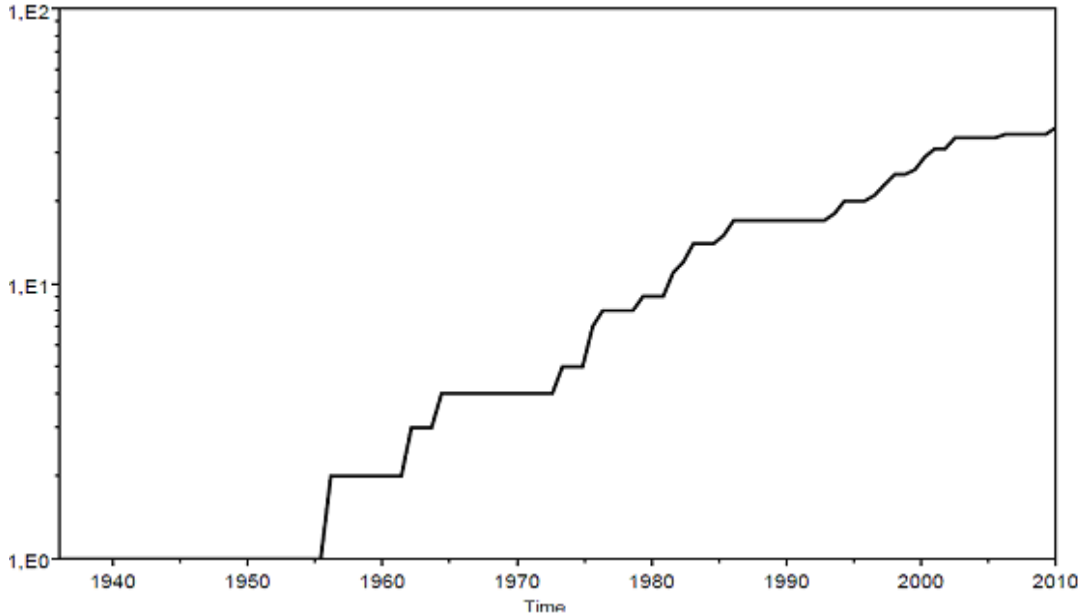
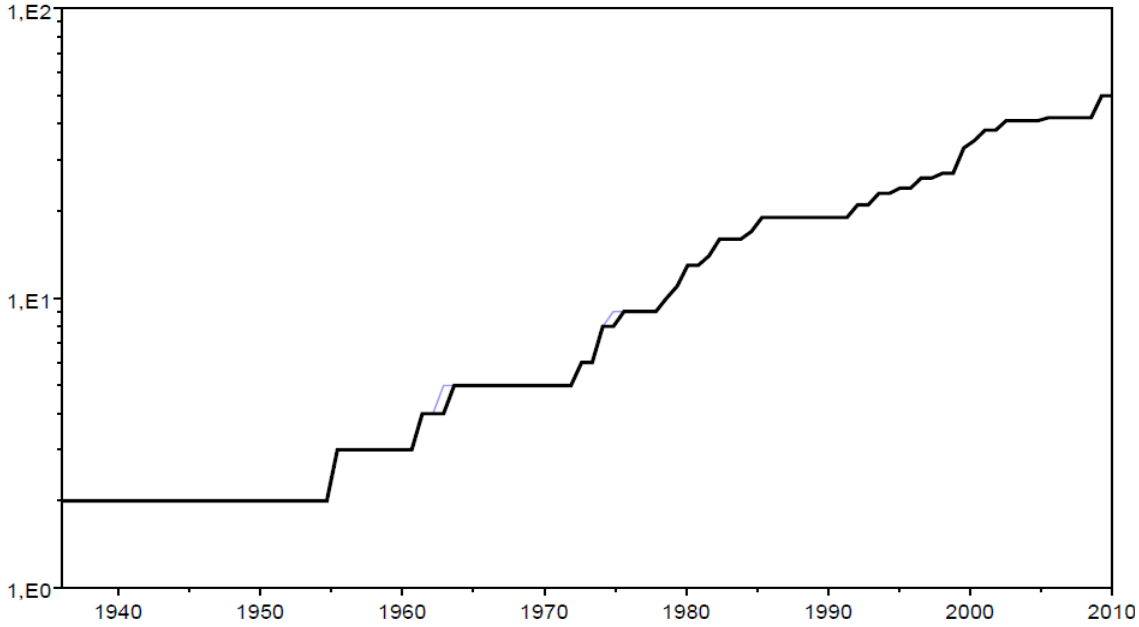


Figura 14 - Acúmulo de linhagens genéticas de Febre Amarela, referente ao acúmulo de variantes do gene da 3'NCR, em relação ao tempo, reconstruídas a partir do estudo dos fragmentos concatenados 3'NCR e PrM.



Com relação à análise filogeográfica, na Figura 15 temos a árvore MCC de 3'NCR produzida a partir de análise discreta do componente geográfico da localidade de origem das amostras. As cores dos clados indicam a origem de cada uma das cepas inseridas na análise. Novamente destacou-se a origem amazônica para a região basal e original de cada clado e linhagem, destacando o caráter geográfico da circulação de Febre Amarela e o padrão de "Source-Sink" observado anteriormente.

A mesma análise permite destacar que o padrão de entradas múltiplas do vírus não se repete apenas ao longo do tempo, na substituição das linhagens, mas também em um plano menor, na circulação de 2008 – 2009, onde os vírus que circularam no estado de São Paulo tiveram entradas

diferentes, conforme sugere a relação demonstrada pela Figura 12, onde vemos que as amostras associadas a primatas próximas a região de São José do Rio Preto estão mais relacionadas com amostra de vírus detectado em Mato Grosso do que a amostra isolada em São Paulo no município de Buri, que por sua vez está mais associada a amostras que circularam em Goiás.

Este padrão destaca a entrada múltipla do vírus no Estado de São Paulo e sugere uma circulação mais complexa. Na mesma figura, cada sequência foi associada ao hospedeiro que originou o isolamento ou a sequência (mosquito, humano ou primata não humano). Pode-se perceber a circulação do vírus em todos os componentes da epidemiologia da Febre Amarela, mostrando a complexa interação entre estes elementos.

Figura 15 - Análise filogeográfica obtida após estudo do fragmento 3'NCR. Cores indicam diferentes componentes de localidade associado a cada sequência estudada.

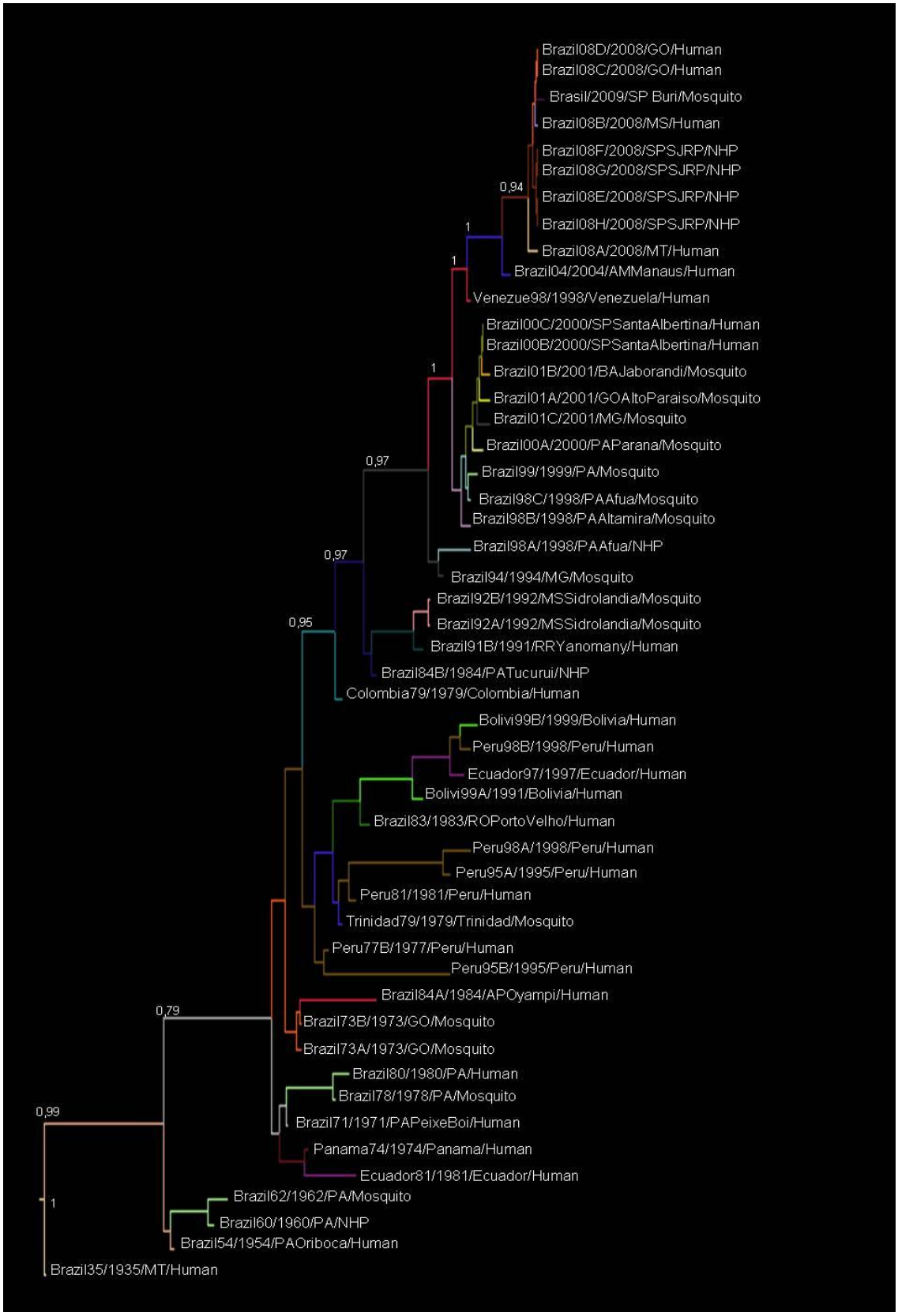


Figura 16 - Detalhe da análise filogeográfica obtida após estudo do fragmento 3'NCR, destacando ramos terminais do clado representativo da linhagem 1E circulante entre 2008 – 2009. Cores indicam diferentes componentes de localidade associados a cada sequência estudada.

