

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DAÍSE MARIA CUNHA DE SOUSA**

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS  
VÍRUS DENGUE CIRCULANTES NO RIO GRANDE DO NORTE,  
2013-2014.**

**NATAL**

**2015**

DAÍSE MARIA CUNHA DE SOUSA

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE  
CIRCULANTES NO RIO GRANDE DO NORTE, 2013-2014.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, Centro de Biociências,  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte, como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Josélio Maria Galvão  
de Araújo.

NATAL

2015

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de  
Biociências

Sousa, Daíse Maria Cunha de.

Epidemiologia e caracterização molecular dos vírus dengue  
circulantes no Rio Grande do Norte, 2013-2014 / Daíse Maria Cunha de  
Sousa. – Natal, RN, 2015.

76 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas.

1. Epidemiologia – Dissertação. 2. Rio Grande do Norte. –  
Dissertação. 3. Vírus dengue. – Dissertação. I. Araújo, Josélio Maria  
Galvão de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616-036.22

DAÍSE MARIA CUNHA DE SOUSA

EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE  
CIRCULANTES NO RIO GRANDE DO NORTE, 2013-2014.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, Centro de Biociências,  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte, como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Linha de Pesquisa: Biologia Parasitária e  
Microbiológica.

Aprovada em

31/03/2015

Examinadores:

Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes (Presidente) - Universidade Federal do Rio Grande  
do Norte

Prof. Dr. Kleber Juvenal Silva Farias (1º examinador) - Universidade Federal do Rio  
Grande do Norte

Prof. Dr. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes (2º examinador) - Universidade  
do Estado do Rio Grande do Norte

NATAL

2015

Dedico este trabalho  
aos meus pais José Dezio e Maria Dalvany,  
ao meu esposo Rômulo Machado  
e à minha irmã Denise Sousa.  
Obrigada pelo apoio de sempre!

## AGRADECIMENTOS

O primeiro e maior de todos os meus agradecimentos é a Deus. Agradeço imensamente pelo dom da vida e por não me deixar fraquejar, até quando tudo conspira para isto.

Agradeço aos meus pais, José Dezio e Maria Dalvany, pelo exemplo de família, por todos os ensinamentos e apoio ao longo dos meus anos de vida. Obrigada por sempre terem feito de tudo para que eu estudasse e somente estudasse.

Um agradecimento cheio de carinho ao meu esposo Rômulo Machado, que tanto me ouviu reclamar, que enxugou minhas lágrimas nos momentos difíceis e sempre esteve aqui.

Agradeço à minha irmã Denise Sousa, que é antes de tudo a minha grande amiga. Obrigada por todos os conselhos, momentos felizes e por todos os toques na universidade.

Ao Dr. Josélio Araújo, por ter me aceitado em seu laboratório em 2010 e por ao longo destes anos ter sido um verdadeiro orientador, indo para bancada junto comigo e me ensinando o que hoje sei de biologia molecular. Sem sua grande dedicação este trabalho não seria possível!

Aos colegas do laboratório, os que passaram e os que ainda permanecem lá. Obrigada por fazerem da rotina de experimentos algo mais divertido... obrigada pelas inúmeras risadas e ajudas!

Ao Laboratório Central Doutor Almino Fernandes pela importante parceria, através do fornecimento das amostras.

À Dra. Laura Gil (Fiocruz/PE) por disponibilizar o sequenciador, fundamental para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN) pelo apoio financeiro.

Ao professor Dr. José Veríssimo Fernandes por aceitar o convite de substituir meu orientador nas bancas de qualificação e defesa. Obrigada pela disponibilidade e grandes sugestões.

Aos professores Dr.<sup>a</sup> Renata Antonaci Gama, Dr. Carlos Alfredo Galindo Blaha, Dr. Kleber Juvenal Silva Farias e Dr. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes por

aceitarem participar das bancas de qualificação e defesa, contribuindo desta forma para o enriquecimento do nosso trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

## RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa aguda, geralmente transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*. O agente etiológico pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e compreende quatro sorotipos antigenicamente relacionados, porém distintos: DENV-1, 2, 3 e 4. No Brasil, a doença representa um problema de saúde pública nacional. O objetivo do presente estudo foi descrever os aspectos epidemiológicos da dengue no Estado do Rio Grande do Norte, no período de 2013 a 2014. Um total de 483 amostras de sangue ou soro, no período de Janeiro de 2013 a Dezembro de 2014, foi estudado pela metodologia de RT-PCR para a detecção e tipagem viral. A infecção foi confirmada em 36,44% (176/483) dos casos estudados. Este estudo detectou a circulação de três sorotipos do vírus da dengue no Rio Grande do Norte, DENV-1, 2 e 4. O sorotipo predominante em 2013-2014 foi o DENV-4, representando 83,51% (81/97) e 68,35% (54/79) dos casos positivos, respectivamente. Em relação à distribuição espacial, a maioria dos casos ocorreu em Natal e Caicó, com 9,28% (9/97) e 18,99% (15/79), respectivamente. Os meses com maior circulação viral no RN foram Março, em 2013 e Maio, em 2014. O sexo feminino foi o mais acometido, representando 69,07% (67/97) em 2013 e 54,43% (43/79) em 2014. A faixa etária mais acometida foi a de 21-30 anos (2013) e a de 11-20 anos (2014), com 25,77% (25/97) e 20,25% (16/79) dos casos positivos, respectivamente. A análise filogenética indicou que o genótipo V (DENV-1) e o genótipo II (DENV-4) circularam no Estado. Nossos resultados fornecem informações sobre a dinâmica dos DENV no Rio Grande do Norte, importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle da doença.

Palavras-chave: Vírus Dengue; Epidemiologia; Rio Grande do Norte.

## ABSTRACT

Dengue is an acute infectious disease, usually transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. The etiologic agents belong to the family Flaviviridae, genus *Flavivirus*, and occur as four antigenically related but distinct serotypes designated DENV-1, 2, 3, and 4. In Brazil, the disease represents a national public health problem. The purpose of the present study was to describe epidemiological aspects of dengue in the State of Rio Grande do Norte, from 2013 to 2014. A total of 483 blood or serum samples, collected from January 2013 to December 2014, were studied by RT-PCR for viral detection and typing. The infection was confirmed in 36.44% (176/483) of the cases studied. This study detected the circulation of three serotypes of dengue virus in Rio Grande do Norte, DENV-1, 2, and 4. The predominant serotype in 2013-2014 was the DENV-4, representing 83.51% (81/97) and 68.35% (54/79) of the positive cases, respectively. Regarding the spatial distribution, most of the cases occurred in Natal and Caicó, with 9.28% (9/97) and 18.99% (15/79), respectively. The months with the biggest viral circulation in RN were March 2013 and May 2014. The female gender was the most affected, representing 69.07% (67/97) in 2013 and 54.43% (43/79) in 2014. The most affected age groups were 21-30 years (2013) and 11-20 years (2014) with 25.77% (25/97) and 20.25% (16/79) positive cases, respectively. Phylogenetic analysis indicated that genotype V (DENV-1) and genotype II (DENV-4) circulated in the State. Our results provide information about the dynamics of DENV in the Rio Grande do Norte, important for the development of disease control strategies.

Keywords: Dengue Virus; Epidemiology; Rio Grande do Norte.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Família Flaviviridae. Árvore Filogenética construída com base na análise da região NS3 (Adaptado de Lindenbach et al., 2007).....	4
<b>Figura 2</b> - Ilustração da organização do genoma dos DENV (Adaptado de Weaver & Vasilakis, 2009).....	5
<b>Figura 3</b> - Replicação do vírus da dengue (Adaptado de Rodenhuis-Zybert et al., 2010).....	7
<b>Figura 4</b> - Classificação da dengue em níveis de gravidade sugerida pela Organização Mundial de Saúde (Adaptado de World Health Organization, 2009).....	14
<b>Figura 5</b> - Comparação de testes de diagnóstico de acordo com a sua acessibilidade e confiança (Adaptado de Peeling et al., 2010).....	18
<b>Figura 6</b> - Localização do Estado do Rio Grande do Norte (Branco, 2014).....	30
<b>Figura 7</b> - Meso e microrregiões do Estado do Rio Grande do Norte (Adaptado de Nascimento et al., 2009).....	30
<b>Figura 8</b> - Distribuição de sorotipos detectados por mês, 2013 a 2014.....	42
<b>Figura 9</b> - Mapa do Rio Grande do Norte demonstrando a distribuição geográfica dos sorotipos do vírus DENV, ano 2013.....	43
<b>Figura 10</b> - Mapa do Rio Grande do Norte demonstrando a distribuição geográfica dos sorotipos do vírus DENV, ano 2014.....	43
<b>Figura 11</b> - Distribuição mensal de casos confirmados e estudados de dengue, 2013-2014.....	48
<b>Figura 12</b> - Casos positivos de dengue por gênero, 2013-2014.....	49
<b>Figura 13</b> - Casos positivos de dengue por faixa-etária, 2013-2014.....	50
<b>Figura 14</b> - Árvore filogenética dos DENV-1.....	51
<b>Figura 15</b> - Árvore filogenética dos DENV-4.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.....	32
<b>Tabela 2</b> - Relação dos reagentes utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção dos sorotipos dos vírus dengue....	33
<b>Tabela 3</b> - Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope do DENV-1 (Araújo, 2009b).....	35
<b>Tabela 4</b> - Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-4 (Sousa, 2014; Branco, 2014).....	35
<b>Tabela 5</b> - Valores de referência para quantificação do DNA para a reação de sequenciamento.....	38
<b>Tabela 6</b> - Percentual de detecção dos DENV por ano de estudo.....	41
<b>Tabela 7</b> - Relação dos casos positivos, percentual de positividade e sorotipos detectados por municípios do Estado do Rio Grande do Norte, ano 2013.....	45
<b>Tabela 8</b> - Relação dos casos positivos, percentual de positividade e sorotipos detectados por municípios do Estado do Rio Grande do Norte, ano 2014.....	46
<b>Tabela 9</b> - Distribuição mensal dos casos confirmados, casos estudados e sorotipos detectados da dengue no Estado do Rio Grande do Norte, ano 2013.....	47
<b>Tabela 10</b> - Distribuição mensal dos casos confirmados, casos estudados e sorotipos detectados da dengue no Estado do Rio Grande do Norte, ano 2014.....	47
<b>Tabela 11</b> - Amostras selecionadas para caracterização molecular com seus respectivos sorotipo, município de origem e ano de coleta.....	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

*A. aegypti*: *Aedes aegypti*

*A. albopictus*: *Aedes albopictus*

BA: Bahia

BR: Brasil

C: Proteína estrutural do capsídeo viral

cDNA: DNA complementar

DC: Dengue clássica

DENV: Vírus dengue

DENV-1: Sorotipo 1 dos vírus dengue

DENV-2: Sorotipo 2 dos vírus dengue

DENV-3: Sorotipo 3 dos vírus dengue

DENV-4: Sorotipo 4 dos vírus dengue

DNA: Ácido desoxirribunucleico

E: Proteína estrutural do envelope

FHD: Febre hemorrágica da dengue

FUNASA: Fundação Nacional de Saúde

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-10: Interleucina 10

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1  $\beta$

IL-2: Interleucina 2

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

LACEN-RN: Laboratório Central Doutor Almino Fernandes

LADIC: Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer

M: Proteína estrutural da membrana

MAC-ELISA: do inglês, *IgM Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*

NC: Não codificante

NS: Proteína não estrutural do vírus

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF: do inglês, *open reading frame*

Pb: Pares de bases

PCR: Reação em cadeia pela polimerase

PEAa: Plano de Erradicação do *Aedes aegypti*

PIACD: Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue

PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue

PrM: Proteína estrutural Pré-Membrana

RN: Rio Grande do Norte

RNA: Ácido ribonucleico

Rpm: Rotação por minuto

RT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

SCD: Síndrome de choque da dengue

TBE: Tris Borato EDTA

TM: do inglês, *melting temperature*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Breve histórico.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. O agente etiológico.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Diversidade genética.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Os vetores.....</b>	<b>10</b>
1.4.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	10
1.4.2. <i>Aedes albopictus</i> .....	12
<b>1.5. A doença.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6. Patogênese.....</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Diagnóstico laboratorial.....</b>	<b>17</b>
<b>1.8. Tratamento atual e perspectivas.....</b>	<b>20</b>
<b>1.9. Aspectos epidemiológicos.....</b>	<b>21</b>
1.9.1. Dengue nas Américas.....	22
1.9.2. Dengue no Brasil.....	23
1.9.3. Dengue no Rio Grande do Norte.....	24
<b>1.10. Controle.....</b>	<b>25</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Objetivo geral .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Tipo de estudo.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Local de estudo.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. População de estudo .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. Fonte de dados .....</b>	<b>31</b>
<b>4.5. Diagnóstico molecular da infecção pelos vírus DENV.....</b>	<b>31</b>
4.5.1. Extração do RNA viral.....	31
4.5.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	32
<b>4.6. Caracterização molecular.....</b>	<b>34</b>
4.6.1. Elaboração do banco de sequências nucleotídicas.....	34