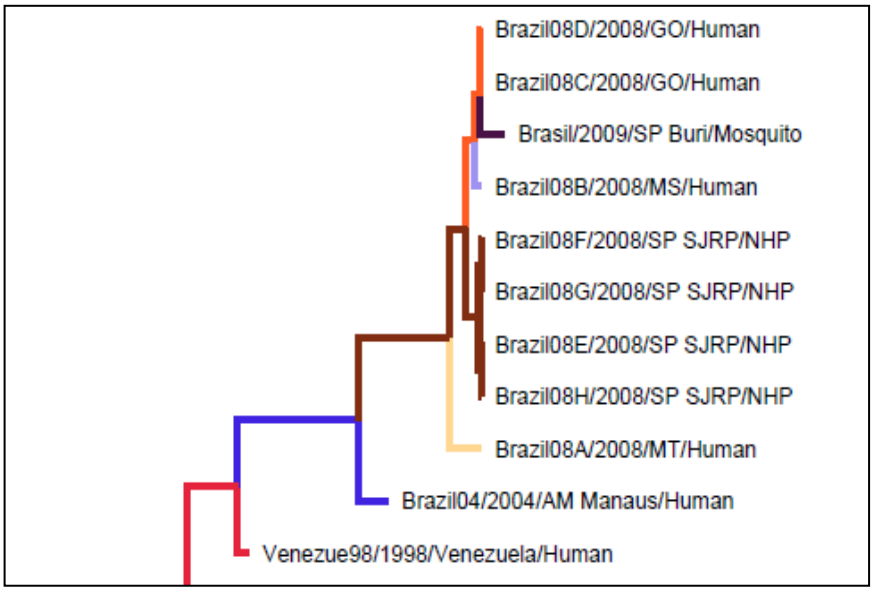
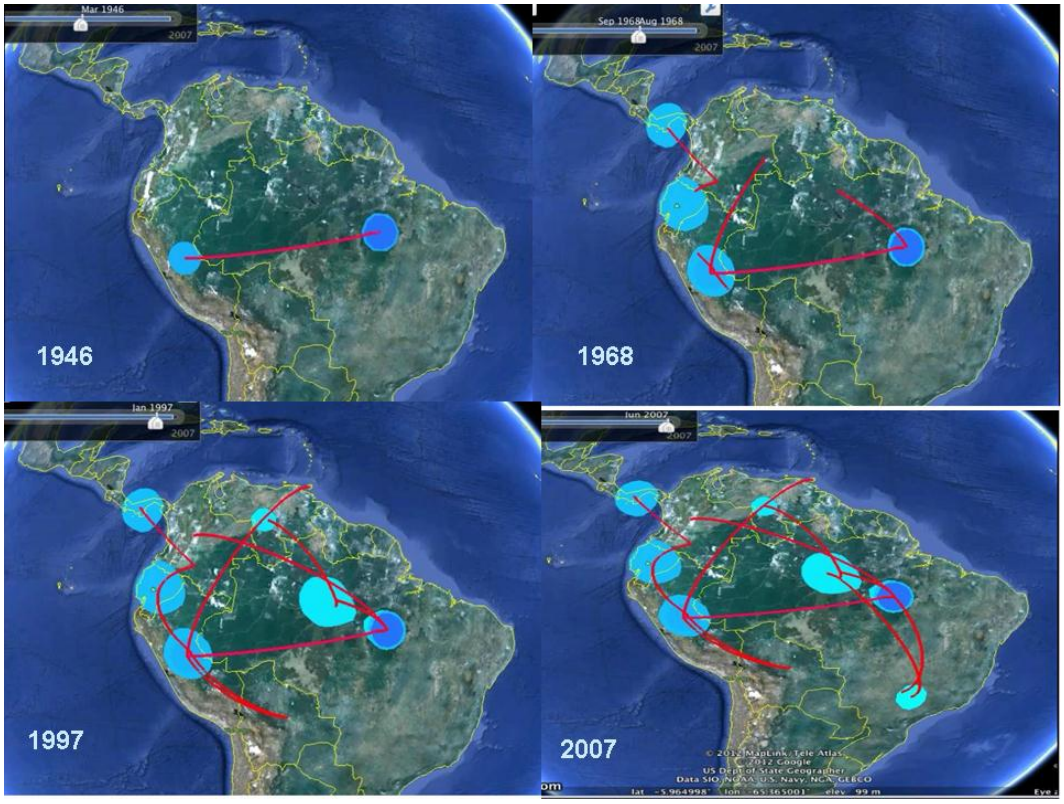


Figura 17 - Reconstrução da circulação em plano continental a partir de análise filogeográfica discreta, destacando o avanço da transmissão e circulação, ao longo do tempo, em quatro fatias temporais (1948/1968/1997/2004).



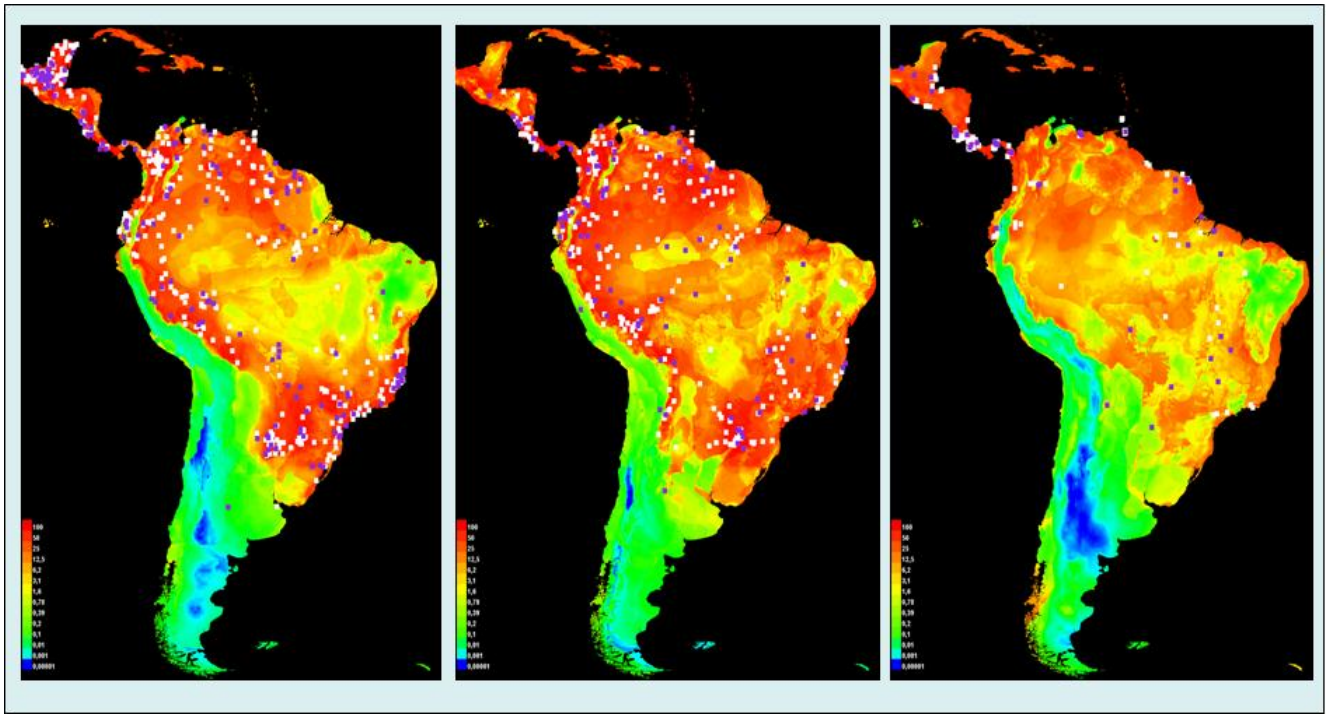
A reconstrução da circulação em plano continental foi possível pela análise filogeográfica discreta, que permitiu criar uma interface animada, com projeção das relações geográficas e temporais das amostras estudadas. A Figura 17 destaca o avanço da transmissão ao longo do tempo em quatro fatias temporais (1948/1968/1997/2004). A figura sugere uma circulação complexa no continente, com grande circulação na porção norte da América do Sul, como sugerem as fatias de 1946 e 1968, com múltiplas entradas independentes nas regiões extra-amazônicas, em 1997 na Bolívia, e em 2007, destacando duas entradas na região do Estado de São Paulo, uma referente a casos detectados em 2000, na região de Santa Albertina e outra, mais recente, referente a circulação do vírus na última epizootia.

4.2. MODELAGEM DE NICHO ECOLÓGICO

As tabelas e gráficos a seguir dão estimativas de contribuições relativas das variáveis ambientais ao modelo Maxent. Para determinar a primeira estimativa, em cada interação do algoritmo de treino, o aumento do ganho regularizado é adicionado à contribuição da variável correspondente, ou subtraído se a mudança para o valor absoluto é negativo. Para a segunda estimativa, para cada variável ambiental, por sua vez, os valores da variável na presença de treinamento e dados de fundo são permutados aleatoriamente. O modelo é reavaliado sobre os dados permutados, e a queda, resultando na formação de AUC é mostrado na tabela, normalizado para percentagem.

A Figura 18 representa a distribuição modelada de *Alouatta* sp, *Cebus* sp e *Hemagogus*. Esta é uma representação do modelo Maxent. Cores mais quentes mostram áreas com melhores condições dentro do modelo de previsão de distribuição. Pontos brancos mostram os locais de presença usados para treinamento, enquanto pontos violeta mostram locais de teste. Estes mapas foram utilizados para a análise subseqüente do modelo de distribuição da Febre Amarela.

Figura 18 - Distribuição modelada de Alouatta sp (Esquerda), Cebus sp (Centro) e Hemagogus sp (Direita).



A Tabela 4 mostra as contribuições relativas das camadas de dados ambientais para *Alouatta* sp, *Cebus* e *Haemagogus* sp. Para *Alouatta* sp, precipitação e pressão de vapor são as variáveis mais importantes. Os mesmos resultados foram confirmados pelo teste de Jackknife, ambos com ganho na análise de treino e no teste. *Cebus* sp mostrou também uma elevada associação com

precipitação e variáveis de pressão de vapor, mas com uma grande influência da frequência de geada, maior que em *Alouatta* sp. Talvez uma indicação de que este primata possa ser mais sensível a baixas temperaturas que *Alouatta* sp. O fato da precipitação e da pressão do vapor serem assim importantes está relacionado à necessidade de fragmentos de vegetação a fim destes primatas sobreviverem. A alta associação de *Alouatta* sp para variável pressão do vapor é uma indicação de sua dependência a uma floresta verde com vegetação perene ao longo do ano, visto *Alouatta* sp serem principalmente fitófagos.

Tabela 4 - Contribuição relativa das camadas de dados ambientais para os modelos de distribuição de Alouatta sp, Cebus sp e Haemagogus sp. Números em negrito indicam variáveis com maior contribuição para os respectivos modelos.

Variáveis	Alouatta sp		Cebus sp		Haemagogus sp	
	Contribuição (%)	Importância após Permuta	Contribuição (%)	Importância após Permuta	Contribuição (%)	Importância após Permuta
Cld6190_ann	1.2	3	4.1	2.2	2.7	0.5
Dtr6190_ann	2.2	4.5	4.1	5.8	3.9	1.5
Ecoreg	5.5	5.7	21.9	15.4	2.9	1.9
Frs6190_ann	0.1	0.3	2.6	17.6	0.7	24.3
H_dem	2.2	4	1.3	2.8	0.5	4.1
Pre6190_ann	2.6	11.8	15.1	19.9	3.6	35.8
Pre6190_l1	1.4	0.9	1.6	1.1	3.7	1.4
Pre6190_l10	22.2	9.1	12.7	1.9	46.8	12.3
Pre6190_l4	5.2	11.9	1.9	2.1	5	4.2
Pre6190_l7	23.3	17.5	8.1	1.8	17.3	2.6
Tmn6190_ann	21.4	3.8	1.1	2.3	8.4	5.4
Tmp6190_ann	0.3	0	4.4	3.8	1.7	1.5
Tmx6190_ann	1	3.2	3	5.6	1.5	4.1
Vap6190_ann	11.2	24.4	18.3	17.6	1.3	0.3

Para *Haemagogus* sp, observou-se que a precipitação e freqüência de geada são fatores importantes, indicando a necessidade desses mosquitos de condições mais quentes e úmidos, a fim de reproduzirem-se.

Os mesmos resultados foram confirmados pelo teste de Jackknife (Figuras 19, 21 e 23), ambos com ganho no treino e no teste, indicando a validade da análise.

A análise também foi validada pela curva característica de operação do receptor (ROC). As Figuras 20, 22 e 24 mostram como os modelos apresentam um melhor desempenho na previsão de ocorrência em comparação com uma seleção aleatória de pontos. Um modelo perfeito terá apenas X pontos para capturar todas as ocorrências X e, portanto, apareceria como um ângulo reto. Um modelo aleatório só vai capturar as ocorrências proporcionalmente a todos os pontos amostrados, recuperando uma linha de 1:1.