4.6.2. Sequenciamento do gene do envelope.....	34
4.6.2.1. Oligonucleotídeos iniciadores.....	35
4.6.2.2. RT-PCR para sequenciamento.....	36
4.6.2.3. Purificação direta do produto de PCR.....	36
4.6.2.4. Purificação do produto de PCR por extração de gel de agarose...37	
4.6.2.5. Quantificação do DNA.....	38
4.6.2.6. Reação de sequenciamento.....	39
4.6.2.7. Purificação do DNA para remoção de dye terminators e processamento da amostra.....	39
<b>4.7. Análise das sequências.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8. Análise de dados.....</b>	<b>40</b>
<b>4.9. Considerações éticas.....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. Monitoramento dos sorotipos dos vírus DENV circulantes no Rio Grande do Norte, 2013-2014.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Distribuição geográfica dos casos de dengue nos municípios do Rio Grande do Norte, 2013-2014.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. Análise de sazonalidade.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com o gênero.....</b>	<b>48</b>
<b>5.5. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com a faixa-etária.....</b>	<b>49</b>
<b>5.6. Caracterização molecular dos vírus DENV isolados no Rio Grande do Norte, 2013-2014.....</b>	<b>50</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>6.1. Monitoramento dos sorotipos dos vírus DENV circulantes no Rio Grande do Norte,2013-2014.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2. Distribuição geográfica dos casos de dengue nos municípios do Rio Grande do Norte, 2013-2014.....</b>	<b>55</b>
<b>6.3. Análise de sazonalidade.....</b>	<b>56</b>
<b>6.4. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com o gênero.....</b>	<b>57</b>
<b>6.5. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com a faixa-etária.....</b>	<b>57</b>

<b>6.6.Caracterização molecular dos vírus DENV isolados no Rio Grande do Norte, 2013-2014.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A dengue corresponde à arbovirose que acomete o ser humano de maior importância atualmente, causando, em escala global, considerável morbidade e mortalidade em áreas tropicais, o que a torna um grave problema de saúde pública em todo o mundo (Brasil, 2009; Holmes et al., 2009). Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem, em consequência da doença, o que constitui uma grande ameaça a milhões de pessoas que vivem em zonas urbanas, suburbanas e ambientes rurais (Goméz-Dantés & Willoque, 2009; Ministério da Saúde, 2012). É a doença viral transmitida por mosquitos de mais rápida propagação no mundo (World Health Organization, 2009). Estima-se que cerca de 2,5 a 3 bilhões de pessoas estão sob risco de se infectarem com o vírus dengue (Barbosa et al., 2012).

Sendo uma doença essencialmente urbana, fatores como a urbanização sem planejamento, migração da população, entre outros, tem contribuído para a propagação do vetor e a disseminação do vírus (Hombach, 2007). A dengue apresenta caráter endêmico, principalmente nos países tropicais, uma vez que estes possuem condições climáticas e ambientais favoráveis ao desenvolvimento e proliferação do mosquito vetor (Brasil, 2009).

Hoje o controle da dengue é uma prioridade em muitos países endêmicos, o que a tornou objeto da maior campanha de saúde pública do Brasil, que consiste no combate ao *Aedes aegypti*, principal vetor de transmissão (Hombach, 2007; Câmara et al., 2007).

O Estado do Rio Grande do Norte, além de apresentar condições socioambientais ideais para a proliferação do vetor, atrai um expressivo número de turistas por ano, em virtude de suas belezas naturais, o que favorece o aparecimento de novas doenças e a re-introdução de outras já erradicadas.

### **1.1. Breve histórico**

De acordo com relatos encontrados em textos médicos da Antiguidade, a dengue corresponde a uma doença bastante antiga (Lupi et al, 2007). O relato mais antigo corresponde ao de uma enciclopédia chinesa, publicada primeiramente durante a

Dinastia Chin, no período de 265 - 420 d. C., formalmente editada na Dinastia Tang, em 610 d. C., e novamente em 992 d. C. Neste relato são descritos os remédios, bem como os sintomas da doença, que naquela ocasião foi chamada de “veneno de água”, onde já ficava clara a conexão de insetos voadores com a água (Gubler, 1998).

Há relatos na literatura médica de uma doença semelhante nas Índias Francesas Ocidentais, em 1635, e no Panamá, em 1699 (Gubler, 1998). No Brasil, faz-se referência a ela desde 1846 (Braga & Valle, 2007).

O atual termo “dengue”, de origem espanhola, foi introduzido na literatura médica em 1828 durante uma epidemia que ocorreu no Caribe, em 1827-1828. Este termo corresponde a um homônimo para “Ki denga pepo”, expressão africana que significa “cãimbra súbita causada por maus espíritos” (Halstead, 1980).

No final do século 18 a dengue se distribuiu de maneira global, com epidemias que ocorreram quase simultaneamente em 1779 no Egito e Indonésia. Em 1780 chegou aos Estados Unidos, atingindo a cidade da Filadélfia, na Pensilvânia. Estas epidemias continuaram comuns durante o século 19 (Gubler, 1998).

Uma melhor compreensão da dengue ocorreu somente nos primeiros anos do século 20, onde através de várias descobertas, questões como ecologia e ciclo de transmissão foram elucidadas (Weaver & Vasilakis, 2009). A descoberta de que o agente etiológico da dengue estava presente no sangue e que era filtrável foi atribuída à Ashburn e Craig que, em 1907, usando voluntários humanos, confirmaram esta hipótese (Ashburn & Craig, 1907).

A primeira suspeita do envolvimento do *Aedes aegypti* na transmissão do vírus foi relatada por Bancroft (Bancroft, 1907) e confirmada por Cleland e colaboradores em 1918. Outras contribuições de Cleland et al. foram as descobertas de que o vírus é resistente às condições fora do corpo por vários dias (99 horas) e que está presente no sangue tão cedo quanto 18 horas após o início dos sintomas e tão tarde como 90 horas depois (Cleland et al., 1919).

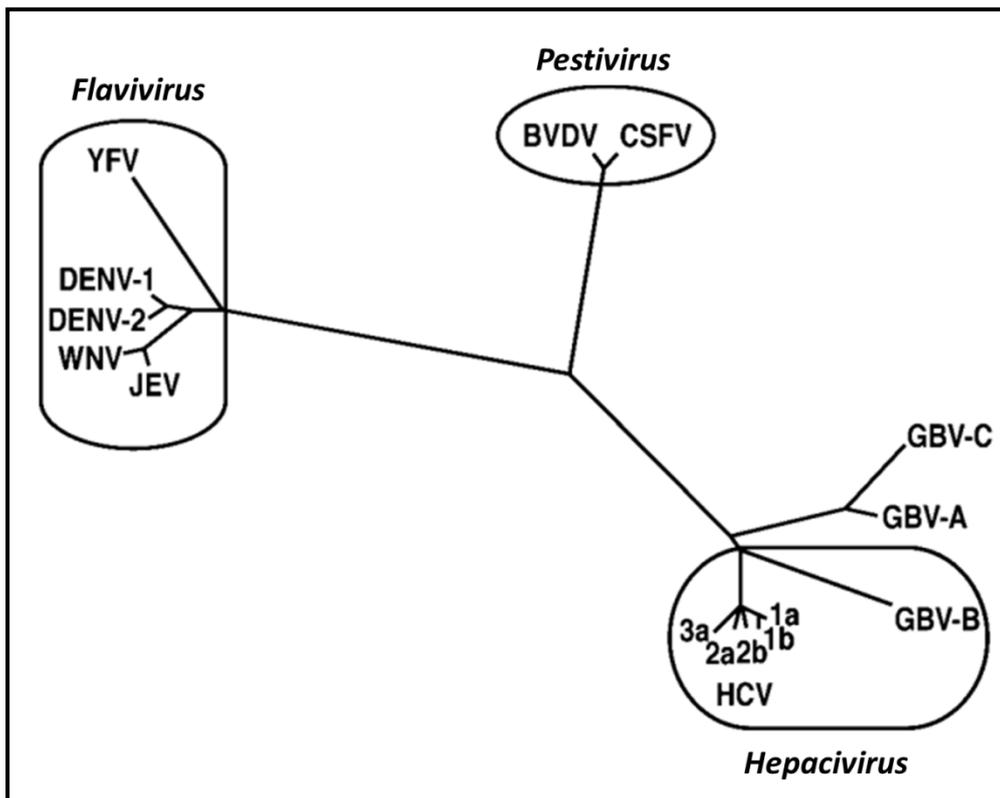
Cepas do vírus da dengue foram isoladas a partir do sangue de pacientes e inoculadas em camundongos, em 1943, por Kimura e Hotta (Kimura & Hotta, 1944) e, um ano depois, por Sabin e Schlesinger, após algumas tentativas sem êxito. Entre as cepas isoladas neste período, oriundas de surtos no Havaí e Nova Guiné, determinou-se a existência de dois sorotipos diferentes, DENV-1 e DENV-2, que apesar de estreitamente relacionados, eram antigenicamente distintos (Sabin & Schlesinger 1945; Sabin, 1952). Em 1956 os outros sorotipos, DENV-3 e DENV-4, foram isolados durante

uma epidemia que ocorreu nas Filipinas. Os vírus foram obtidos a partir de pacientes com quadro grave de febre hemorrágica (Hammon et al., 1960).

Ainda não está clara a origem dos vírus dengue. No entanto, em razão dos quatro sorotipos terem sido identificados em ciclos silvestres em florestas na Ásia, acredita-se que sua origem seja asiática (Rudnick, 1986). Independente da origem, os vírus da dengue foram introduzidos nas aldeias por humanos ou primatas não humanos, previamente expostos aos vírus nas florestas. Uma vez introduzidos nas aldeias, foram propagados entre hospedeiros humanos por mosquitos peridomiciliares e, destes locais, foram disseminados para cidades portuárias, de onde tanto mosquitos como vírus foram transportados para cidades do interior e cidades portuárias de todo o mundo, através de embarcações (Gubler, 2004).

## **1.2. O agente etiológico**

O vírus da dengue pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus* e compreende quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Esta família é atualmente composta por três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus* e, por dois grupos de vírus (GBV-A e GBV-C) que ainda aguardam classificação formal (Figura 1). Os vírus desta família compartilham algumas semelhanças, como morfologia, organização do genoma e estratégia de replicação (World Health Organization, 2009; Lindenbach et al., 2007).

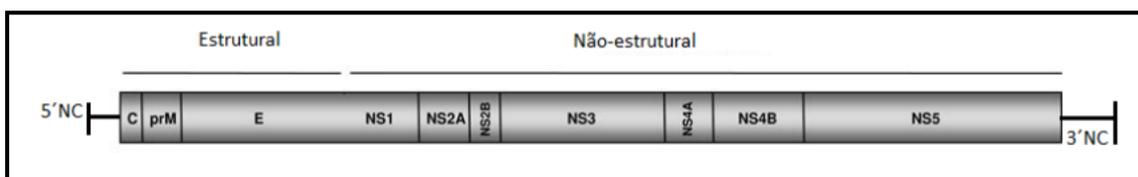


**Figura 1** - Família Flaviviridae. Árvore Filogenética construída com base na análise da região NS3 (Adaptado de Lindenbach et al., 2007).

O gênero *Flavivirus* compreende mais de 70 vírus, sendo muitos deles causadores de patologias humanas transmitidas por artrópodes e por isso, são classificados como arbovírus (Lindenbach et al., 2007). A inclusão dos vírus dengue no referido gênero baseia-se na reatividade antigênica cruzada com outros flavivírus, bem como em sua organização genômica e homologia de sequências (Repik et al., 1983; Trent et al., 1990).