Figura 19 - Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Alouatta sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior)

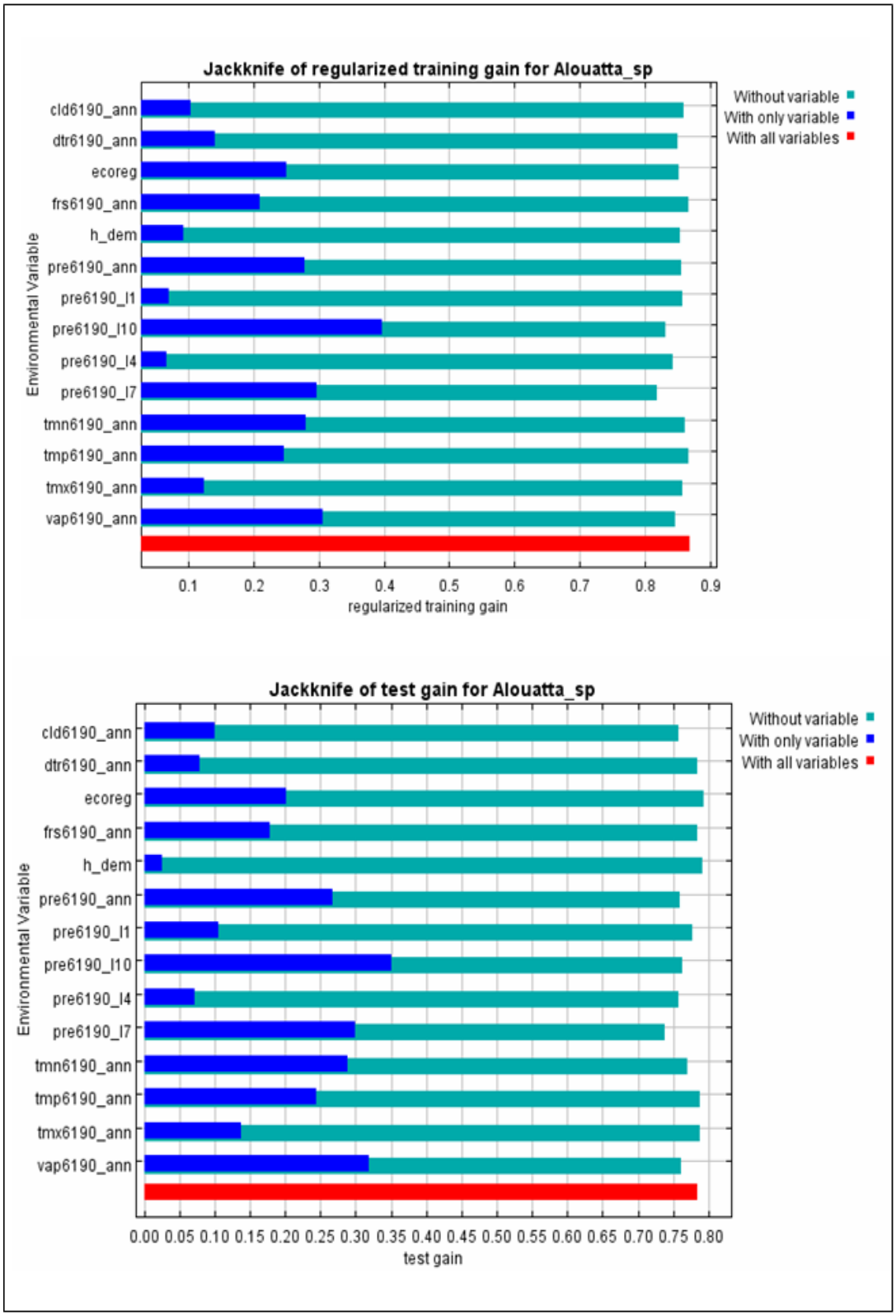


Figura 20 - Curva característica de operação do receptor “receiver operating characteristic” (ROC) para o modelo de Alouatta sp.

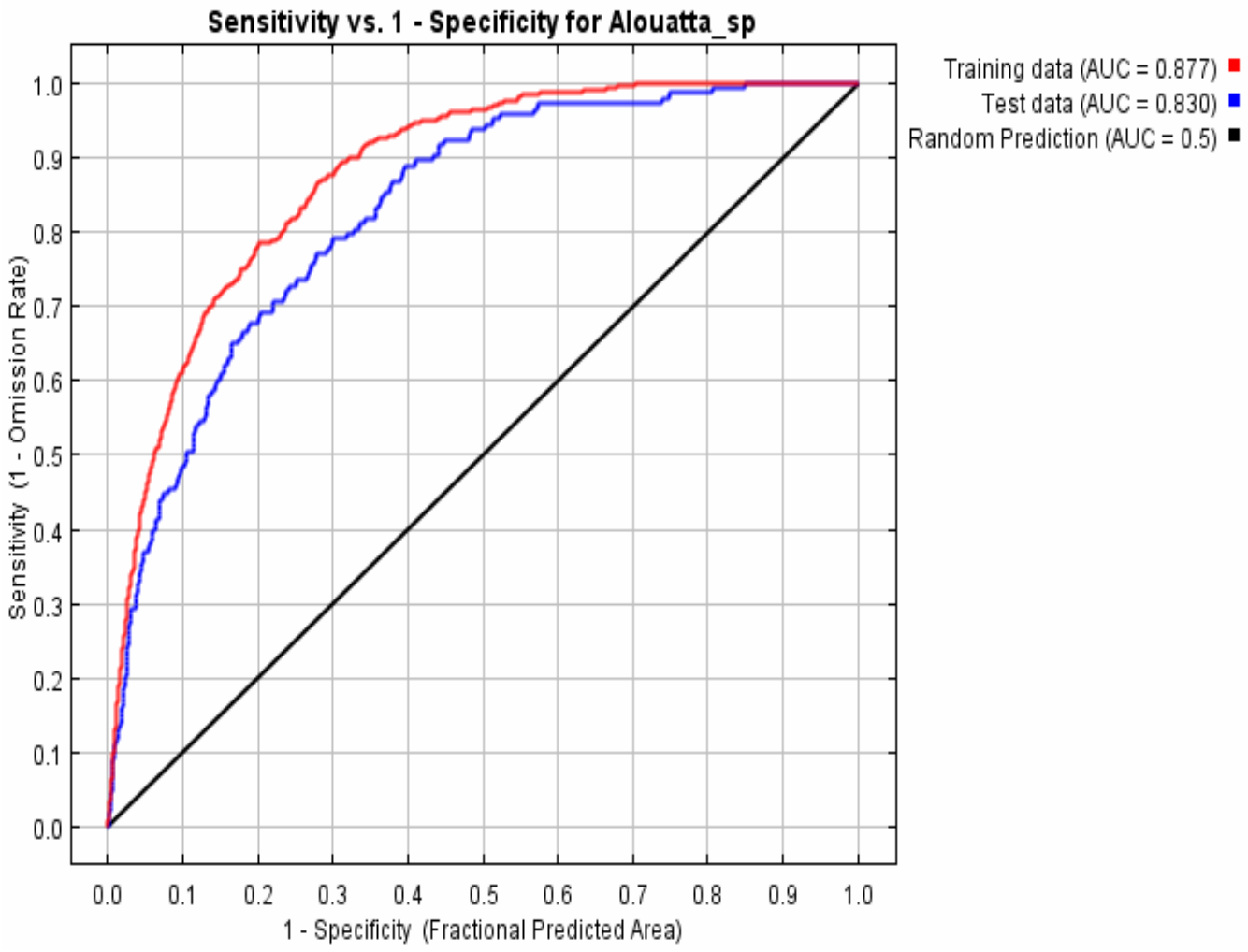


Figura 21 - Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Cebus sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior)

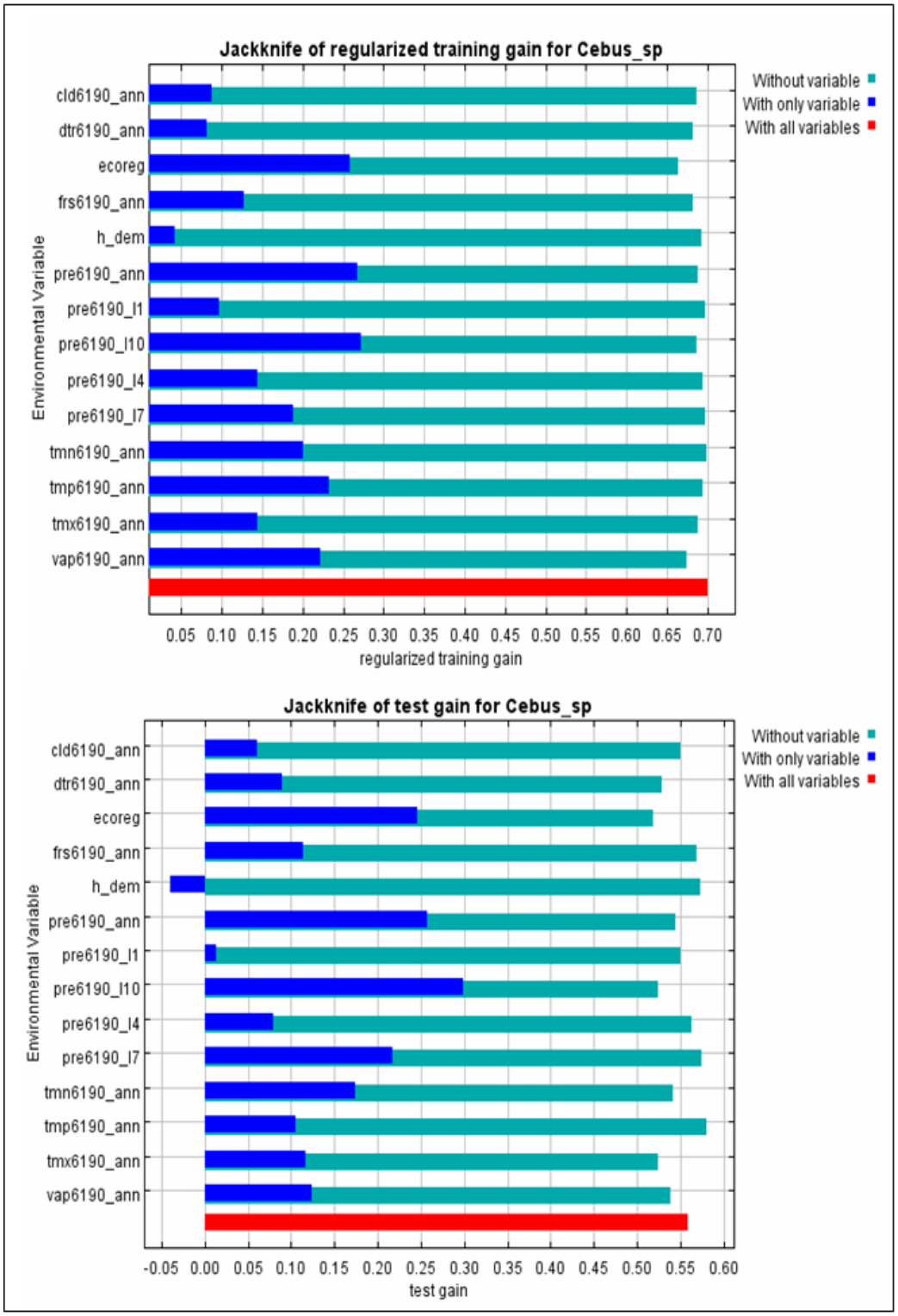


Figura 22 - Curva característica de operação do receptor “receiver operating characteristic” (ROC) para o modelo de Cebus sp.

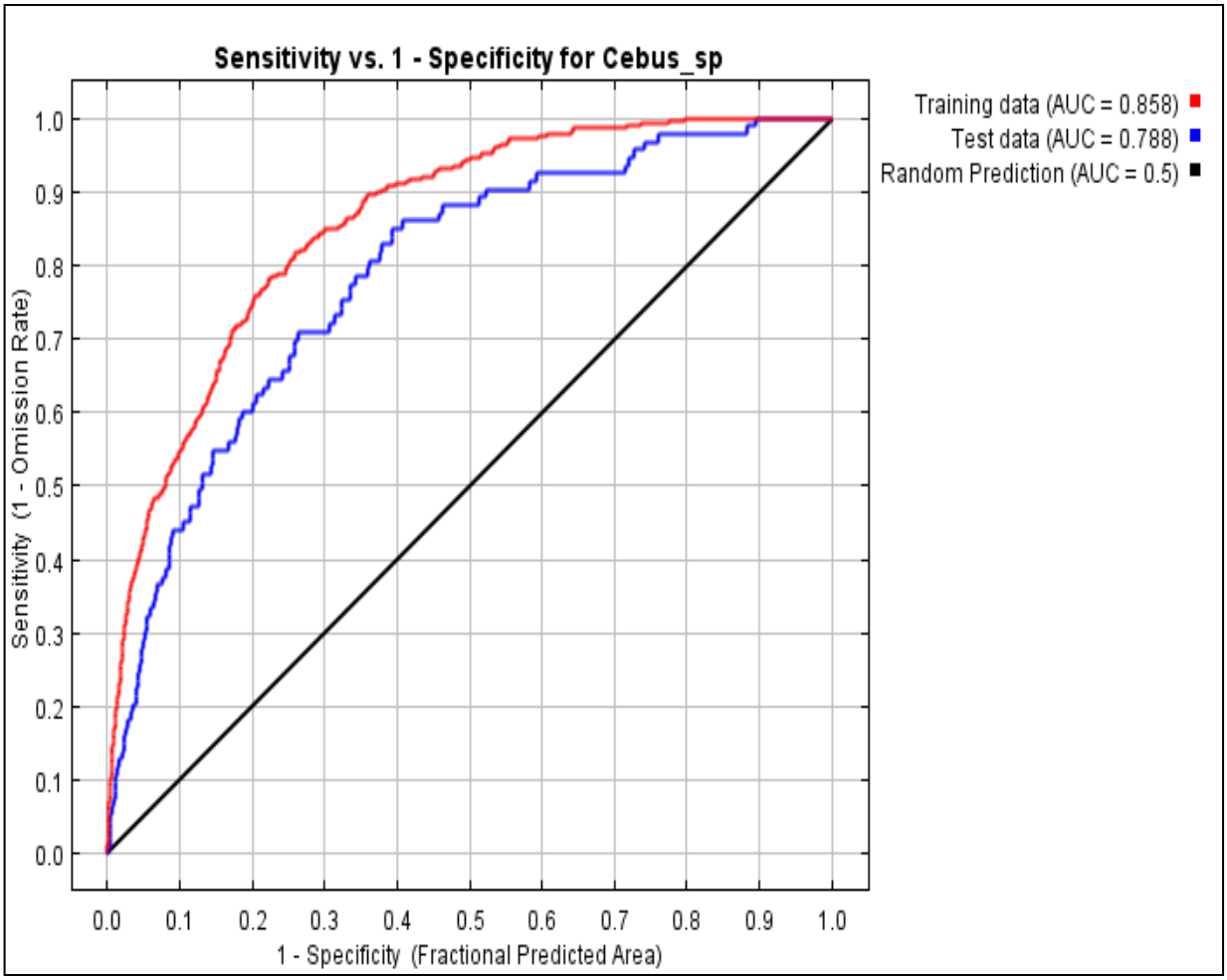


Figura 23 - Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Haemagogus sp com dados de treino (Superior) e teste (Inferior).

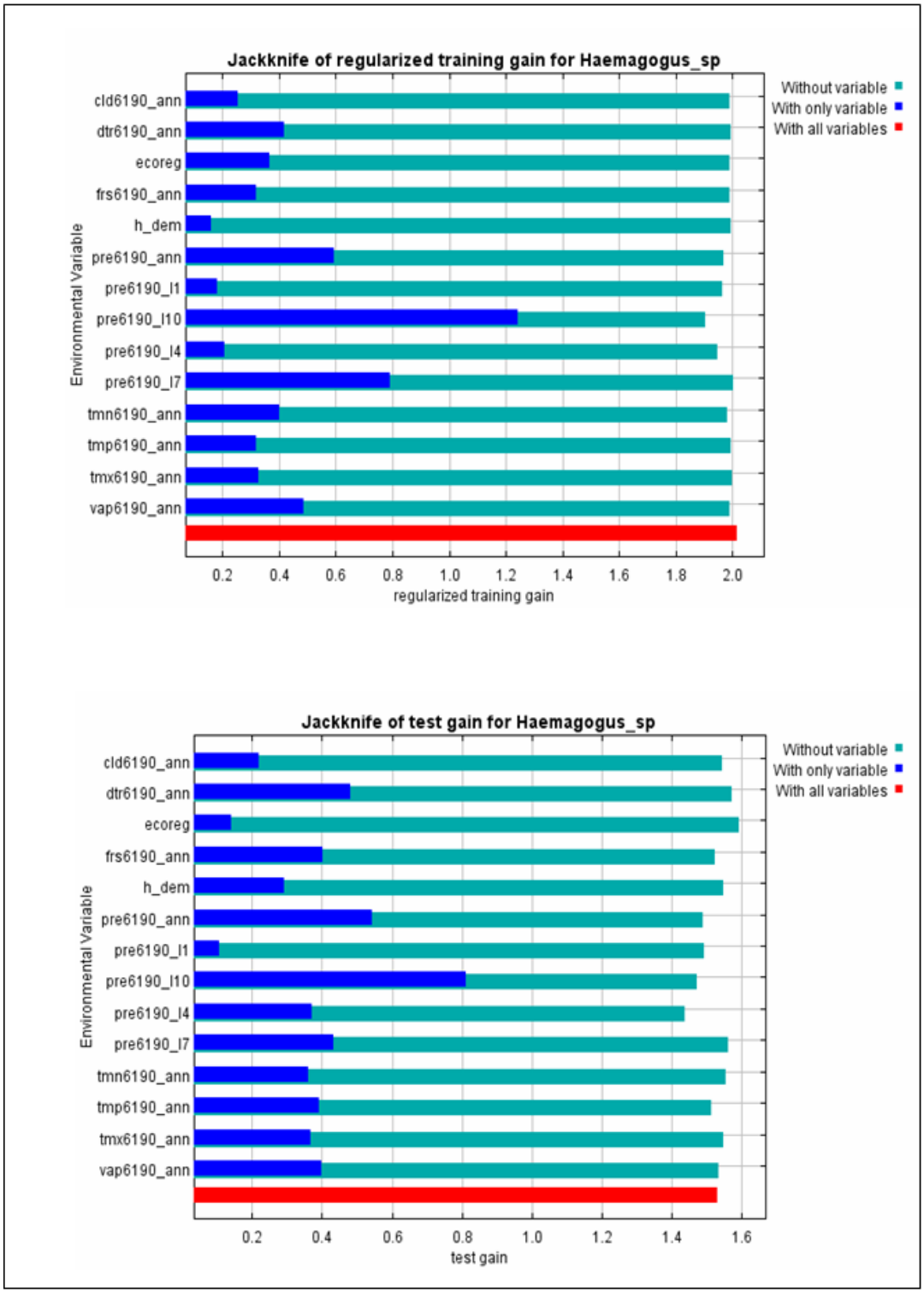
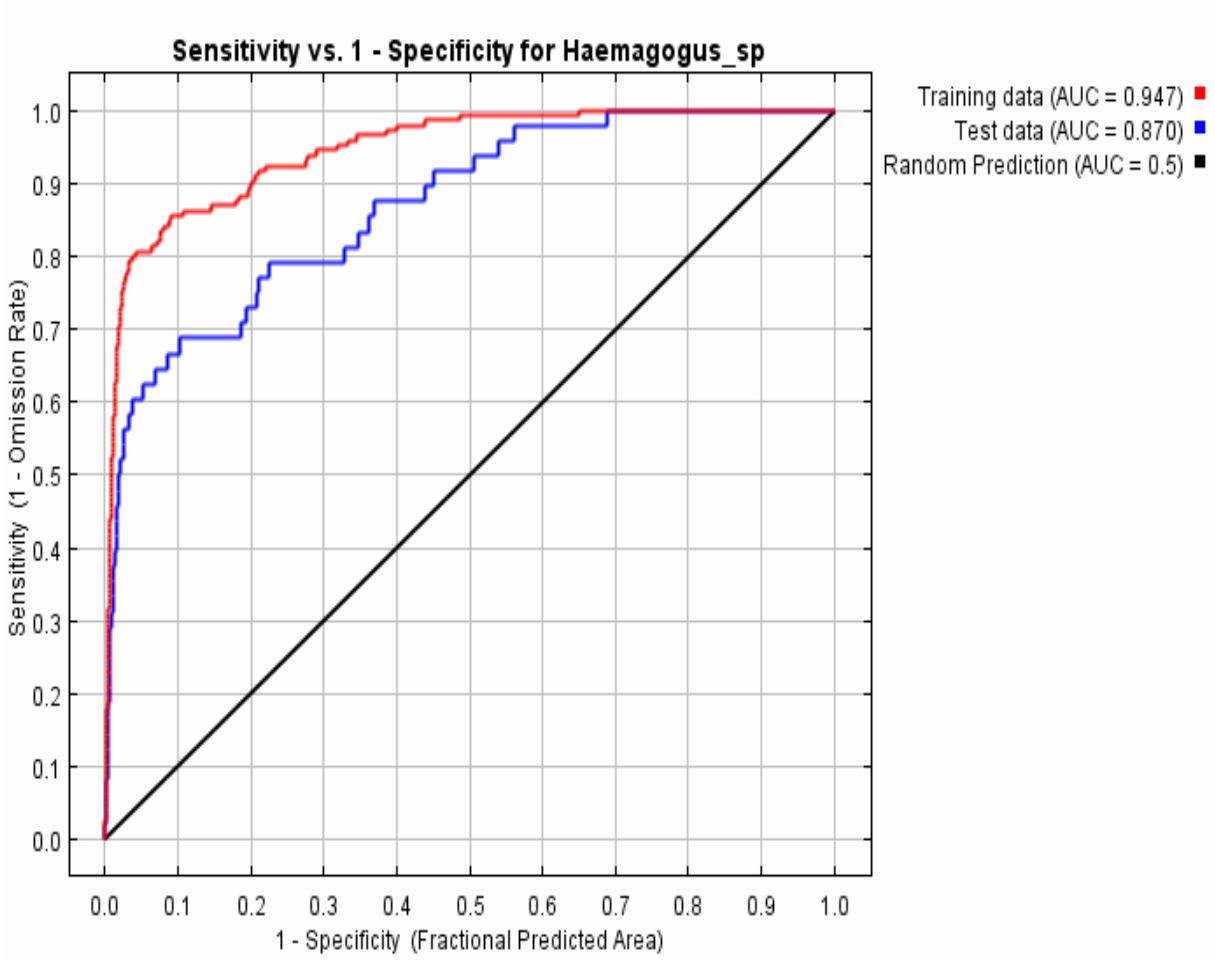


Figura 24 - Curva característica de operação do receptor “receiver operating characteristic” (ROC) para o modelo de Haemagogus sp.



Bons modelos aumentam de forma mais acentuada do que uma linha reta, e a área sob a curva (AUC) será elevada. Em nossa análise, todas as curvas ROC produzidas atingiram altos valores de AUC, como podem ser vistas nas Figuras 20, 22 e 24.

A Figura 25 representa a área modelada potencial de distribuição da Febre Amarela. Mais uma vez, cores mais quente mostram áreas com melhores condições previstas. Pontos brancos mostram os locais de presença usados para treinamento, enquanto pontos violeta mostram locais de teste. A

área em cores quentes no mapa representa uma distribuição potencial de ocorrência de Febre Amarela, e até agora, sugere possíveis áreas que podem receber o vírus e manter, mesmo que por um tempo limitado, um ciclo de transmissão. Estes mapas não são de forma alguma mapas de distribuição, mas sim modelos para examinar áreas que podem estar sob o risco de epidemias e eventos de epizootia em caso de introdução de vírus. A tabela 5 mostra as contribuições relativas de camadas de dados ambientais e a distribuição de *Alouatta sp, Cebus sp Hemagogus* e para um modelo de distribuição de Febre Amarela potencial.

Podemos observar que a precipitação e pressão de vapor são as principais variáveis ambientais que determinam a presença de Febre Amarela. Estes podem ser uma indicação da sua dependência do habitat silvestre com umidade elevada e cobertura vegetal, fator que estão associados à presença de vetores de mosquito (*Haemagogus* sp) e pela presença de hospedeiros susceptíveis (*Alouatta* sp e *Cebus* sp). Analisando apenas a contribuição de *Alouatta* sp, *Cebus* sp e *Haemagogus sp,* podemos observar em primeiro lugar uma contribuição maior de *Alouatta* sp e *Cebus* sp, e uma pequena contribuição de *Haemagogus* sp.