Os DENV caracterizam-se por apresentar uma superfície relativamente lisa, estando seu genoma protegido por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica (30 nm), envolvido por um envelope formado por uma bicamada lipídica contendo uma proteína de membrana M e uma espícula glicoprotéica, a glicoproteína E (Kuhn et al, 2002). O genoma consiste de uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, sem calda Poli-A, contendo cerca de 11.000 nucleotídeos e apenas uma fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF). Assim como nos outros flavivírus, a região codificadora do genoma é flanqueada por regiões não codificantes de aproximadamente 450 e 100 nucleotídeos cada (Figura 2). Estas regiões são a porção 5'NC, que possui um Cap

terminal e é altamente conservada entre os diferentes sorotipos e, a 3'NC, que apesar de não possuir poliadenilação, apresenta uma estrutura terminal conservada, que tem um papel crucial para a síntese de RNA viral (Chambers et al., 1990; Lodeiro et al., 2009). As sequências conservadas destas regiões direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (Lindenbach et al., 2007).



**Figura 2** - Ilustração da organização do genoma dos DENV (Adaptado de Weaver & Vasilakis, 2009).

As proteínas virais são produzidas a partir de uma única e longa poliproteína de mais de 3.000 aminoácidos, que é posteriormente clivada por uma combinação de proteases (Lindenbach et al., 2007). Esta poliproteína é clivada em três proteínas estruturais (capsídeo, envelope e pré-membrana) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (World Health Organization, 2009).

A proteína do capsídeo (C), que é essencial na montagem dos vírions, tem peso molecular de 12 kilodaltons (kDa) e apresenta caráter altamente básico. O capsídeo se dobra em um dímero simétrico, no qual cada monômero é composto de quatro alfa hélices. O domínio hidrofóbico desta proteína, presente em sua região central, atua na membrana celular (Ma et al., 2004; Lindenbach et al., 2007).

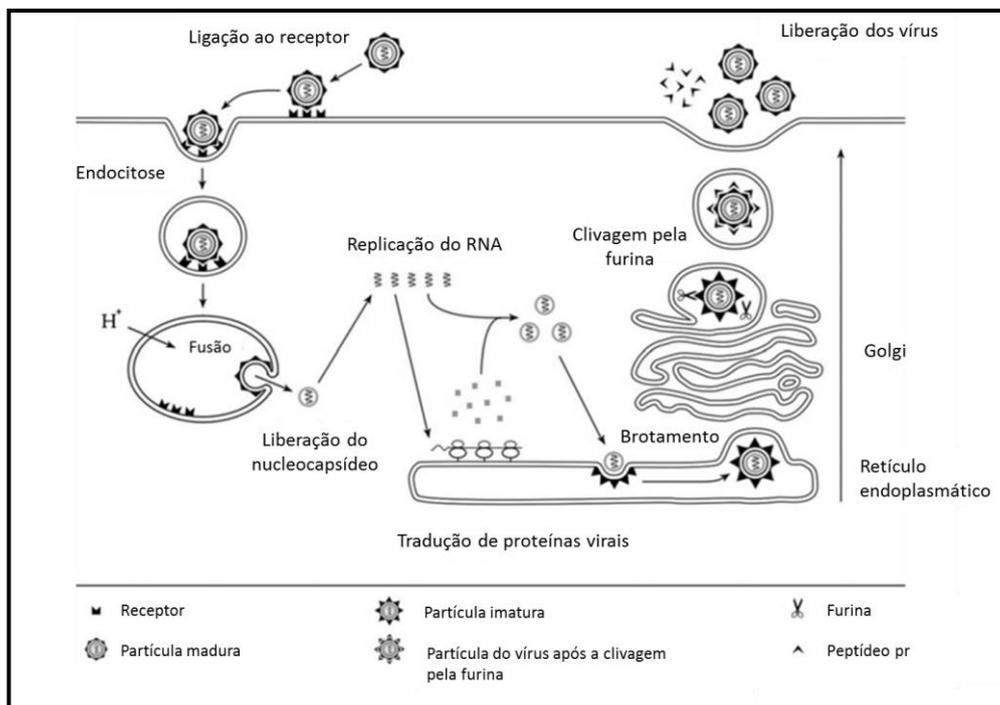
A glicoproteína do envelope (E) se apresenta na forma dimérica, com peso molecular de aproximadamente 57 kDa. Por ser a estrutura de fixação do vírus aos receptores da célula, se constitui no principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Cada unidade monomérica é composta de três domínios: I, que forma uma estrutura barril beta; II que se projeta na superfície do vírus e o III, que mantém uma conformação semelhante à imunoglobulina e está envolvido na interação com os receptores celulares para a entrada do vírion na célula (Chambers et al., 1990; Modis et al., 2004; Lindenbach et al., 2007).

A proteína da membrana (M), produzida durante a maturação de partículas de vírus dentro da via secretora, é um pequeno fragmento proteolítico (8 kDa) da proteína precursora prM (21 kDa) (Lindenbach et al., 2007; Rodenhuis-Zybert, 2010).

A proteína não estrutural NS1 (46 kDa) é dimérica, N-glicosilada, altamente conservada e parece ser essencial para a viabilidade do vírus, embora nenhuma função exata tenha sido atribuída à ela. Circula em níveis elevados no soro de pacientes com infecção primária a partir dos primeiros dias, assim como em infecções secundárias, durante toda a fase clínica da doença e nos primeiros dias de convalescença (Young et al., 2000; Alcon et al., 2002). A proteína hidrofóbica NS2A, de 22 kDa, está envolvida na coordenação da mudança entre o empacotamento do RNA e a sua replicação (Khromykh et al., 2001). A NS2B (14 kDa) se associa com NS3 formando um complexo estável que atua como cofator na atividade proteolítica de clivagem das proteínas não estruturais (Falgout et al., 1991). A proteína NS3, de 70 kDa, além de atuar no processamento da poliproteína, possui outras funções, tais como atividade de RNA helicase e nucleotídeo trifosfatase (Li et al., 1999). NS4A e NS4B são hidrofóbicas, possuem, respectivamente, 16 kDa e 27 kDa e atuam na replicação viral. Resultados obtidos por Umareddy e colaboradores sugerem que a NS4B modula a replicação do vírus da dengue através da sua interação com a proteína NS3 (Umareddy et al., 2006). A NS5 é uma grande proteína, com 103 kDa, bastante conservada, que desempenha diversas funções, tais como atividade de metiltransferase (MTase) e de polimerase RNA dependente ( RdRp) (Lindenbach et al., 2007).

Um estudo realizado por Jessie e colaboradores (2004) confirmou as observações feitas em estudos anteriores que apontavam as células da linhagem mononuclear fagocitária como os principais alvos da replicação viral nas infecções naturais pelo vírus da dengue. Estudando casos fatais de dengue, Araújo e colaboradores detectaram, através de técnicas de imunohistoquímica, a presença de partículas do vírus no coração, cérebro, baço, rim, pulmão, medula óssea e fígado (Araújo et al., 2009a). Esta grande variedade de células permissivas ao vírus indica que o mesmo interage com uma molécula de superfície celular ubíqua ou explora múltiplos receptores para mediar à infecção. Durante a última década, vários candidatos a receptores e/ou fatores de ligação foram identificados, o que sugere que o vírus dengue é capaz de utilizar moléculas múltiplas para entrar na célula (Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Através de endocitose, mediada pelo receptor, os vírus dengue entram na célula hospedeira. Este processo é mediado por clatrina e a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossoma é dependente da variação de pH. A acidificação das vesículas endocíticas desencadeia uma alteração conformacional na glicoproteína E, que promove a fusão entre o envelope e a membrana endossomal, com a subsequente liberação do genoma viral no citoplasma da célula (Chu & Ng, 2004). Uma vez liberado no citosol, tem início a tradução do genoma viral, que funciona com um RNA mensageiro policistrônico, dando origem a uma poliproteína que após a clivagem gera as diferentes proteínas virais. A enzima RNA polimerase promove a transcrição do RNA genômico do vírus para a formação de uma fita negativa de RNA, a qual servirá de molde para a replicação do genoma viral. Na sequência, as unidades da proteína do capsídeo se juntam e empacotam as cópias do genoma viral e, os vírions imaturos, são montados no lúmen do retículo endoplasmático. Em seguida, os nucleocapsídeos brotam da membrana do retículo endoplasmático, de onde retiram o seu envelope. O amadurecimento das partículas virais ocorre durante a passagem através das vesículas do complexo de Golgi, onde a prM é clivada por uma proteína do tipo furina, resultando na formação da proteína M, presente nas partículas virais maduras. Finalmente, os vírions são liberadas da célula por exocitose (Van der Schaar et al., 2007) (Figura 3).



**Figura 3** - Replicação do vírus da dengue (Adaptado de Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

### 1.3. Diversidade genética

Com base em diferenças antigênicas os vírus são classificados, tradicionalmente, em sorotipos. No caso dos DENV, os quatro sorotipos conhecidos são divididos em diferentes genótipos por apresentarem divergência nas sequências de nucleotídeos de mais de 6% (Rico-Hesse, 1990).

Houve um expressivo aumento na prevalência dos quatro sorotipos da dengue nos últimos anos, seguido de um também expressivo aumento na diversidade dos mesmos. Isso é de veras importante, uma vez que este aumento na diversidade genética pode implicar em importantes mudanças como virulência, tropismo e etc. (Twiddy et al., 2003).

Como principal fator responsável pelo aumento da diversidade dos vírus dengue, Worobey cita a sua alta taxa de mutação, explicada pelo fato deste ser um vírus com genoma de RNA que, devido à ausência de um mecanismo de reparo, a correção de alterações ocorridas durante o processo replicativo não é possível. O autor cita, ainda, a recombinação como sendo outro fator responsável por tal diversidade, apesar deste ser considerado um evento raro (Worobey, 1999). Um agravante que acaba por aumentar as chances de ocorrência de recombinação seria o desenvolvimento desenfreado dos meios de transporte, que carregam vírus, hospedeiros e vetores para diferentes regiões rapidamente, permitindo, assim, que vários genótipos circulem em uma mesma localidade, condição ideal para os eventos de coinfeção (Rico-Hesse, 1990; Gubler, 1997; Holmes & Bruch, 2000).

Com base na análise de sequências do gene do envelope foi determinado que o sorotipo 1 é composto por cinco diferentes genótipos: genótipo I (Sudeste Asiático, China e Leste da África), genótipo II (Tailândia), genótipo III (Malásia), genótipo IV (Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália) e genótipo V (Américas, Oeste da África e Ásia) (Weaver & Vasilakis 2009).

O DENV-1 foi introduzido nas Américas no ano 1977 e, acredita-se que pelo menos um ou dois genótipos circulem neste continente (Gonçalves et al., 2002, Rico-Hesse, 2003). No Brasil, existem evidências de que apenas o genótipo V esteja em circulação (Carneiro et al., 2012). Em 2011, dos Santos e colaboradores, a partir da análise de sequências do gene do envelope, constataram que os DENV-1 isolados durante os anos 2009/2010 pertenciam ao genótipo V, linhagem II, diferentemente dos

vírus isolados anos antes, em 1986 e 2001, que pertenciam à linhagem I. Foi constatado, ainda, que cepas isoladas em 2010 e 2011 pertenciam à outra linhagem, a III. Este corresponde ao primeiro relato de múltiplas linhagens de DENV-1 em nosso país e tais achados sugerem diferentes origens virais e uma possível substituição de linhagens (Dos Santos et al., 2011). Um ano mais tarde, Drumond e colaboradores sequenciaram amostras brasileiras deste sorotipo e constataram que todas se tratavam do genótipo V, estando subdivididas em três diferentes linhagens, introduzidas no país durante quatro diferentes eventos, 1984-1985, 1997-1999, 2004 e 2007 (Drumond et al., 2012). No mesmo ano, Bona e colaboradores, estudando amostras de diferentes municípios do Paraná, determinaram que todas pertenciam também ao genótipo V (Bona et al., 2012).

No que se refere ao sorotipo 2, análises filogenéticas também com base no gene E, revelaram a existência de seis genótipos: Asiático I (Malásia e Tailândia), Asiático II (Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas), Cosmopolita (Austrália, Leste e Oeste da África, Ilhas do Pacífico/Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio), Americano (América Latina e Caribe), Sudeste Asiático/Americano (Tailândia, Vietnã e Américas) e Selvagem (Oeste Africano e Sudeste Asiático) (Weaver & Vasilakis 2009).