Estes dados devem ser analisados com cautela, uma vez que ao olharmos para a importância de permutação, onde ambos *Alouatta sp e Cebus* sp diminuem em importância e *Haemagogus* sobe, percebe-se a importância do vetor como um fator importante para determinar a presença do vírus, ao passo que a presença de um hospedeiro primata é de menor importância para

a determinação da distribuição de potencial de Febre Amarela. Estes resultados foram validados pelo teste de Jackknife e a curva ROC (Figuras 26 e 27).

Figura 25 - Área de distribuição provável de Febre Amarela, modelada a partir de dados ambientais e de modelos de distribuição geográfica gerados para *Alouatta sp, Cebus sp e Hemagogus sp*.

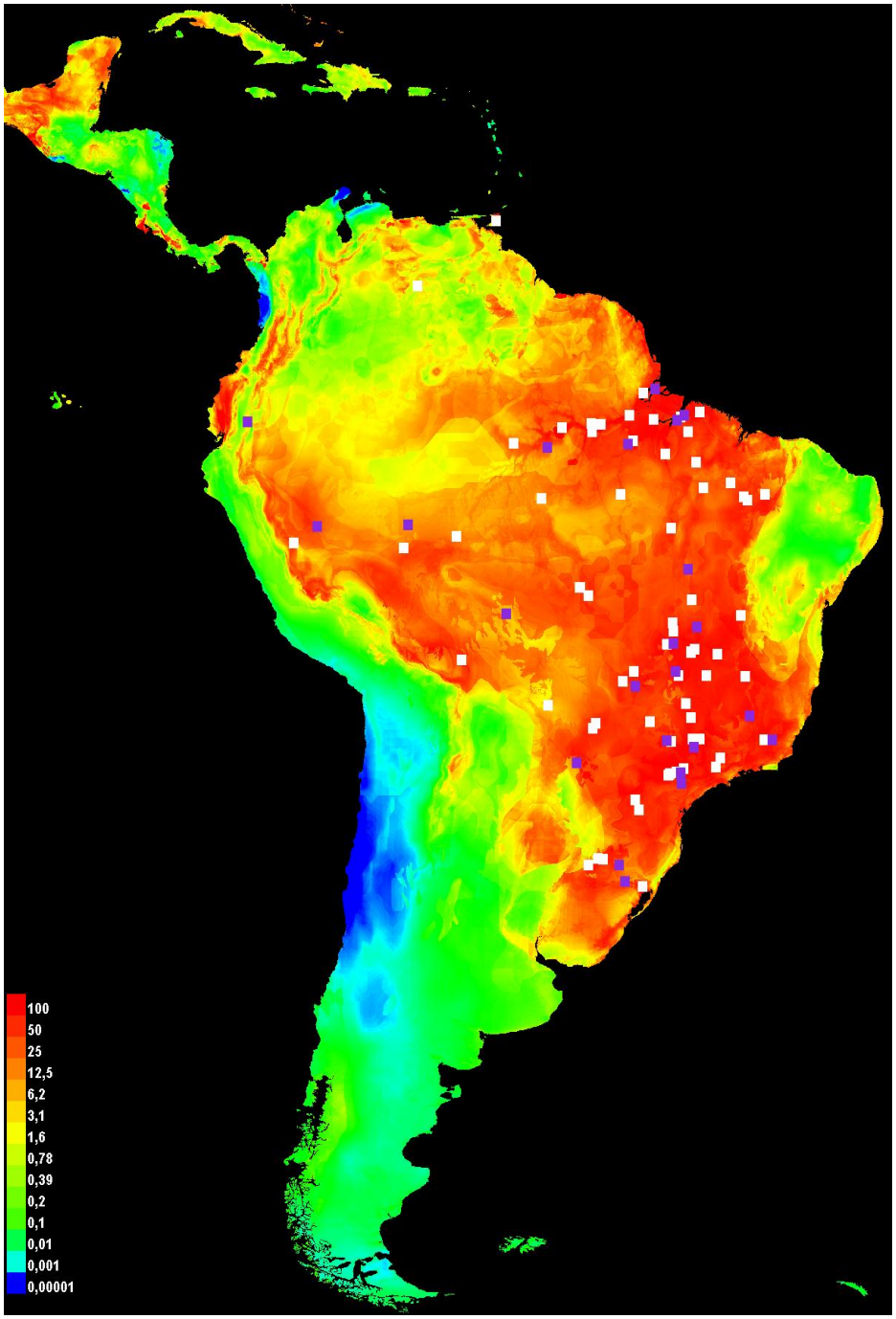


Tabela 5 - Contribuição relativa das camadas de dados ambientais e dos modelos de distribuição de Alouatta sp, Cebus sp e Haemagogus sp para o modelo de distribuição da Febre Amarela. Números em negrito indicam variáveis com maior contribuição para o modelo.

Variável	Contribuição (%)	Importância após Permuta	
Cld6190_ann	3.7	9.9	
Dtr6190_ann	1.1	6.4	
Ecoreg	11.6	3.5	
Frs6190_ann	0.1	0.6	
H_dem	8	1.6	
Pre6190_ann	0.8	19.9	
Pre6190_l1	30.6	2.6	
Pre6190_l10	3.5	9.9	
Pre6190_l4	0	0	
Pre6190_l7	3.1	4.8	
Tmn6190_ann	1.1	0.3	
Tmp6190_ann	0.2	0	
Tmx6190_ann	1.1	7.7	
Vap6190_ann	3.4	15.2	
Alouatta_sp	15.1	2.1	
Cebus_sp	10.8	4.5	
Haemagogus_sp	5.8	11	

Figura 26 - Resultado do teste Jackknife para importância das variáveis no modelo de Febre Amarela com dados de treino (Superior) e teste (Inferior).

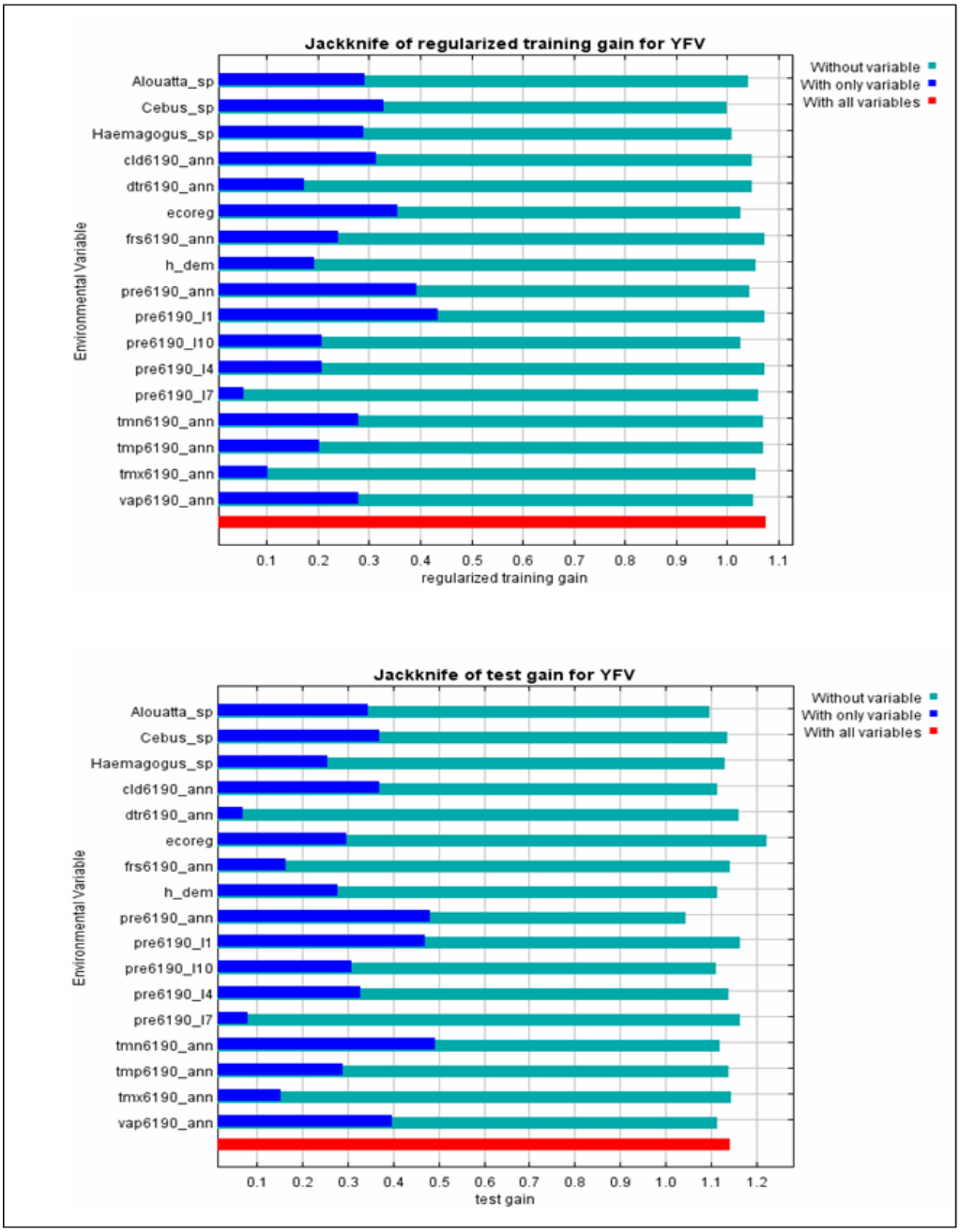
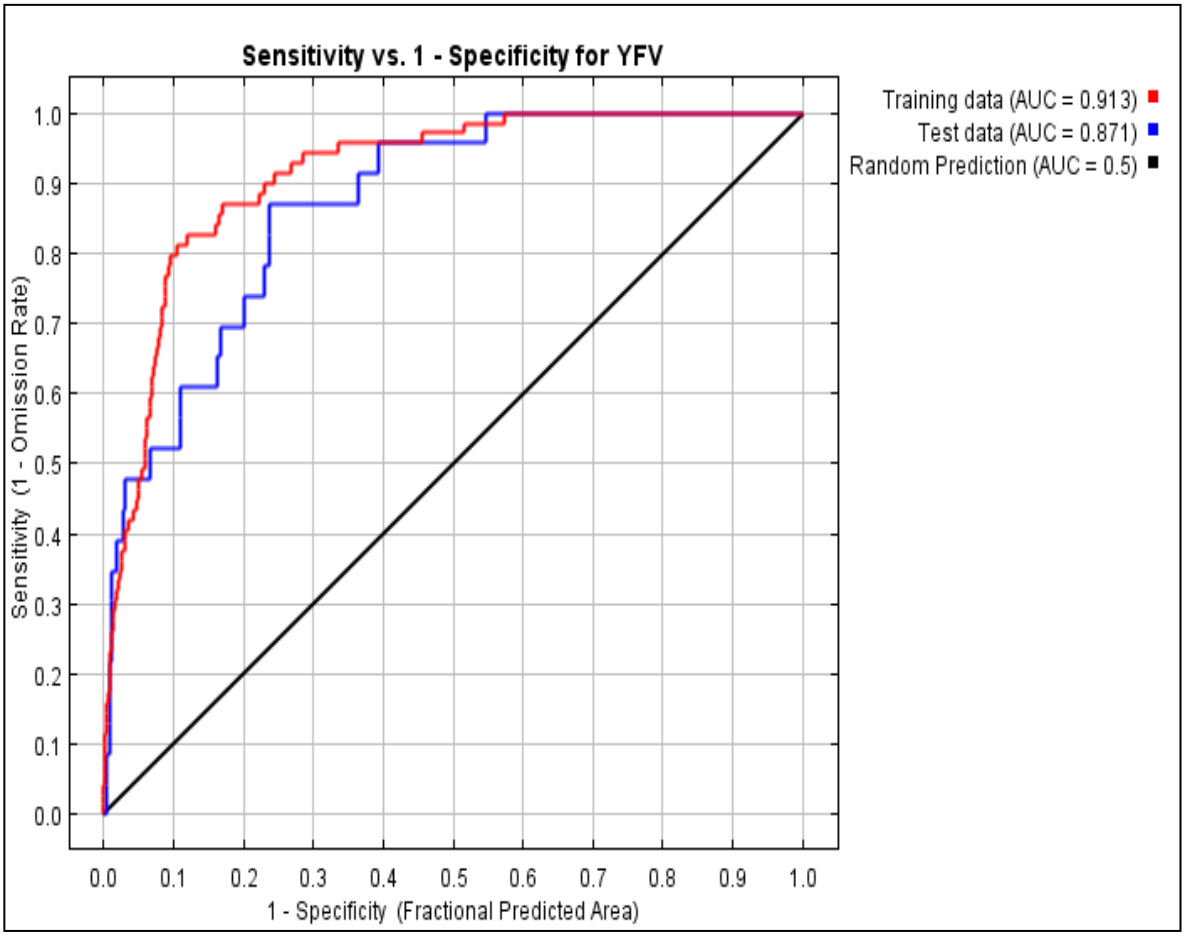


Figura 27 - Curva característica de operação do receptor "receiver operating characteristic" (ROC) para o modelo de Febre Amarela.