Em 2010, buscando realizar a caracterização molecular e análise filogenética do DENV-2 durante vinte anos de sua atividade no país, os resultados obtidos por Faria e colaboradores revelaram que as cepas brasileiras eram pertencentes ao genótipo Sudeste Asiático/Americano. Foi constatada, ainda, a existência de duas diferentes linhagens dentro deste genótipo, sendo a linhagem I (cepas isoladas no período de emergência, 1990-2003) e a linhagem II (cepas isoladas no período de re-emergência, 2007-2010) (Faria et al., 2013). Bona e colaboradores, em 2012, isolaram uma cepa que se revelou pertencer também ao genótipo Sudeste Asiático/Americano, estando diretamente relacionada com uma cepa oriunda da Guiana Francesa, de 2006 (Bona et al., 2012).

Quanto ao DENV-3, estudos revelaram a existência de cinco diferentes genótipos: genótipo I (Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul das Ilhas do Pacífico), genótipo II (Tailândia, Bangladesh e Vietnã), genótipo III (Sri Lanka, Índia, África, Samoa e Tailândia), genótipo IV (Porto Rico, América Latina, América Central e Taiti) e genótipo V (Filipinas, Japão, China e América do Sul) (Weaver & Vasilakis 2009).

Em um estudo realizado com amostras de diferentes localidades do Brasil, Araújo e colaboradores, analisando sequências do gene E, constataram a circulação do genótipo III, sendo encontradas quatro linhagens diferentes deste genótipo (BR-I, BR-II, BR-III, BR-IV). As três primeiras provavelmente foram introduzidas através do Caribe

e a última da Colômbia ou Venezuela, o que demonstra que a importação de linhagens de DENV-3 do Caribe para o Brasil parece ser algo que acontece com certa frequência (Araújo et al., 2012).

O sorotipo 4 compreende quatro diferentes genótipos: genótipo I (Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão), genótipo II (Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas), genótipo III (Tailândia) e genótipo IV (Malásia) (Weaver & Vasilakis 2009).

No Brasil este sorotipo re-emergiu 28 anos depois de sua última detecção, no Estado de Roraima (Temporão et al., 2011). A partir de um estudo com cepas de quatro Estados brasileiros (Pará, Amazonas, Roraima e Bahia) foi determinada a circulação do genótipo I, proveniente do Sudeste Asiático e II, introduzido a partir da Venezuela e Colômbia (Nunes, 2012).

#### **1.4. Os vetores**

Os dois vetores da dengue, de maior importância, são o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* (World Health Organization, 2011).

##### **1.4.1. *Aedes aegypti***

Como espécie mais importante responsável pela transmissão da doença, tem-se o mosquito *Aedes aegypti*, também incriminado na transmissão da febre amarela urbana (Brasil, 2009).

Oriundo do Velho Mundo, provavelmente da região etiópica, este mosquito foi originalmente descrito no Egito (Consoli & Oliveira, 1994). Chegou às Américas e Ásia através de navios (Schatzmayr, 2008) e, no Brasil, sua introdução ocorreu durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (Consoli & Oliveira, 1994).

A capacidade deste mosquito de se adaptar a condições ambientais adversas é notável, onde em razão de sua estreita associação com o ambiente humano, consegue

sobreviver em locais considerados inadequados. Por encontrar nestes locais recipientes artificiais com água utilizados por humanos, não são totalmente dependentes de chuvas (Consoli & Oliveira, 1994; Jansen & Beebe, 2010).

O *A. aegypti* é um mosquito pequeno, de cor preta e branca, altamente domiciliado, que coloca seus ovos em recipientes comumente encontrados dentro e ao redor das casas (Gubler, 1998). Os criadouros preferenciais desta espécie são os recipientes artificiais abandonados pelo homem ou utilizados pelo mesmo no uso doméstico, como pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos, caixas d'água, tonéis, latões, cisternas e etc. (Consoli & Oliveira, 1994).

Diferentemente de alguns outros mosquitos, o *A. aegypti* pica durante o dia, havendo dois momentos de alimentação, ao amanhecer e ao entardecer (Consoli & Oliveira, 1994; Gubler, 1998). Apresenta preferência acentuada por sangue humano, sendo que apenas as fêmeas realizam o repasto sanguíneo (Tauil, 2001; Ferreira, 2004). Alimentando-se de um indivíduo com dengue, o vírus ingerido pelo vetor pode replicar-se no seu trato digestivo e atingir as glândulas salivares através da hemolinfa, após um período de incubação extrínseca que dura de 8 a 12 dias. Depois de transcorrido este tempo o mosquito é capaz de transmitir a infecção durante todo o resto de sua vida, que dura de 6 a 8 semanas (Brasil, 2009; Müller, 2011). Os machos também apresentam hábitos diurnos, período no qual seguem as fêmeas para realizar a cópula, bem como encontrar alimento, que consiste em substâncias açucaradas (Consoli & Oliveira, 1994).

Fatores como vários repastos sanguíneos para uma única postura de ovos (Jansen & Beebe, 2010), ovos com alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis por vários meses (Tauil, 2002), a transmissão transovariana do vírus (Consoli & Oliveira, 1994) e grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis (Tauil, 2002), são fatores que facilitam a transmissão e disseminação da doença.

Devido intensos esforços e uma grande campanha de erradicação promovida pela Organização Panamericana de Saúde na segunda metade do século 20, o *A. aegypti* chegou a ser eliminado da grande maioria dos países das Américas (Bricks, 2004). Em 1955 foi considerado erradicado do Brasil, porém a fronteira de alguns Estados com países aonde a espécie não chegou a ser erradicada, facilitou a reintrodução do mosquito em nosso país (Martins, 2010).

### **1.4.2. *Aedes albopictus***

Originalmente descrito na Índia (Consoli & Oliveira, 2004), o *Aedes albopictus* preocupa as autoridades de saúde pública dos países infestados devido sua competência para a transmissão de pelo menos 22 arbovírus, dentre eles os quatro sorotipos da dengue (Cecílio et al., 2009). Esta espécie invadiu o continente americano em 1985 (Consoli & Oliveira, 1994) e o primeiro registro no Brasil ocorreu em 1986, em Minas Gerais e Rio de Janeiro. Apesar de a maior parte dos Estados brasileiros ter relatado a sua presença, este mosquito ainda não foi incriminado como responsável por surtos de dengue no país (Martins et al., 2006). Porém, em áreas rurais no Sudeste da Ásia e Ilhas do Pacífico, corresponde a um vetor secundário da dengue (Gratz, 2004).

Seus microhabitats são buracos de árvores, além de um gama de recipientes naturais e também artificiais. Seus ovos, assim como os do *A. aegypti*, podem sobreviver à dessecação por vários meses (Cecílio et al., 2009). Em um estudo realizado no Ceará, por Martins e colaboradores (2010), foi possível constatar que este mosquito tem apresentado uma significativa adaptação ao ambiente urbano, além de ter sido observada certa capacidade competitiva com o *A. aegypti*.

## **1.5. A doença**

A apresentação clínica da infecção por qualquer um dos quatro sorotipos da dengue varia de infecções assintomáticas a formas leves, como a dengue clássica (DC), formas graves, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD), e até mesmo óbito (De Paula et al., 2002; Kukreti et al., 2008; Cardoso et al., 2011).

As infecções assintomáticas apresentam grande importância epidemiológica por consistirem em uma fonte silenciosa de transmissão do vírus. Os portadores destas infecções acabam passando despercebidos pelo sistema de vigilância uma vez que, por não procurarem atendimento médico, seus casos não são notificados, o que acaba por permitir a disseminação do vírus de uma região geográfica para outra, quando estes pacientes se deslocam (Vasconcelos et al., 1998).

Após o período de incubação, 4 a 7 dias, a doença começa de forma abrupta e é seguida de três períodos: o febril, o crítico e o de recuperação (World Health Organization, 2009). A primeira manifestação é a febre, que se inicia abruptamente, é geralmente alta (39 °C a 40°C) e pode estar associada a outros sintomas como cefaléia, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária, dentre outros. Anorexia, náuseas, vômitos e diarreia, também comuns a outras doenças, podem ser observados, o que acaba por dificultar o diagnóstico (Brasil, 2008). Considerando que alguns pacientes podem evoluir para formas graves da doença quando a febre desaparece, é fundamental o monitoramento de sinais de alerta durante o período febril, para que se reconheça a tempo a progressão para o período seguinte, o crítico (World Health Organization, 2009).

O início do período crítico é marcado por um aumento da permeabilidade capilar e do hematócrito, isso ocorre geralmente entre os dias 3-7 da doença, quando a temperatura começa a cair, na fase de defervescência. Porém, alguns pacientes progridem para o período crítico sem apresentar diminuição da temperatura. Neste período há extravasamento de plasma de grau variável, que dura de 24-48 horas. O extravasamento de plasma com perda de um volume crítico resulta em hemoconcentração que, sendo prolongada, causará disfunção de órgãos, acidose metabólica, coagulação intravascular disseminada e choque hipovolêmico (World Health Organization, 2009). Existem alguns sinais de alerta para o choque, são eles: dor abdominal contínua, vômitos persistentes, agitação ou letargia, diminuição da diurese, mudança súbita de febre para hipotermia com sudorese, confusão mental e prostração (Rigau-Pérez et al., 1998). Nestes casos há um grande risco de morte a menos que os pacientes sejam devidamente tratados (Gubler, 1998).

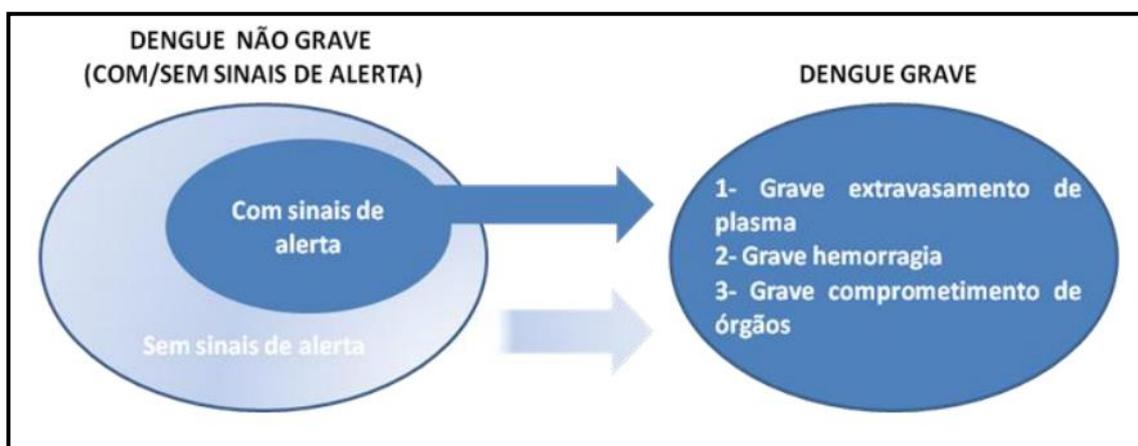
Os doentes que melhoram após o período de diminuição da temperatura são ditos portadores de DC (World Health Organization, 2009). Tais pacientes são tratados com repouso, reposição de líquidos e medicamentos antitérmicos para baixar a febre (Rigau-Pérez et al., 1998).

O período de recuperação de pacientes com FHD, com ou sem choque, normalmente é rápido e sem complicações (Gubler, 1998). Seu início é marcado pela reabsorção gradual do fluido extravasado que dura de 48-72 horas. Este período começa cerca de 24-48 horas após a fase crítica e nele já é observado o retorno do apetite, sensação de bem estar e diminuição dos sintomas gastrointestinais (World Health

Organization, 2009). Uma vez que o paciente é estabilizado, com a reabsorção do fluido, começa a estabilização do hematócrito (Gubler, 1998).

As mudanças na epidemiologia da dengue acabaram resultando em dificuldades na classificação da doença em dengue clássica, febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue. A aplicação dos critérios de FHD tornou-se difícil na situação clínica (World Health Organization, 2009). De acordo com Phuong e colaboradores (2004), uma vez que há uma sobreposição considerável nas características clínicas e laboratoriais de DC e FHD, a classificação de casos de dengue é muitas vezes difícil. Bandyopadhyay et al., em 2006, enfatizaram a necessidade da antiga classificação ser revista e se necessário modificada, uma vez que vários desafios foram apontados depois de mais de 30 anos de sua aplicação.