5. DISCUSSÃO

Análises filogenéticas anteriores propuseram que a Febre Amarela é geneticamente estável (Chang et al., 1995;. Wang et al., 1996; Mutebi et al., 2001;. Vasconcelos et al., 2004; Bryant et al., 2007). Esta estabilidade tem sido considerada um indicador de processo evolutivo lento (Barret e Higgs, 2007). Apesar de haver algumas evidências de que a Febre Amarela possa evoluir mais lentamente do que o vírus Dengue (Sall et al., 2010), não existe qualquer apoio à ideia de que a Febre Amarela seja um vírus lento, visto que a datação molecular aqui apresentada sugere que as linhagens de Febre Amarela circulam amplamente pela América do Sul e podem estar passando por uma rápida e recente evolução, em um processo contínuo e complexo de introdução e colonização de novas áreas.

Os dados dão poucas evidências de que as estratégias de vacinação vigentes tenham efetivamente colaborado para a diminuição da ocorrência de Febre Amarela, já que uma parte significativa dos casos ocorre ou fora da área de recomendação explícita de vacinação, ou envolvendo indivíduos não vacinados dentro da área de recomendação de vacinação. Este padrão de incidência aponta para possíveis erros na estratégia de vacinação.

Visto que a imunidade gerada pela vacina é longa, de pelo menos 10 anos, seria esperado ao longo do tempo, um acúmulo de população vacinada, e portanto, um número cada vez menor de doentes sendo registrado. No entanto, a circulação e evolução da Febre Amarela determinam contínuas introduções e emergência em novas áreas, o que dificulta a definição de áreas de vacinação.

A partir da análise de Coalescência da população viral de Febre Amarela, utilizando-se de dois genes (3'NCR e pr/M), percebe-se que a população apresentou um decréscimo importante iniciado em meados dos anos 90. Esse decréscimo pode estar associado a fatores que expuseram o vírus a uma situação de "gargalo de garrafa" causado pela diminuição de hospedeiros disponíveis.

Essa diminuição da população suscetível pode ser efeito direto de uma ou diversas situações atuando sinergicamente. O próprio efeito da vacinação pode ser um dos fatores associados a esta queda populacional. Embora novos casos ocorram, dado a invasão do vírus em novas áreas, a longo prazo o efeito de pressão representada pela vacina pode estar contribuindo para este decréscimo, visto que o rebanho vacinado na população humana tem se acumulado, o que representa menor oportunidade para a circulação do vírus na população humana.

Além disso, a migração humana, ocupação de novos territórios e desmatamento intenso causado pelo uso da terra podem conduzir a mudanças na composição faunística das populações de mosquitos, alterações no comportamento de mosquitos e primatas, e um aumento na dispersão dos primatas (Vasconcelos et al., 2001 a,b; Vasconcelos, 2002; Camargo Neves et al.,2005). Todos esses fatores poderiam estar colaborando para diminuir o tamanho efetivo da população da Febre Amarela.

Desta forma, com a eliminação de hospedeiros suscetíveis, estabelecimento de barreiras imunogênicas, desmatamento e escassez de vetor, a mobilidade do vírus torna-se limitada e sua diversidade entra em declínio.

As curvas de população, com um crescimento exponencial, seguido por uma diminuição exponencial e a diversidade de linhagens tendentes a platô, mesmo depois de eventos de diversificação abruptas, são sinais de clados em declínio (Quental et al., 2011). Também o desenho das curvas populacionais observadas para a Febre Amarela aproxima-se ao padrão observado na dinâmica populacional do Paramixovírus-1 circulante em aves após eventos de vacinação (Chong et al., 2010). Neste caso, a aplicação de vacinas representa uma pressão seletiva sobre a população viral.

A alta pressão evolutiva imposta pelos programas de vacinação podem efetivamente atuar no “fitness” global da população de vírus, conduzindo a uma perda global de diversidade em longo prazo. Os efeitos da vacinação foram observados anteriormente na circulação da encefalite japonesa, onde a vacina causou um efeito de amortecimento sobre o crescimento da população de vírus, alterando um modelo de crescimento demográfico constante para uma baixa taxa de crescimento exponencial em resposta à pressão evolutiva (Twiddy et al., 2003) . Um efeito semelhante pode estar em ação na Febre Amarela.

Este possível efeito da vacinação sugere que a população humana pode desempenhar um papel mais importante na circulação da Febre Amarela do que o reconhecido até o momento, e provavelmente, uma certa quantidade de infecções em seres humanos passa desapercebida, ou por serem casos assintomáticos ou com doença branda, mas mesmo assim, capazes de infectarem mosquitos, tornando-se assim, fatores importantes para a introdução do vírus em novas áreas.

Observam-se na região amazônica as mais altas taxas de substituição, o que sugere uma atividade evolutiva e circulação mais intensa. Nas regiões extra-amazônicas, a taxa de substituição é muito menor, sugerindo que os vírus encontram uma situação sub-ótima que acaba por causar uma circulação limitada,

e a extinção da linhagem em circulação, que poderá ser substituída por outra, no caso de uma nova emergência de linhagem.

O vírus circulante na região amazônica durante períodos inter-epidemias apresenta altas taxas de substituição e uma diversidade relativamente alta. Este padrão de circulação está associado com casos humanos esporádicos e infrequentes epizootias, principalmente porque a maioria dos indivíduos está vacinada e a população de primatas não humanos suscetíveis encontra-se dispersa em uma vasta área florestada, mas em baixa densidade. Na região amazônica, a cobertura vacinal é entre 80% – 95%, em contraste com a menor cobertura encontrada fora da zona endêmica.

Esta ampla cobertura, aliada à presença de mosquitos em baixa densidade e população dispersa de primatas pode representar um amortecimento na evolução do vírus. Cada oportunidade de dispersão do vírus iria para uma área com populações suscetíveis e causaria um breve aumento de diversidade associada a um efeito fundador subseqüente. Mas as limitações impostas pelos ambientes receptivos ao vírus impedem o estabelecimento de um ciclo de vírus permanente, e estes enclaves de novos vírus desaparecem brevemente.

Quanto à dispersão do vírus, a mesma é provavelmente associada a uma rede de transmissão complexa. O contato das populações de primatas não humanos é limitado e a maioria das populações são amplamente fragmentadas. É muito improvável que uma população extremamente dissociada possa ser tão eficaz para o transporte do vírus da região amazônica através do Brasil Central até os estados do sul do Brasil.

Considerando o grau de desmatamento observado na maioria dos ambientes naturais no Brasil e na velocidade relativa com que o vírus realizou sua dispersão, é mais provável que casos leves e assintomáticos em humanos, provavelmente extremamente subestimados, estejam associados com a dispersão do vírus (Souza et al., 2010, Vasconcelos & Costa, 2010).

Recomenda-se um aumento da vigilância sobre esses casos, a fim de endereçar corretamente a importância de casos leves e assintomáticos para a introdução do vírus e a circulação. A Febre Amarela ainda pode estar limitada a uma circulação silvestre, mas a ameaça representada pela crescente população de *Aedes aegypti* e as epidemias de Dengue são lembretes constantes de seu potencial para iniciar um ciclo de transmissão urbana.

As Árvores MCC obtidas, e a análise filogeográfica subseqüente, sugerem um padrão geral de transmissibilidade “Source-Sink”, destacando a região amazônica como fonte de diversidade para as outras áreas estudadas, com uma estrutura filogeográfica secundária em ondas, visto que linhagens antigas e anteriores não ressurgem, e sim são substituídas. Os modelos de distribuição geográfica corroboram esse padrão e indicam uma área possível para circulação da Febre Amarela ampla, englobando diversos ecótonos.

Dentro do modelo de Nicho Ecológico elaborado neste trabalho, os principais fatores determinantes para a possível ocorrência da Febre Amarela são a presença de *Haemagogus*, o que destaca o papel crucial do vetor na epidemiologia da doença, e os parâmetros ecológicos que determinam a presença do próprio vetor (precipitação e pressão de vapor), fatores estes relacionados diretamente a reprodução desses mosquitos. Dessa forma, um dos principais elementos para avaliar o risco de Febre Amarela em uma dada região deve ser a presença de *Haemagogus* e das condições necessárias para sua manutenção.

A presença de primatas não humanos, embora seja um fator associado à ocorrência do vírus, quando analisado isoladamente, decresce de importância. No entanto, mesmo considerando a relativa menor participação dos primatas como

fator determinante na ocorrência da doença, sua importância na epidemiologia da doença é incontestável.

A pequena importância dos primatas na ocorrência da doença sugere a existência de um outro possível hospedeiro vertebrado que possa estar atuando nesta situação complexa. Sugere-se algum outro mamífero silvestre ou mesmo a presença da população humana inserida no contexto rural, o que fortalece a suposição do vírus ter um contato maior com a população humana do que descrito anteriormente.

Da mesma forma, os dados sugerem que os primatas seriam pouco eficientes em carregar os vírus para novas regiões. Considerando a intensa fragmentação da vegetação do Brasil Central, que limitaria a circulação dos primatas, e a pouca contribuição efetiva dos primatas na determinação da área de possível circulação de Febre Amarela, é pouco provável que estes sejam os responsáveis pela circulação da Febre Amarela entre as áreas de diversificação (Região Norte da América do Sul) e as áreas de ocorrência de epidemias e epizootias mais ao sul do continente. Pressupõe-se a existência de fatores que não foram computados nessa análise que provavelmente atuam na circulação do vírus em larga escala no continente. Novamente, devido à velocidade com que as

epizootias e epidemias caminham, a atuação antrópica pode certamente estar associada a este transporte.

Com relação aos primatas estudados, *Alouatta sp* aparenta ser extremamente sensível ao vírus e como sentinela da ocorrência de epizootias é de grande valor nos estudos da epidemiologia da Febre Amarela. Sua distribuição sofre grande influência da presença de cobertura vegetal, visto o parâmetro ambiental principal associado a seu modelo ser a pressão de vapor de água, parâmetro diretamente ligado a evapo-transpiração e por consequência, diretamente associado à presença de folhas e cobertura vegetal mais densa.

Esta análise corrobora os hábitos comportamentais da espécie, que apresenta dieta majoritariamente folívora e depende da existência de matas com vegetação perene, o que impediu esses primatas de colonizarem as áreas de Caatinga (Gregorin, 2006).

No entanto, nos ambientes onde existirem fragmentos desta vegetação perene é possível encontrar grupos de *Alouatta*, mesmo quando inseridos em ambientes mais secos, como o Cerrado e o Chaco Boliviano, dado sua flexibilidade e capacidade de viver em ambientes restritos (Gregorin, 2006).

No entanto, os grupos de *Alouatta* apresentam-se isolados e com pouco contato entre si, como diversos estudos de freqüência alélica tem sugerido (Ruiz-Garcia et al., 2007), mesmo enquanto se tratam de grupos vivendo em ambientes de mata contínuas e amplas. Aparentemente, nesta situação, os grupos se mantêm restritos a uma área de vida ou território restrito, interagindo pouco com outros grupos e raramente migrando (Ruiz-Garcia et al., 2007).