Apesar de a antiga classificação continuar sendo amplamente utilizada, a Organização Mundial de Saúde (OMS) apoiou um estudo multicêntrico prospectivo em todas as regiões endêmicas da dengue objetivando coletar evidências sobre os critérios para a classificação da doença em diferentes níveis de gravidade. Os resultados obtidos apontaram que, utilizando parâmetros laboratoriais, é clara a diferença entre os pacientes com dengue grave e os com dengue não grave, sendo os últimos divididos em dois outros grupos, com sinais de alerta e sem sinais de alerta. Apresentações clínicas como grave extravasamento de plasma, hemorragia e comprometimento de órgãos são vistas em pacientes portadores de dengue grave (Figura 4). Esta nova classificação sugerida pela OMS visa à simplificação do manejo dos pacientes, bem como a melhora no tratamento dos casos graves da doença (World Health Organization, 2009).



**Figura 4** - Classificação da dengue em níveis de gravidade sugerida pela Organização Mundial de Saúde (Adaptado de World Health Organization, 2009).

Trabalhos como o de Wanigasuriya e colaboradores (2011) e o de Van de Weg e colaboradores (2012) demonstram que a nova classificação é significativamente mais específica e de maior aplicabilidade do que a antiga.

Foi em 2014 que o Brasil adotou esta classificação e com isto surgiu a necessidade de treinamento para os profissionais de saúde, visando não haver dúvidas sobre o preenchimento da nova ficha de notificação (Ministério da Saúde, 2014).

## **1.6. Patogênese**

Todas as pessoas são suscetíveis ao vírus da dengue. A segunda infecção sempre será por um sorotipo diferente, uma vez que a imunidade é permanente, mas específica para cada sorotipo. Existe imunidade cruzada, mas por curto período de tempo (Brasil, 2009).

A fêmea do *A. aegypti* infectada, ao alimentar-se de um hospedeiro humano, inocula no mesmo partículas virais que irão se replicar em monócitos e macrófagos nos linfonodos regionais e entrar na corrente sanguínea, com replicação dentro dos monócitos circulantes. Estimulada pela replicação viral, têm-se a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e outras células do sistema imune, especialmente interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e várias interleucinas (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-1 $\beta$ ) (Dewi et al., 2004; Kurane, 2007; Pang et al., 2007), que estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento do quadro febril (Lupi et al., 2007).

Tanto a imunidade celular quanto a humoral são responsáveis por controlar a infecção (Lanciotti et al., 1992; World Health Organization, 2009). As células infectadas são eliminadas por mecanismos imunes que envolvem a participação de anticorpos específicos, bem como de linfócitos citotóxicos CD 8<sup>+</sup> (Lupi et al., 2007).

A resposta imunológica à infecção por dengue pode ser primária ou secundária. Quando o indivíduo não teve exposição anterior ao vírus o título de anticorpos se eleva de maneira lenta, porém, em uma segunda exposição, o título se eleva rapidamente atingindo níveis altos em poucos dias (Brasil, 2009). Os anticorpos da classe IgM são detectados a partir do quarto dia da doença, podendo permanecer por alguns meses. Já os anticorpos da classe IgG podem ser observados na primeira semana e continuar

presentes por anos, sendo eles os responsáveis pela imunidade sorotipo específica (Lupi et al., 2007).

A evolução clínica da doença para FHD e/ou SCD não é totalmente esclarecida e, apesar de um grande progresso nos últimos anos no que diz respeito à compreensão da estrutura do vírus e seu ciclo replicativo, a falta de um modelo animal adequado torna difícil explicar completamente a patogênese da doença (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). Algumas teorias consideram a maior virulência da cepa do vírus infectante, outras atribuem à infecção sequencial por diferentes sorotipos, algumas à fatores individuais do hospedeiro e outras, ainda, que atribuem à este fenômeno uma combinação de vários fatores (Tauil, 2002).

A teoria de Halstead (1988) é uma das mais conhecidas. Ela relaciona a ocorrência de casos graves à infecções sequenciais por diferentes sorotipos (Brasil, 2009). A chamada “antibody dependent-enhancement” sugere que anticorpos heterólogos não neutralizantes, pré-existentes, reconhecem o vírus e formam imunocomplexos os quais vão se fixar nas paredes dos vasos, ativar o complemento pela via clássica e desencadear uma reação de hipersensibilidade por imunocomplexo, caracterizada pela participação de neutrófilos, resultando em inflamação e lesão na parede dos vasos. Além disso, acredita-se que os anticorpos dirijam as partículas de vírus recobertas por anticorpos para células que possuem receptores Fc de IgG, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas, fazendo com que elas sejam infectadas via receptor de Fc. Isto leva a uma amplificação da infecção nestas células, aumentando a carga viral (Lupi et al., 2007; Nielsen, 2009; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Outra explicação para os casos graves de dengue, a teoria de Rosen, reside na virulência da cepa infectante. De acordo ela, cepas mais virulentas são responsáveis por casos graves (Brasil, 2009). Reforça esta teoria a confirmação de casos graves em ocasião de infecções primárias, bem como a raridade de doença grave em situações epidêmicas em que a infecção secundária é elevada. Em ambas as situações torna-se inadequado justificar o aparecimento de casos graves pela teoria “antibody dependent-enhancement” (Chaudhry et al., 2006).

A teoria que atribui um caráter multifatorial à gravidade da doença é sugerida por Kouri e colaboradores (1987). Fatores individuais como idade, sexo, raça, estado nutricional e imune; fatores virais como sorotipos circulantes e virulência das cepas; e fatores epidemiológicos como circulação simultânea de mais de um sorotipo, alta

densidade vetorial, dentre outros, juntos promoveriam condições favoráveis para a ocorrência da doença grave (Brasil, 2009).

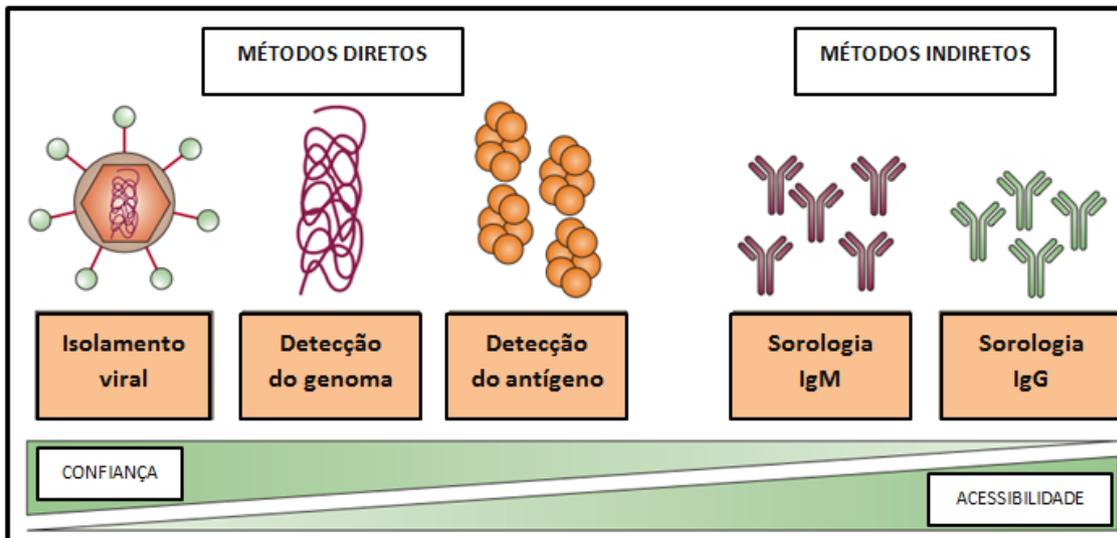
## **1.7. Diagnóstico laboratorial**

Em razão de o diagnóstico clínico não apresentar precisão, uma vez que a infecção por dengue apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, o diagnóstico final da infecção necessita de confirmação laboratorial (Guzman et al, 2010; Tang & Ooi, 2012).

Há uma grande necessidade de testes que sejam específicos e que apresentem baixos custos (World Health Organization, 2009; Peeling et al, 2010). É importante o estabelecimento de um diagnóstico capaz de detectar o vírus nos primeiros dias de sintomas, para que se forneçam informações oportunas para o manejo adequado do paciente e, de determinar o sorotipo do vírus, o que é de extrema importância para a vigilância epidemiológica (Alcon et al., 2002).

Uma gama de métodos para o diagnóstico laboratorial foi desenvolvida e está disponível para utilização (Tang & Ooi, 2012). A escolha do teste a utilizar deve levar em consideração alguns fatores: a sua finalidade (diagnóstico clínico, vigilância epidemiológica ou avaliação/desenvolvimento de vacinas), o tempo de coleta da amostra, as instalações laboratoriais, o pessoal técnico para realizar os testes e os custos de sua realização. Testes mais sensíveis e específicos, como o isolamento viral e a detecção de ácidos nucleicos, exigem tecnologias mais complexas e maiores conhecimentos técnicos, o que os tornam mais trabalhosos e caros (World Health Organization, 2009).

Dentre os métodos de diagnósticos laboratoriais capazes de confirmar a infecção pelo vírus DENV estão os que envolvem a detecção do vírus, do ácido nucleico viral, de antígenos ou anticorpos (Guzman & Kouri, 2004; World Health Organization, 2009). A figura 5 mostra a relação entre a acessibilidade e a confiança dos resultados apresentados por diferentes técnicas.



**Figura 5** - Comparação de testes de diagnóstico de acordo com a sua acessibilidade e confiança (Adaptado de Peeling et al., 2010).

Geralmente o diagnóstico da dengue é realizado por sorologia. Quando comparado aos demais métodos, este tem como vantagem o fato de apresentar baixo custo e facilidade de execução, porém as técnicas sorológicas não conseguem identificar o sorotipo infectante. Além disso, a detecção de anticorpos não pode ser feita com a precocidade necessária de forma a contribuir para o manejo do paciente, com a antecedência desejada (De Paula et al., 2002; Guzman et al. 2010).

O MAC-ELISA (do inglês: *IgM Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*), amplamente utilizado, corresponde a uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de rotina da dengue. Tal método possibilita a detecção de anticorpo IgM anti-dengue por meio de um ensaio imunoenzimático (Guzman & Kouri, 2004). Esta imunoglobulina torna-se detectável durante a fase aguda da doença e cerca de 90% dos infectados são IgM positivos até o 6º dia após o início dos sintomas. Já o anticorpo IgG, também pesquisado nos testes sorológicos, aparece mais tardiamente em infecções primárias, permanecendo detectável por muitos anos. Em infecções secundárias, já se encontra presente na fase aguda, subindo rapidamente ao longo de poucos dias (Rigau-Pérez et al., 1998, Brasil, 2011).

O diagnóstico da dengue também é possível através da detecção de antígenos virais. Kits comerciais para a detecção de NS1 já estão disponíveis no mercado (World Health Organization, 2009). Alcon e colaboradores mostraram que NS1 foi detectável

em tempos anteriores ao IgM, tão cedo quanto o dia 0 e até o dia 9 da doença, o que indica que este método permite o diagnóstico precoce da infecção (Alcon et al., 2002). Os resultados obtidos por Lima e colaboradores mostraram que kits comerciais de NS1, disponíveis no mercado, são úteis no diagnóstico laboratorial de dengue primária e secundária (Lima et al, 2010).

Um grande problema no diagnóstico laboratorial da dengue é a confirmação de casos fatais, uma vez que na maioria dos casos apenas uma única amostra de soro é obtida e, os testes sorológicos apresentam suas limitações (Gubler, 1998). Nestes casos é utilizado o diagnóstico histopatológico, realizado em material obtido após a morte do paciente e, a técnica de imunohistoquímica, bastante sensível e específica, através da qual é possível detectar antígenos virais em cortes de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (Brasil, 2009). Lima e colaboradores mostraram que testes de captura de NS1 correspondem a uma ferramenta alternativa rápida para confirmação da infecção por dengue em casos fatais, a partir da análise de tecidos (Lima et al, 2011).

Considerando que a viremia da dengue é curta, amostras coletadas no início da doença (geralmente antes do dia 5) podem ser diagnosticadas pelo isolamento viral, onde a cultura de células é o método mais empregado (Guzman & Kouri, 2004; World Health Organization, 2009). Sangue ou soro podem ser utilizados nesta técnica (Tang & Ooi, 2012) que consiste na inoculação das amostras em cultura de células (linhagens de células de mosquitos ou de mamíferos) ou em cérebro de camundongos lactentes. Por fim, ensaios de imunofluorescência são realizados para identificação do sorotipo do vírus (Peeling et al, 2010). Apesar de ser possível descobrir o sorotipo infectante, o isolamento viral leva de dias a semanas e nem sempre é bem sucedido devido a pequenas quantidades de vírus viáveis (Lanciotti et al., 1992).