Cebus sp por sua vez é mais resistente e pode atuar como um reservatório ou hospedeiro em grande parte do território da América do Sul. Ao contrário de *Alouatta*, são poucos os isolamentos do vírus a partir de *Cebus.* No entanto, existem registros de sorologias positivas, o que indica que *Cebus* sobrevive à infecção pelo vírus da Febre Amarela (Lima et al., 2010).

Sua importância relativa aparenta ser maior inclusive que a de *Alouatta* sp no que se refere à modelagem da distribuição geográfica dos casos. O gênero apresenta grande flexibilidade, vivendo inclusive em ecótonos não utilizados por *Alouatta*, como grande parte da vegetação xeromórfica da Caatinga. Além disso, *Cebus* apresenta uma dieta mais flexível e grupos sociais complexos e maiores (Lynch-Alfaro et al., 2012). Sugere-se que um monitoramento de *Cebus* sp se faz

necessário para avaliar o papel epidemiológico desses grupos na circulação do vírus, principalmente na faixa do Brasil Central.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

1. Compreender a dinâmica evolutiva da Febre Amarela associada a epidemias recentes na América do Sul é importante para descrever os fatores que determinam a circulação viral, possibilitando o planejamento de medidas de prevenção efetivas.

2. As evidências indicam um possivel efeito a longo prazo da vacinação atuando diretamente sobre a evolução e dinâmica filogenética da Febre Amarela. É importante que mais estudos sejam realizados para compreender o efeito da vacinação como mecanismo de pressão evolutiva, não apenas na Febre Amarela, onde fatores ambientais atuam conjuntamente, mas também em outras doenças de etiologia viral.

3. Monitorar a evolução do vírus da Febre Amarela é uma estratégia válida para compreender sua distribuição geográfica e evidenciar mecanismos complexos de transmissão e introdução. Uma estratégia de monitoração poderia, desta forma, ser implementada no Programa de Vigilância, periodicamente recuperando sequências virais e estudando suas relações

filogenéticas e evolução em diversos pontos do Brasil. Tais ações poderiam facilitar a detecção de novas linhagens, e mapear a circulação do vírus.

4. Também se faz necessário compreender a ecologia e os fatores relacionados à distribuição geográfica da doença, visto ser estas informações cruciais no processo decisório das políticas de distribuição de doses de vacina e definição de áreas prioritárias de vacinação e novas estratégias de cobertura.

5. A modelagem de Nicho Ecológico aqui empregada permitiu compreender a distribuição geográfica da Febre Amarela e testar hipóteses relacionáveis com fatores ambientais ligados a epidemiologia da doença, sendo uma abordagem interessante para ser aplicada em outras doenças associadas a vetores ou com forte caráter ambiental.

6. A metodologia mostrou-se também uma ferramenta adequada para apontar áreas favoráveis a circulação do vírus, tornando-se assim um instrumento de análise para avaliar critérios de definição de áreas para vacinação e modelos preditivos para órgãos de Vigilância prepararem suas estratégias de prevenção e controle no caso de possível introdução de patógenos.

7. Finalmente, é preciso que os órgãos de vigilância e pesquisa voltem-se para os estudos da ecologia da Febre Amarela a fim de serem compreendidos os fatores ambientais e antropogênicos que possam estar atuando na movimentação e circulação da Febre Amarela. Assim, será possível prevenir a ocorrência da doença e diminuir sua incidência.

7. REFERÊNCIAS

Alencar, J. C. B.; Marcondes, N. M.; Serra-Freire, E. S.; Lorosa, J. B. Pacheco, & A. E. Guimarães. Feeding patterns of Haemagogus capricornii and Haemagogus leucocelaenus (Diptera: Culicidae) in two Brazilian states (Rio de Janeiro and Goiás). J. med. Entomol., 45: 873–876, 2008.

Almeida, M. Combates sanitários e embates científicos: Emílio Ribas e a febre amarela em São Paulo. Hist. cienc. saude-Manguinhos., vol.6, n.3, pp. 577-607. 2000.

Auguste A.J., Lemey P., Pybus O.G., Suchard M.A., Salas R.A., Adesiyun A.A., Barrett A.D., Tesh R.B., Weaver S.C., Carrington C.V. Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. J Virol. 84(19):9967-77. 2010.

Avise, J. Phylogeography: The History and Formation of Species. President and Fellows of Harvard College. 2000.

Barrett A.D., Teuwen D.E. 2009. Yellow fever vaccine – how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?. *Current Opinion in Immunology* 21 (3): 308–13.

Barrett, A.D.T. & Higgs S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annu. Rev. Entomol.* 52:209–29, 2007.

Beaty B, Calisher C.H, Shope R.E. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons RW (eds) Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 6th edition. American Public Health Association, Washington, p. 797-855, 1989.

Benchimol J.L. Dos micróbios aos mosquitos: febre amarela e revolução pasteuriana no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz / Editora da UFRJ, 1999.

Bryant J.E, Barrett A.D.T. Comparative phylogenies of yellow fever isolates from Peru and Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol 39, 103-118. 2003.

Bryant, J. E., E. C. Holmes, Barrett, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. PLoS Pathog. 3:e75. 2007.

Camargo-Neves V.L, Poletto D.W, Rodas L.A, Pachiolo M.L, Cardoso R.P, Scandar S. A, Sampaio S.M, Koyanagui P.H, Botti M.V, Mucci L.F, Gomes A.C. Entomological investigation of a sylvatic yellow fever area in São Paulo State, Brazil. Cad. Saude Publica 21 (4), 1278-1286. 2005.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Yellow fever alert for Brazil – updated, 09 January 2009. [Accessed 26 February 2009]. Available at: http://wwwn.cdc.gov/travel/contentYellowFeverBrazil.aspx).

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).. Yellow fever vaccine; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR; 51(No. RR-17). 2002.

Chambers T.J, Hahn C.S, Galler R, Rice C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Ann Rev Microbiol 1990; 44

Chippaux A, Deubel V, Moreau J.P, Reynes J.M. Current situation of yellow fever in Latin America [French]. Bull Soc Pathol Exot;86(5Pt 2):460–4. 1993.

Chong Y.L, Padhi A, Hudson P.J, Poss M. The Effect of Vaccination on the Evolution and Population Dynamics of Avian Paramyxovirus-1. PLoS Pathog 6(4): e1000872. doi:10.1371/journal.ppat.1000872. 2010

Costa J, Peterson A.T, Beard C.B. Ecological niche modeling and differentiation of populations of Triatoma brasiliensis Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am J Trop Med Hyg. 67:516–20. 2002.

Costa Z.G.A, Oliveira R.C, Tuboi S.H, Silva M.M, Vasconcelos P.F.C. Redefinição das áreas de risco para febre amarela silvestre no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35 (supl I): 84, 2002.

De Almeida, M.A.B; Santos, E; Cardoso, J.C; Fonseca, D.F; Noll, C.A ; Silveira, V.R; Maeda, A.Y; Souza, R.P; Kanamura, C; Brasil, R.A. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. American Journal of Primatology (Print) JCR, v. 73, p. n/a-n/a, 2011.

Dégallier N, Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, Sá Filho GC, Travassos da Rosa JFS. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. *Brazilian Journal of the Association for Advancement of Science* 44:136-142, 1992.

Deubel V, Huerre M, Cathomas G, Druet M.T, Wuscher N, Guenno B.L, Widmer A.F. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. J Med Virol 53, 212-217. 1997.

Digoutte J.P, Cornet M, Deubel V, Downs W.G. Yellow fever. In: *Porterfield JS (ed) Exotic Viral Infections, Chapman* + *Hall Medical, London,* p. 67-102, 1995.

Donalisio M, Peterson A. Environmental factors affecting transmission risk for hantaviruses in forested portions of southern Brazil. Acta Tropica. 2011

Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, Pybus, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. Mol. Biol. Evol. 22:1185-1192. 2005.

Drummond, A. J., Rambaut, A BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7:214. 2007

Drummond, A. J., S. Y. Ho, M. J. Phillips, Rambaut, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biol. 4:e88. 2006.

Dutary, B. E., Leduc, J. W. Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, Haemagogus equinus. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75:128. 1981.

Fialho, M S; Printes, R C; Almeida, M A B; Laroque, P O; Santos, E; Jerusalinsky, L . Avaliação do impacto da epizootia de Febre Amarela sobre as populações de primatas não humanos nas unidades de conservação do Rio Grande do Sul, Brasil. Biotemas, v. 25, p. 217-225, 2012.

Figueiredo Lt. The Brazilian flaviviruses. Microbes Infect 2: 1643–1649. 2000.

Filippis A M B, Nogueira R M R, Schatzmayr H G, Tavares D S, Jabor A V, Diniz S C M, Oliveira J C, Moreira E, Miagostovich M P, Costa E V, Galler R. Outbreak of jaundice and hemorrhagic fever in the Southeast of brazil in 2001: detection and molecular charcterization of yellow fever virus. Journal of Medical Virology. 68:620-627. 2002.

Forattini O P. *Culicidologia médica*. Sao Paulo: Edusp, 2002.

Forattini, O.P. Entomologia médica. São Paulo: Edusp, Vol. 3. 1965.

Franco, O. História da febre amarela no Brasil. Brasília, Ministério da Saúde, 1976.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Manual de Vigilancia Epidemiologica de Febre Amarela. Ministerio da Saude, Brasilia, DF, Fundação Nacional de Saúde, 2005.

Fundação Nacional de Saúde. Plano de Intensificação de controle da febre amarela no Brasil. *Fundação Nacional de Saúde*, Brasília (Mimeografado), 2001.

Galler R, Pugachev K V, Santos C L S, Ochran S W, Jabor A V, Rodrigues S G, Marchevsky R S, Freire M S, Almeida L F C, Cruz A C R, Yamamura A M Y, Rocco I M, Rosa E S T, Souza L T M, Vasconcelos P F C, Guirakhoo F, Monath T P. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 290:309-319, 2001.

Gregorin R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero Alouatta Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. Rev Bras Zool. 23:64-144. 2006.

Gubler, D.J.; Kuno, G.; Sather, G.E.; Velez, M. & OliveR, A. Mosquito cell culture and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. Am. J. trop. Med. Hyg., 33: 158-165, 1984.

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

Hein, J.; M. Schierup, H., And C. Wiuf, Gene Genealogies, Variation and Evolution: a Primer in Coalescent Theory (Oxford University Press, Oxford, 2005).

Hervé J P, Dégallier N, Sa Filho, G.C., Travassos da Rosa A.P.A. Ecologia da febre amarela silvestre no Brasil. Revista da Fundaçao SESP, 31 (2), p. 131-134. 1986.

Holmes E C. The Evolution and Emergence of RNA Viruses. Oxford University Press: New York, NY, USA, 2009

Holmes, E. C. 2004. "The phylogeography of human viruses". Molecular Ecology 13 (4): 745–756. 2004

Holzmann, I., I. Agostini, J. Areta, H. Ferreyra, P. Beldomenico, M. Di Bitetti. Impact of Yellow Fever Outbreaks on Two Howler Monkey Species (Alouatta guariba

clamitans and A. caraya) in Misiones, Argentina. American Journal of Primatology, 72: 475–480. 2010.

igarashi A. Isolation of Singh´s Aedes albopictus cell line clone sensitive to dengue and chikungunya virus. J. Gen. Virol., 40: 531-544, 1978.

Jennings A D, Gibson C A, Miller B R, Matthews J H Mitchell C J, Roehrig J T, Wood D J, Taffs F, Sil B K, Whitby S N, Minor P D, Monath T P, Barrett A D T. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. Journal of Infectious Diseases 169:512-518, 1994.

Kelso J M, Mootrey G T, Tsai T S. Anaphylaxis from yellow fever vaccine. *Journal of Allergy Clinical and Immunology* 103: 698-701, 1999.

Knowles, L. L.; Maddison W. P Statistical phylogeography. Molecular Ecology 11 (12): 2623–2635. 2002.

Kühnert D, Wu C H, Drummond A. J Phylogenetic and epidemic modeling of rapidly evolving infectious diseases. Infection, Genetics and Evolution: 1825-1841. 2011.