Por fornecer um diagnóstico sorotipo-específico rápido, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) tem potencial para revolucionar o diagnóstico laboratorial uma vez que, apesar de apresentar sensibilidade similar aos sistemas de isolamento viral que utilizam culturas de células C6/36, a manipulação, o armazenamento inadequado e a presença de anticorpos normalmente não influenciam o seu resultado, como o fazem no isolamento (Gubler, 1998). Apesar das evidentes vantagens desta técnica, todo o procedimento, incluindo a extração do RNA, ainda é caro e requer cuidados e um manuseio adequado, a fim de que se evitem contaminações em alguma das etapas do processo (Miagostovich et al., 1997).

O ensaio de PCR em tempo real é empregado para quantificar o RNA viral. A utilização de uma sonda fluorescente permite que os produtos da reação sejam detectados em tempo real, dispensando a necessidade de uma eletroforese para posterior visualização dos resultados (World Health Organization, 2009). Por apresentar uma maior precisão, sensibilidade e rapidez, torna-se um método apropriado que pode contribuir para a vigilância da dengue (Araújo et al., 2009a). As medições quantitativas da PCR em tempo real permitem, ainda, relacionar a gravidade da doença à carga viral, o que, aliado aos dados clínicos, podem fornecer informações cruciais sobre a patogênese das diferentes formas da dengue (Kong et al, 2006).

Os métodos citados correspondem a grandes avanços no diagnóstico da dengue, porém o fato de apresentarem algumas limitações demonstra a necessidade de soluções urgentes, bem como o desenvolvimento contínuo de novos testes que sejam baratos, sensíveis, específicos e que permitam o diagnóstico precoce da doença (Guzman & Kouri, 2004). Enquanto as novas ferramentas são desenvolvidas, faz-se necessário instituir programas de garantia de qualidade em todos os laboratórios de diagnóstico e de referência, visando um bom desempenho dos testes nos diferentes estabelecimentos (Guzman et al, 2010; Tang & Ooi, 2012).

## **1.8. Tratamento atual e perspectivas**

Apesar das altas taxas de morbidade e mortalidade associadas com infecções pelo vírus DENV, antivirais específicos e vacinas licenciadas não existem (Alvarez et al., 2005). Apenas o tratamento dos sintomas através de analgésicos, antitérmicos e reposição de fluido corporal estão disponíveis para o paciente (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

Os esforços para desenvolver vacinas contra a dengue são antigos, começaram na década de 1920 com extratos inativados de mosquitos infectados. Apesar das dificuldades no seu desenvolvimento (tais como: ausência de um modelo animal para testar a sua efetividade, pouca compreensão da patogênese da doença e baixo apoio financeiro), ao longo dos últimos anos a intensidade de propagação da doença despertou grande interesse nesta área e, com o recente desenvolvimento de vacinas que parecem

promissoras, estamos cada vez mais perto de obter uma vacina contra a dengue (Guzman & Kouri, 2002; Bricks, 2004; Hombach, 2007).

Uma vacina para a prevenção da dengue deve atender a alguns critérios: ser eficaz contra pelo menos três dos quatro sorotipos, mas de preferência todos os quatro; ser administrada em dose única; ser segura; induzir uma resposta imune de longa duração e apresentar baixo custo (Kumar et al, 2010; Gluber, 2011).

Várias vacinas encontram-se em desenvolvimento, dentre elas tem-se as de vírus atenuados, quiméricas, vírus inativados e vacinas de subunidades de ácidos nucleicos (World Health Organization, 2009).

Algumas vacinas atenuadas estão em estágios avançados de desenvolvimento, sendo a ChimeriVax<sup>TM</sup>-Dengue (CYD-TDV), desenvolvida pela Sanofi Pasteur, a que se encontra em fase mais avançada. Trata-se de uma vacina quimérica tetravalente, desenvolvida através de técnicas de engenharia genética, onde genes estruturais (prM e E) de cada um dos quatro vírus da dengue são inseridos individualmente para substituir os seus correspondentes do vírus da vacina contra a febre amarela, 17D (Monath, 2007; World Health Organization, 2009).

Resultados satisfatórios obtidos em estudos de fase I, II e III com a CYD-TDV, em diferentes países (Guy et al., 2008; Bricks, 2008), dão suporte à continuidade de seu desenvolvimento e, estudos adicionais em áreas endêmicas estão sendo realizados, visando uma maior compreensão de eventuais problemas no seu uso (Lanata et al. 2012; Hss et al. 2013).

Apesar dos substanciais avanços, nenhuma vacina está disponível para a prevenção da dengue até o presente momento e, até que isto ocorra, o controle dos vetores é a única maneira de diminuir a transmissão da doença (Guzman & Kouri, 2002; Bricks, 2004).

## **1.9. Aspectos epidemiológicos**

Todos os cinco continentes sofrem com surtos de dengue. Sua distribuição geográfica envolve países tropicais e subtropicais (Braga & Valle, 2007). A incidência da doença tem aumentado nas últimas décadas, sendo que o maior aumento no número de casos ocorreu nos países em desenvolvimento, onde o crescimento desordenado da

população em áreas urbanas propiciou a multiplicação do mosquito vetor. Este crescimento populacional sem precedentes tem sido uma força motriz, aumentando a circulação de pessoas e, portanto, do patógeno. Além disso, o transporte moderno garante um trânsito rápido, tanto do vetor quanto do vírus (Bricks, 2004; Gubler, 2004; Barbosa et al., 2012).

A doença apresenta padrão sazonal de incidência, com maior número de casos no verão em razão das chuvas e altas temperaturas desta estação. Apesar de ser mais comum em centros urbanos, devido à disponibilidade de criadouros artificiais produzidos pelo homem, pode ocorrer em qualquer lugar, desde que existam as condições necessárias: população suscetível, vetor e vírus (Brasil, 2009).

Provavelmente a pandemia global da dengue teve início na Ásia e no Pacífico durante e após a Segunda Guerra Mundial e, de lá se dispersou para outras regiões (Gluber, 1997). Hoje a doença é considerada endêmica na África, nas Américas, no Leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico (Braga & Valle, 2007; Barcellos & Lowe, 2014) e, o número de casos de DC e de FHD cresce a cada ano (Viana & Ignotti, 2013).

### **1.9.1. Dengue nas Américas**

As Américas convivem com a dengue há mais de 200 anos. Foi na década de 1950 que a febre hemorrágica da dengue foi descrita pela primeira vez, nas Filipinas e Tailândia e, logo após a década de 1960, a circulação do vírus tornou-se intensa neste continente (Brasil, 2009).

Nas décadas de 1950 e 1960 a maioria dos países da América Central e do Sul conseguiu erradicar o *Aedes aegypti* (Rigau-Pérez et al., 1998). Porém, a diminuição nos esforços para manter a erradicação, durante a última parte do século 20, juntamente com fatores sociais, contribuíram para o ressurgimento da dengue nestes subcontinentes (Lindenbach et al., 2007). O programa de erradicação foi encerrado no início de 1970 e ao final desta década o *A. aegypti* reinfestava vários locais. Em razão disto o número de países com epidemia de dengue aumentou consideravelmente durante os anos 1980 e 1990 (Rigau-Pérez et al., 1998).

Agora, países das Américas lidam com o fato de que as atuais condições, tanto sociais, quanto econômicas e ambientais, tendem a estabelecer a dengue como uma grande ameaça à saúde de suas populações (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

### **1.9.2. Dengue no Brasil**

No Brasil, a dengue encontra-se presente nas 27 unidades federativas e todos os quatro sorotipos circulam no país (Barbosa et al., 2012; Barcellos & Lowe, 2014). É hoje uma das doenças que apresenta maior incidência, atingindo toda a população independentemente de seu nível social (Brasil, 2008).

No território brasileiro, há referências da doença desde o século 19, ano de 1846, com epidemias no Rio de Janeiro, Salvador e São Paulo (Braga & Valle, 2007; Monteiro et al, 2009). No século 20, há relatos de 1916 em São Paulo e de 1923 em Niterói no Rio de Janeiro, porém ambos sem confirmação laboratorial (Brasil, 2009).

Nas décadas de 1950 e 1960 o Brasil havia conseguido eliminar o mosquito transmissor da dengue de seu território, porém em 1976, a partir de Salvador (BA), o *A. aegypti* foi reintroduzido e essa nova infestação não pôde ser eliminada, uma vez que estava presente em muitos países vizinhos. Deste modo, a re-emergência da dengue está intimamente relacionada à reinfestação do país pelo mosquito vetor (Tauil, 2001; 2002).

A primeira epidemia no Brasil, documentada clínica e laboratorialmente, foi causada pelos sorotipos 1 e 4 e ocorreu no período de 1981-1982 em Boa Vista, Roraima. Posteriormente, em 1986, o primeiro surto de maiores proporções causado pelo DENV-1 ocorreu no Rio de Janeiro e depois se espalhou para as áreas urbanas das regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Neste momento a doença tornou-se um problema de saúde pública. Em 1990 foi identificada a circulação do sorotipo 2 em Niterói, Rio de Janeiro e, em Dezembro de 2000, a circulação do DENV-3 foi identificada pela primeira vez no mesmo Estado (Pires Neto et al., 2005; Brasil, 2009; Teixeira et al., 2009). O fato de a cidade do Rio de Janeiro ser um importante centro turístico, principalmente durante os meses do verão, explica a rápida propagação dos sorotipos para outros Estados do Brasil (Nogueira et al., 1999). Após 28 anos sem ser detectado, o ano de 2010 foi marcado pela reintrodução do sorotipo 4, no Estado de Roraima (Temporão et al., 2011).

Com mais de três milhões de casos em um período de 5 anos (2000-2005), o Brasil se tornou o país com maior número de casos relatados de dengue, ocupando o primeiro lugar no ranking internacional para os casos totais da doença (Teixeira et al., 2009), o que reporta a dengue como uma verdadeira tragédia nacional.

### **1.9.3. Dengue no Rio Grande do Norte**

O Estado do Rio Grande do Norte vem convivendo com o aumento de casos de dengue há mais de uma década, correspondendo ao segundo Estado do Nordeste com maior número de casos registrados da doença, ficando atrás apenas do Ceará (Nascimento et al., 2009). O primeiro caso de dengue relatado no RN foi em 1994, no município de Assú (Oeste Potiguar), apesar da infestação por *Aedes aegypti* datar desde 1979 (Cunha et al., 1999; Barbosa et al., 2012). Dois anos depois, em 1996, vários outros municípios do Estado, inclusive a capital Natal, já registravam a presença da doença, com episódios epidêmicos e não epidêmicos (Barbosa et al., 2012).

Foram em 2002 e 2008 que ocorreram as mais importantes epidemias de dengue do Estado, que começaram com a cocirculação dos sorotipos 1 e 2 até o ano de 2002 e o aparecimento do sorotipo 3 (Barbosa et al., 2012).

O RN não difere do restante do território brasileiro, que vem lidando com os casos de dengue, bem como com a circulação simultânea de vários sorotipos do vírus. Fatores que contribuem para a atual situação epidemiológica do Estado são: índices de infestação predial acima de 1% em 70% dos municípios; uso exacerbado de descartáveis; presença de imóveis fechados; existência de terrenos baldios com acúmulo de lixo que se transformam em criadouros potenciais; fornecimento de água irregular, que acaba sujeitando a população a armazenar água em recipientes sem o devido cuidado, dentre outros (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte, 2008).

## 1.10. Controle

O mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue, corresponde ao alvo das medidas de controle da incidência da doença. Isto ocorre porque ainda não existem vacinas seguras e eficazes disponíveis até o presente momento (Teixeira et al., 2009; World Health Organization, 2011). O seu combate é deveras complexo, uma vez que exige ações coordenadas de múltiplos setores da sociedade, além do fato deste se encontrar muito bem adaptado às condições urbanas (Tauil, 2007).

A partir do século 19 o combate ao *A. aegypti* foi institucionalizado de maneira sistematizada no nosso país (Brasil, 2001). No ano de 1990, em Abril, foi criada a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), que passou a ser responsabilizada pela coordenação das ações de controle da doença. Seis anos mais tarde, o Ministério da Saúde elaborou o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), que se preocupava principalmente com os casos de dengue hemorrágica, devido a possibilidade de levar à morte. Mais tarde, em Julho de 2001, a meta de erradicar o mosquito foi abandonada oficialmente pela FUNASA, que passou a trabalhar com o objetivo de apenas controlar o vetor. Através da implantação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), as ações foram focalizadas em municípios com maior transmissão da doença, os considerados prioritários. O Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), implantado em 2002, deu continuidade ao PIACD, porém enfatizando a necessidade de mudança nos modelos anteriores (Braga & Valle, 2007).

As tradicionais abordagens para prevenção e controle da dengue foram herdadas dos programas verticais, nos quais a eliminação do vetor era feita através do uso de inseticidas. O problema é que estes não apresentam longo alcance e são de curta duração, não conseguindo penetrar nos locais de repouso do vetor (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009). Além disto, têm-se o agravante da resistência crescente dos insetos aos larvicidas e adulticidas usados habitualmente nas atividades de controle, ficando clara a necessidade de monitoramento permanente da resistência dos mosquitos, bem como a pesquisa de novos produtos, que além de eficazes sejam ecologicamente seguros (Tauil, 2002).

Em muitos casos, os programas nacionais são mal financiados, mal geridos e funcionam de forma isolada. Os trabalhadores por não serem bem remunerados, são desmotivados. Muitos não apresentam habilidades de comunicação e nem sequer são

supervisionados. Além disto, durante períodos de baixa transmissão, há uma grande diminuição dos esforços, o que acaba acarretando no aumento da população do vetor (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

Enfim, a atual situação epidemiológica da dengue no Brasil mostra que as medidas atuais de controle não têm alcançado sucesso e, se não houver alternativas eficazes de controle que superem as dificuldades atuais, as perspectivas futuras são piores, devido o aumento de casos de febre hemorrágica da dengue, especialmente entre as crianças (Teixeira et al., 2009).

Diante do exposto, o Brasil precisará se esforçar para implementar adequadamente as estratégias atualmente disponíveis. Fazem-se necessários, ainda, investimentos em pesquisa para que sejam melhoradas as tecnologias para reduzir o *Aedes aegypti* em grande escala (Teixeira et al., 2009).

Considerando que alterações de comportamento da população podem ajudar a reduzir a infestação de recipientes domésticos, se cada comunidade for corretamente sensibilizada e orientada, fica clara a necessidade de uma nova relação entre instituições governamentais e indivíduos, onde devem ser criados programas, com base na estrutura local e na organização da comunidade, que incorporem a vigilância epidemiológica, a participação da comunidade, controle do vetor e a educação (Gómez-Dantés & Willoquet, 2009).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Desde que os primeiros casos de dengue foram detectados no Rio Grande do Norte, há mais de 20 anos, o Estado vem sofrendo com episódios epidêmicos, alguns deles de grandes proporções, e não epidêmicos, ganhando, por esta razão, o título de segundo Estado do Nordeste com maior número de casos relatados da doença (Nascimento et al., 2009; Barbosa et al., 2012). É notória a grande importância da dengue no RN, porém a escassez de estudos inviabiliza a compreensão do perfil da doença, bem como não permite que se entenda a atividade do vírus no Estado.

O atual quadro da dengue no Brasil, bem como a sua grande importância epidemiológica, que não difere para o Rio Grande do Norte, serviram de motivação para a realização deste trabalho, que busca descrever o perfil epidemiológico e realizar a caracterização molecular dos vírus dengue circulantes no Estado nos anos 2013 e 2014.

As informações obtidas com o monitoramento da transmissão da dengue, do movimento e distribuição geográfica dos sorotipos e genótipos, através das técnicas laboratoriais rápidas e sensíveis utilizadas neste estudo, poderão fornecer importantes informações as quais servirão de subsídio para a definição de ações visando à prevenção de futuras epidemias.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Descrever o perfil epidemiológico da dengue no Estado do Rio Grande do Norte, no período de 2013 a 2014.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Identificar e monitorar os sorotipos do vírus da dengue circulantes no RN durante o período de estudo;
- Descrever a distribuição geográfica dos casos da doença no Estado, 2013-2014;
- Determinar o período do ano com maior número de casos de dengue no RN, no período de 2013-2014;
- Verificar se existe diferença nas taxas de incidência da infecção, no Estado do Rio Grande do Norte, em relação ao gênero e faixa etária, em 2013-2014;
- Realizar a caracterização molecular dos vírus DENV circulantes durante os anos 2013-2014, a partir do sequenciamento do gene do envelope viral.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Tipo de estudo**

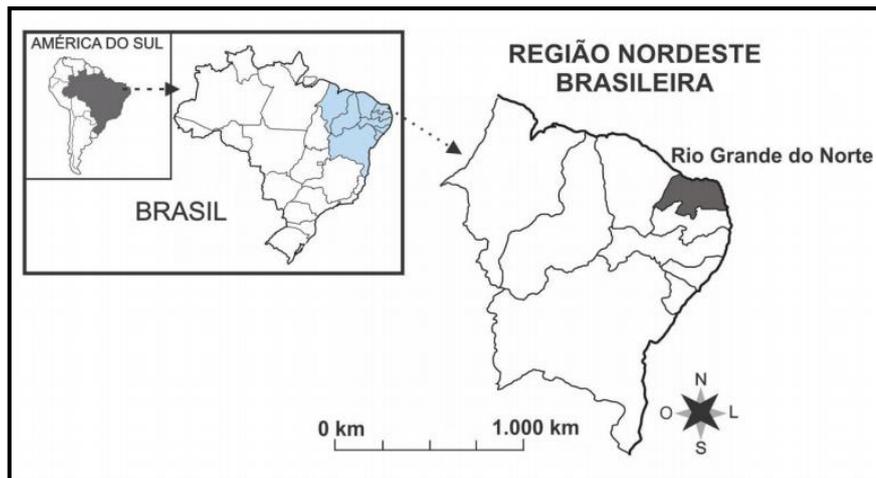
Trata-se de um estudo epidemiológico observacional transversal, predominantemente descritivo, de dados primários.

### **4.2. Local de estudo**

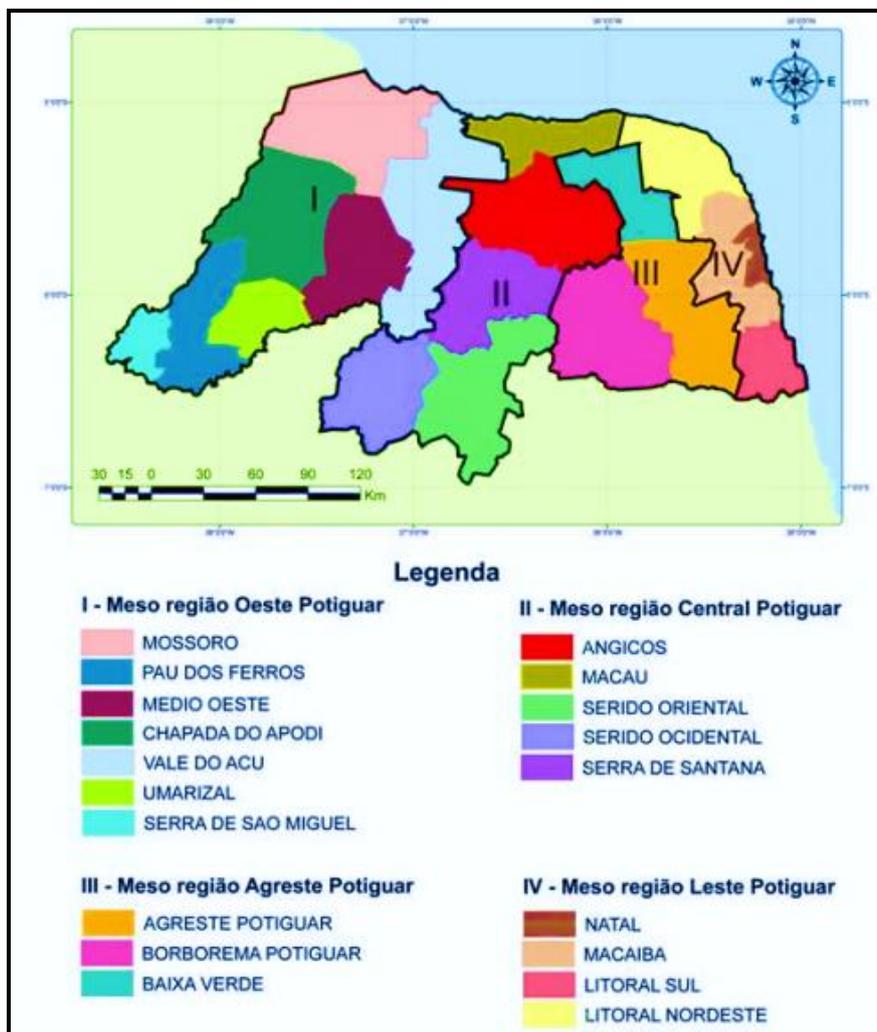
O presente estudo foi realizado no Estado do Rio Grande do Norte, localizado na região Nordeste do Brasil, limitando-se a Oeste com o Estado do Ceará, ao Sul com a Paraíba e a Leste e Norte com o Oceano Atlântico (Figura 6). O Estado situa-se entre os paralelos de 4°49'53'' e 6°58'57'' latitude sul, e os meridianos de 35°58'03'' e 38°36'12'' a oeste de Greenwich. Possui extensão territorial de 52.811,126 km<sup>2</sup>, população estimada em 3.168.027 habitantes e densidade demográfica de 59,99 habitante/km<sup>2</sup> (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011).

O RN possui 167 municípios, agrupados em quatro mesorregiões e dezenove microrregiões, que compartilham semelhanças quanto aos seus aspectos físicos e humanos (Figura 7). Na região metropolitana, composta por 10 municípios, está a maior concentração demográfica do Estado (Rio Grande do Norte, 2013).

Como uma das principais atividades econômicas do Estado tem-se o turismo. O RN dispõe de inúmeros atrativos naturais que podem ser observados ao longo dos 400 km de costa litorânea, repletos de praias, lagoas, parrachos, dunas e falésias (Rio Grande do Norte, 2013).



**Figura 6** - Localização do Estado do Rio Grande do Norte (Branco, 2014).



**Figura 7** - Meso e microrregiões do Estado do Rio Grande do Norte (Adaptado de Nascimento et al., 2009).

### **4.3. População de estudo**

Foram incluídas no estudo amostras de soro ou sangue total de casos suspeitos de dengue, provenientes de diferentes centros de saúde e hospitais da rede pública do Estado do Rio Grande do Norte. Um total de 483 amostras (256 de 2013 e 227 de 2014), coletadas até uma semana após o início dos sintomas, foi estudado.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (LADIC) pelo Laboratório Central Doutor Almino Fernandes (LACEN-RN), acompanhadas de ficha de notificação compulsória de dengue, com dados referentes ao paciente e à coleta. As mesmas permaneceram armazenadas em freezer - 70 °C até o momento da utilização.

### **4.4. Fonte de dados**

O Banco de dados do LACEN-RN foi a fonte de informações referente aos casos suspeitos analisados neste estudo. Os dados sobre as regiões geográficas do Estado foram obtidos a partir de documento oficial disponível em <<http://www.seplan.rn.gov.br/arquivos/download/PERFIL%20DO%20RN.pdf>>.

### **4.5. Diagnóstico molecular da infecção pelos vírus DENV**

#### **4.5.1. Extração do RNA viral**

Os RNAs das amostras de soro ou sangue foram extraídos através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), sendo seguido o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente o ensaio foi realizado da seguinte forma: 140 µL de cada amostra foram incubados com tampão de lise AVL durante 10 minutos, posteriormente as amostras foram misturadas com etanol absoluto e aplicadas em uma

coluna de sílica fornecida pelo kit. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas com os tampões AW1 e AW2. Por fim, o RNA foi eluído das colunas utilizando 60 µL do tampão AVE e armazenado à - 70 °C para posterior utilização.

#### 4.5.2. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

A partir do RNA obtido na etapa anterior foi realizada a transcrição reversa para obtenção do cDNA de cada amostra, os quais foram submetidos à amplificação conforme descrito por Lanciotti e colaboradores (1992). Este protocolo consiste em um procedimento de duas etapas, *semi-nested*, que é capaz de detectar os quatro sorotipos do vírus simultaneamente. No final do processo são gerados amplicons com tamanhos (pb) específicos para cada sorotipo.