Lemey P, Salemi M, Vandamme A (Ed.). The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis & hypothesis testing. 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 2009

Lemey, P., A. Rambaut, A. J. Drummond, Suchard, M. A. Bayesian phylogeography finds its roots. PLoS Comput. Biol. 5:e1000520. 2009.

Lima, M A; Romano-Lieber, N S; Duarte, A M R C. Circulation of antibodies against yellow fever virus in a simian population in the area of Porto Primavera Hydroelectric Plant, São Paulo, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo, v. 52, n. 1, Feb. 2010

Lozier, J., Aniello, P.,& Hickerson, M. Predicting the distribution of Sasquatch in western North America: anything goes with ecological niche modelling Journal of Biogeography DOI: 10.1111/j.1365-2699.2009.02152.x. 2009.

Lynch Alfaro, J.W., Boubli, J.P., Olson, L.E., Di Fiore, A., Wilson, B., Gutiérrez-Espeleta, G.A., Chiou, K.L., Schulte, M., Neitzel, S., Ross, V., Schwochow, D., Nguyen, M.T., Farias, I., Janson, C.H. & Alfaro, M.E. Explosive Pleistocene range

expansion leads to widespread Amazonian sympatry between robust and gracile capuchin monkeys. Journal of Biogeography, 39, 272–288. 2012.

Martins R M; Galler R; Freire M S; Camacho L M A; Maia L M S; Homma A. Yellow fever vaccination: Some thougths on how much is enough (Vaccine 23(2005)3908-3914). *Science Direct*, Vol 25, Issue 1, p10-11; Jan 2007.

Miller R H, Masuoka P, Klein T A, Kim H C, Somer T, et al. Ecological Niche Modeling to Estimate the Distribution of Japanese Encephalitis Virus in Asia. PLoS Negl Trop Dis 6(6): e1678. doi:10.1371/journal.pntd.0001678. 2012.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, CID10 A95, p: 307-324. 2005a.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005b.

Monath T P. 2008. Treatment of yellow fever. Antiviral Res 78, 116-124. 2008a

Monath, T P, editor. The Arboviruses: ecology and epidemiology. Yellow fever, vol V. Boca Raton (FL): CRC Press; p 139-231. 1988b.

Mondet, B., P. F. Vasconcelos, A. P. Travassos Da Rosa, E. S. Travassos Da Rosa, S. G. Rodrigues, J. F. Travassos Rosa, And D. J. Bicout. Isolation of yellow fever virus from nulliparous Haemagogus (Haemagogus) janthinomys in eastern Amazonia. Vector Borne Zoonotic Dis. 2:47-50. 2002.

Moreno, E S. ; Rocco, I M. ; Bergo, E S ; Brasil,R A ; Siciliano, M M ; Suzuki, A. ; Silveira, V R ; Bisordi, I. ; Souza, R. P. et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso) JCR, v. 44, p. 290-296, 2011.

Mutebi J P, Wang H, Li L, Bryant J E, Barrett A D T. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. J Virol 75:6999-7008. 2001.

Pan American Health Organization. Yellow fever situation in the Americas, 10 February 2009. Accessed 26 February 2009. Available at: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=vie. 2009.

Penna, H. A., And A. Bittencourt. Persistence of yellow fever virus in the brains of monkeys immunized by cerebral inoculation. Science 97:448-449. 1943.

Peterson A T, Bauer J T, Mills J N. Ecologic and geographic distribution of filovirus disease. Emerg Infect Dis. 10:40–7. 2004a.

Peterson A T, Carroll D, Mills J N. Potential mammalian filovirus reservoirs. Emerg Infect Dis. 10:2073–81. 2004b.

Peterson A T, Lash R R, Carroll D S, Johnson K M. Geographic potential for outbreaks of Marburg hemorrhagic fever. Am J Trop Med Hyg. 75:9–15. 2006.

Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. Ecological Modelling, 190, 231–259. 2006.

Pierre, V., M.-T. Drouet, And V. Deubel. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. Res. Virol. 145:93-104. 1994.

Pinto, C.S.; Confalonieri, U.E.C. & Mascarenhas, B.M. Ecology of Haemagogus sp. and Sabethes sp. (Diptera: Culicidae) in relation to the microclimates of the Caxiuanã National Forest, Pará Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 104: 592-598, 2009.

Quental T B, Marshall C R. The Molecular Phylogenetic Signature of Clades in Decline. PLoS ONE 6(10): e25780. doi:10.1371/journal.pone.0025780. 2011.

Ribeiro M A R. História sem Fim... Um inventário da saúde pública. São Paulo: UNESP, 1993.

Robert E, Vial T, Schaefer C, Arnon J, Reuvers M. Exposure to yellow fever vaccine in early pregnancy. *Vaccine* 17:283-285, 1999.

Robertson S E, Hull B P, Tomori O, Bele O, Leduc J W, Esteves K. Yellow Fever. A decade of reemergence. *Journal of the American Medical Association* 276:1157-1162, 1996.

Rocco, I.M.; Katz, G.; Tubaki, R.M. et al. - Febre amarela silvestre no Estado de São Paulo: casos humanos autóctones. Rev. Inst. Adolfo Luz, 62(3): 201-206, 2003.

Ruiz-García M, Escobar-Armel P, Alvarez D, Mudry Md, Ascunce M, Gutierrez-Espeleta G. Genetic variability in four Alouatta species measured by means of nine DNA microsatellite markers: Genetic structure and recent bottlenecks. Folia Primatol. 78:73-87. 2007.

Sall, A. A., O. Faye, M. Diallo, C. Firth, A. Kitchen, And E. C. Holmes. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. J. Virol. 84:765-772. 2009.

Secretaria de Estado da Saude de São Paulo. Febre Amarela Silvestre, Estado de São Paulo, 2009. Boletim Eletrônico, www.cve.saude.sp.gov.br. Dezembro, 2009.

Soper F L. Ventures in world health. Report number 355. Pan American Health Organization PAHO scientific publication. Washington (D. C.): Pan American Health Organization. 1977

Souza, R. P. ; Foster, PG. ; Sallum, M A M. ; Coimbra, T L.M. ; Maeda, A Y. ; Silveira, V R. ; Moreno, E S. ; Da Silva, F G. ; Rocco, I M. ; Ferreira, i B. ; Suzuki, A ; Oshiro, F M. ; Petrella, SM.C.N. ; Pereira, L E. ; Katz, G ; Tengan, C H. ; Siciliano, M M. ; Dos Santos, C L.S. . Detection of a new yellow fever virus lineage within the

South American genotype I in Brazil. Journal of Medical Virology (Print) JCR, v. 82, p. 175-185, 2010.

Souza, RP ; Petrella, ; Coimbra, T L M ; Maeda, A Y ; Rocco, I M ; Bisordi, I ; Silveira, V R ; Pereira, L E ; Suzuki, A ; Silva, S J S ; Silva, F G ; Salvador, F S; Tubaki, R M ; Menezes, R T ; Pereira, M ; Bergo, E S ; Hoffmann, R C ; Spinola, R M F ; Tengan, C H ; Siciliano, M M . Isolation of yellow fever virus (YFV) from naturally infectied Haemagogus (Conopostegus) leucocelaenus (diptera, cukicudae) in São Paulo State, Brazil, 2009. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Impresso) JCR, v. 53, p. 133-139, 2011.

Teixeira L A. Da transmissão hídrica a culicidiana: a febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. Rev. bras. Hist, vol. 21; no 41. Print ISSN 01202-0188, São Paulo, 2001

Travassos Da Rosa A P A; Travassos Da Rosa E S; Travassos Da Rosa J F S; Degallier N; Vasconcelos P F C; Rodrigues S G; Cruz C R. Os arbovirus no Brasil: Generalidades, Métodos e Técnicas de Estudo. *Documento Técnico n°2 – Instituto Evandro Chagas*, FUNASA e MS. 1994.

Tsai T F, Paul R, Lynberg M C, Letson G W. Congenital yellow fever virus infection after immunization in pregnancy. *Journal of Infectious Diseases* 168:1520-1523, 1993.

Twiddy S S, Pybus O G, Holmes E C. Comparative population dynamics of mosquito-borne flaviviruses. Infect Genet Evol 3, 87-95. 2003.

Vainio J., And F. Cutts. Yellow fever. WHO/EPI/GEN/98.11. Wkly. Epidemiol. Rec. 1998:349-359. 1998.

Van Der Stuyft P, Gianell A, Pirard M, Cespedes J, Lora J, Peredo C, Pelegrino J L, Vorndam V, Boelaert M Urbanization of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. Lancet 353: 1558-1562. 1999.

Vasconcelos P F C, Costa Z G, Travassos Da Rosa E S, Luna E, Rodrigues S G, Barros V L R S, Dias J P, Monteiro H A O, Oliva O F P, Vasconcelos H B, Oliveira R C, Sousa M R S, Barbosa Da Silva J, Cruz A C R, Martins E C, Travassos Da Rosa J F S. An epidemic of jungle Yellow fever in Brazil, 2000. Implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of Medical Virology* 65:598-604, 2001a.

Vasconcelos P F C, Rodrigues S G, Dégallier N, Moraes M A P, Travassos Da Rosa J F S, Travassos Da Rosa E S, Mondet B, Barros V L R S, Travassos Da Rosa A P A. An epidemic of sylvatic yellow fever in the Southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: epidemiologic and entomologic findings. Am J.Trop.Med Hyg 57, 132-137. 1997a.

Vasconcelos P F C, Sperb A F, Monteiro H A O, Torres M A N, Sousa M R S, Vasconcelos H B, Mardini L B Lf, Rodrigues S G. Isolations of yellow fever virus from Haemagogus leucocelaenus in Rio Grande do Sul State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 97 (1), 60-62. 2003.

Vasconcelos P F C, Travassos Da Rosa A P A, Pinheiro F P, Dégallier N, Travassos Da Rosa J F S. Febre amarela. In: *Leão RNQ (ed) Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Enfoque Amazônico. Editora CEJUP, Belém, p. 265-284, 1997b.

Vasconcelos P F C, Travassos Da Rosa A P A, Rodrigues S G, Travassos Da Rosa E S, Monteiro H A O, Cruz A C R, Barros V L R, Souza M R S, Travassos Da Rosa J F S. Yellow fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998-1999. Entomologic and epidemiologic findings. Emerging Infectious Disease 7:565-569, 2001b

Vasconcelos P F C, Travassos Da Rosa A P A, Rodrigues S G, Travassos Da Rosa E S, Dégallier N, Travassos Da Rosa J. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arbovirus. Cad. Saúde Pública 175 (Suplem.), 155-164. 2001c.

Vasconcelos P F C. Febre amarela Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(2):275-293, mar-abr, 2003.

Vasconcelos P F C. Febre Amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. Rev Bras Epidemiol 5(2), 244-258. 2002.

Vasconcelos, P. F., J. E. Bryant, T. P. Da Rosa, R. B. Tesh, S. G. Rodrigues, And A. D. Barrett. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 10:1578-1584. 2004.

Vasconcelos, P F C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. Rev. Saúde Pública. vol.44, n.6. pp. 1144-1149 . 2010.

Wang, T. H., Y. K. Donaldson, R. P. Brettle, J. E. Bell, And P. Simmonds. Identification of shared populations of human immunodeficiency virus type 1 infecting microglia and tissue macrophages outside the central nervous system. J. Virol. 75:11686-11699. 2001.

Wei L, Qian Q, Wang Z, Glass G, Song S, Zhang W, Li X J, Yang H, Wang X, Fang L, Cao W. Using geographic information system-based ecologic niche models to forecast the risk of hantavirus infection in Shandong Province, China. Am J Trop Med Hyg. 84:497–503. 2011.

Xie, H., K. D. Ryman, G. A. Campbell, And A. D. Barrett. Mutation in NS5 protein attenuates mouse neurovirulence of yellow fever 17D vaccine virus. J. Gen. Virol. 79:1895-1899. 1998.

Zanotto P M A, Gould E A, Gao G F, Harvey Ph, Holmes E C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. Proc Nat Acad Sci 93:548-553. 1996.