Na primeira etapa do ensaio, para cada amostra, foram utilizados 0,75 µL de iniciadores consensuais a 10 µM (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as sequências dos genes que codificam as proteínas C e prM. No procedimento *semi-nested*, referente à segunda etapa, foram utilizados por reação: 0,75 µL de iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 também a 10µM, para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1** - Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.

Oligonucleotídeo iniciador (sentido do primer)	Sequência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon em pb
D1 (+)	5'-TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-	134 – 161	511
D2 (-)	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-	616 – 644	511
TS1 (-)	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-	568 – 586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-	232 – 252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-	400 – 421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'-CTCTGTGTCTTAAACAAGAGA-	506 – 527	392 (D1 + TS4)

Na primeira etapa da reação, a transcrição reversa seguida da amplificação, foi realizado o seguinte procedimento: em microtubos de 0,3 mL, tipo eppendorf<sup>®</sup>, 2,5 µL do RNA extraído, previamente descongelado, foram adicionados à 22,5 µL da mistura para RT-PCR (Tabela 2). Imediatamente os microtubos foram colocados no bloco

aquecido do termociclador. A transcrição reversa ocorreu no primeiro momento da ciclagem, a uma temperatura de 45 °C durante 45 minutos, logo após as amostras foram submetidas a 30 ciclos subsequentes de desnaturação (94 °C por 35 segundos), hibridização (56 °C por 1 minuto), extensão (72 °C por 2 minutos) e mais 10 minutos de extensão final, a 72 °C.

Na segunda etapa do ensaio, os produtos da primeira etapa foram previamente diluídos. Para isto, 2,5 µL do produto da primeira etapa foram misturados a 247,5 µL de água livre de nucleases (IDT, Iowa, USA). Em novos microtubos de 0,3 mL foram adicionados 2,5 µL da diluição em 22,5 µL da mistura para o *semi-nested* PCR (Tabela 2). Imediatamente as amostras foram levadas para o termociclador e submetidas a 20 ciclos de desnaturação (94 °C por 35 segundos), hibridização (56 °C por 1 minuto), extensão (72 °C por 2 minutos) e um período de extensão final (72 °C por 10 minutos).

**Tabela 2** -Relação dos reagentes utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para detecção dos sorotipos dos vírus dengue.

Reagentes	Mistura para RT-PCR (volume para uma reação)	Mistura para <i>semi-nested</i> (volume para uma reação)
Água livre de nucleases	8µL	6,25µL
Iniciador D1 (100µM)	0,75µL	0,75µL
Iniciador D2 (100µM)	0,75µL	---
Iniciadores TS1-TS4 (100µM)	---	0,75µL
5U/µL enzima AMV-RT	0,5µL	---
PCR Master Mix 2x	12,5µL	12,5µL
RNA	2,5µL	---
cDNA da RT-PCR	---	2,5µL

Para visualização e análise dos produtos amplificados, foi realizada eletroforese horizontal à 100 V, por aproximadamente 60 minutos. Neste procedimento 5 µL do produto amplificado, misturados a 2,5 µL de azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA) e 2,5 µL de Gel Red<sup>®</sup> foram aplicados em um gel de agarose (BioAmerica, Inc., Miami, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5 X e, visualizados em luz ultravioleta.

## **4.6. Caracterização molecular**

### **4.6.1. Elaboração do banco de sequências nucleotídicas**

Sequências completas do gene do envelope dos vírus Dengue tipo 1 e 4 foram coletadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), objetivando relacionar filogeneticamente os DENV isolados neste estudo com os de diversos outros países.

Foram selecionados os isolados que apresentavam informações completas referentes ao ano e local de isolamento, sendo descartados os que não apresentavam tais informações, bem como os que eram identificadas como recombinantes (Worobey et al., 1999), utilizando os mesmos critérios adotados por Twiddy e colaboradores (2003). As cepas foram identificadas pelo ano, seguidos da sigla de duas letras do país de origem (lista de abreviaturas disponível em <http://www.inf.ufrgs.br/~cabral/Paises.html>) e do número de acesso ao GenBank. Apenas quatro sequências do mesmo ano e local foram coletadas.

### **4.6.2. Sequenciamento do gene do envelope**

Objetivando realizar a caracterização genética dos vírus DENV-1 e 4, foi realizado o sequenciamento da região do envelope viral, região esta considerada informativa para estudos de filogenia, sendo utilizada frequentemente em trabalhos desta natureza (Lanciotti et al. 1994; Araújo 2009b). A partir da estratégia de *primer walking*, foram utilizados iniciadores capazes de amplificar cerca de 900 pb por região, sendo 200 pb de sobreposição entre as regiões. O sequenciador utilizado foi o da Applied Biosystem ABI-3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA) disponível na plataforma genômica de sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

#### 4.6.2.1. Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene do envelope do DENV-1 (Tabela 3) foram desenhados por Araújo (2009b).

**Tabela 3** - Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope do DENV-1 (Araújo, 2009b).

Região	Primer sense A (5'-3')	Primer antisense B (5'-3')	Posição do genoma (de acordo com AF513110)	Produto (pb)	Tm (°C) A/B
1	TTA GTC TAC GTG GAC CGA CAA GAA	GCC TAT TCC CAC GCA TCG	6 – 938	932	62/63
2	TGA CCT ATG GGA CGT GTT CTC A	GAG TCC AAT GTG AGG GCT CC	660 – 1469	809	63/63
3	GAC GCG AAC TTT GTG TGT CG	GGC GCA TCT GTT CCT TCG TA	1193 – 1900	707	63/64
4	GTG GGA TCA CAA GAA GGA GCA	CCA ATG GCT GCT GAC AGT CTT	1691 – 2539	848	63/63
5	GGG ATT AAA TTC AAG GAG CAC G	ACT TGC CTA GAT GCC ATG GC	2332 – 3217	885	62/62

Quanto ao sorotipo 4, os oligonucleotídeos utilizados neste estudo foram desenhados por Sousa (2014) e Branco (2014).

**Tabela 4** - Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-4 (Sousa, 2014; Branco, 2014).

Região	Primer sense A (5'-3')	Primer antisense B (5'-3')	Posição do genoma (de acordo com JN559741.2)	Produto (pb)	Tm (°C) A/B
1	TCC AAA TCG GAA GCT TGC TT	GAC CCA TGC TCC ACC TGA GA	11 – 978	967	59/60
2	GGA AGC ATG CTC AGA GAG TAG AGA	ATC CCA GCA CTG TCA CAT CCT	767 – 1678	911	58/58
3	GTC ACC ATC GGT TGA AGT CAA A	GCA CGT CAT GGC CAT TGA	1416 – 2352	936	59/59
4	TCA TTG GGA AAG GCT GTG C	CCA TGG ACC CAC GGT TTG	2206 – 3187	981	58/59
5	GTG TGT GAC CAC AGG CTG ATG	CCT CA AGC CAT GAC CAA TG	2932 – 3932	1000	59/60

#### 4.6.2.2. RT-PCR para sequenciamento

Em um tubo do tipo eppendorf<sup>®</sup> foram adicionados 25 µL do Acessquick Master Mix (2x) (Promega, Madison, EUA), 14 µL de água livre de nucleases (Promega, Madison, EUA), 2,5 µL (500 nM) do iniciador *sense* (Invitrogen, EUA), 2,5 µL (500 nM) do iniciador *antisense* (Invitrogen, EUA) e 1 µL da enzima AMV-RT (Promega, Madison, EUA). Por fim, foram adicionados 5 µL do RNA extraído e o tubo foi submetido à agitação com auxílio de um vórtex.

Nos primeiros 60 minutos, a uma temperatura de 45 °C, o RNA foi reversamente transcrito, seguidos da ativação da enzima a 95 °C por 2 min, de 30 ciclos de desnaturação 94 °C por 30 segundos, 54°C-62 °C por 1 minuto (dependendo do par de primers utilizado) e 72 °C por 2 minutos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. O termociclador utilizado no ensaio de amplificação foi o modelo 22331 (Eppendorf AG, Hamburg, GER).

Finalizada a RT-PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Inc., Miami, USA – cat n° D1500 – LE) a 1% em TBE 0,5 X, por 60 minutos a 100 V, para análise dos produtos amplificados.

#### 4.6.2.3. Purificação direta do produto de PCR

A partir da visualização do gel de agarose descrito no item 4.6.2.2, quando foram observados amplicons únicos a purificação foi realizada de maneira direta, isto é, a partir do próprio produto da RT-PCR. Para isto foi utilizado o kit comercial PCR Purification (Qiagen, Inc., Valencia, CA), sendo seguido o protocolo descrito pelo fabricante.

Resumidamente o ensaio se deu da seguinte maneira: em um tubo do tipo eppendorf<sup>®</sup>, de 1,5 mL, foram adicionados 5 volumes de Buffer PB para 1 volume de reação de RT-PCR (225 µL de Buffer para 45 µL de reação), a solução foi homogeneizada em um agitador do tipo vórtex e em seguida transferida para a coluna fornecida pelo kit. A coluna foi centrifugada por 60 segundos a 14.000 rpm e o filtrado

foi desprezado. Foram adicionados 750  $\mu$ L do buffer PE, a coluna foi centrifugada por 60 segundos a 14.000 rpm e o filtrado foi novamente desprezado. A coluna foi mais uma vez submetida à centrifugação por 1 minuto a 14.000 rpm e então transferida para um tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 30  $\mu$ L de buffer EB ou de água livre de nucleases e a amostra foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. Por fim, houve uma última centrifugação de 1 minuto a 14.000 rpm e o DNA purificado foi então armazenado a - 20 °C para uso posterior.

#### **4.6.2.4. Purificação do produto de PCR por extração de gel de agarose**

Quando, no gel de agarose descrito em 4.6.2.2, foram observados amplicons além do de interesse, ou seja, amplicons inespecíficos, foi realizado um gel de purificação.

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 0,7%, 100 V. Todo o volume da reação de RT-PCR, misturado a 5  $\mu$ L de GelRed<sup>®</sup> e 5  $\mu$ L de azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA) foi aplicado nos poços gerados pelo pente. O gel foi analisado na luz ultravioleta e apenas os amplicons de interesse foram cortados, com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis. Uma vez cortados, os fragmentos foram transferidos para tubos de 1,5 mL e foi realizada a purificação utilizando o kit comercial Gel Extraction (Qiagen, Inc., Valencia, CA).

O ensaio se deu da seguinte maneira: para cada 100 mg de fragmento de gel foram adicionados 300  $\mu$ L de Buffer QG, o tubo foi incubado a 50 °C por 10 minutos, sendo homogeneizado a cada 2-3 minutos com auxílio do vórtex. Transcorrida a incubação, estando o gel completamente dissolvido, a cor da mistura foi verificada, devendo estar amarela, semelhante ao buffer QG. Em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L de isopropanol à amostra e a mesma foi transferida para a coluna fornecida pelo kit. A coluna foi submetida à centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm, o filtrado foi desprezado, foram adicionados 500  $\mu$ L do Buffer QG e a coluna centrifugada novamente, seguindo os mesmos parâmetros. Em seguida, o filtrado foi desprezado e foram adicionados 750  $\mu$ L de Buffer PE, seguido de uma nova centrifugação por 1 minuto. O filtrado foi desprezado e a amostra foi incubada a temperatura ambiente por 2

a 5 minutos, seguida de mais duas centrifugações. Por fim, a coluna foi encaixada em um tubo eppendorf® de 1,5 mL, foram adicionados 30 µL de Buffer EB ou água livre de nucleases e a mesma foi centrifugada por 1 minuto. O DNA purificado foi, finalmente, estocado a - 20 °C para posterior utilização.

#### 4.6.2.5. Quantificação do DNA

Considerando que a concentração de cDNA utilizada no sequenciamento é crucial para o sucesso da reação, é indispensável que o mesmo seja quantificado. Deste modo, objetivando quantificar o DNA purificado e determinar a quantidade ideal a ser adicionada na reação de PCR de sequenciamento, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2%, em TBE 0,5 X.

No primeiro poço do gel foram aplicados 4 µL do peso molecular de massa (Invitrogen, Carlsbad, CA), misturados a 2 µL de GelRed® e 2 µL de azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA). No poço seguinte foram adicionados 4 µL do DNA purificado a ser quantificado, juntamente com 2 µL de GelRed® e 2 µL de azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA). O procedimento ocorreu a 100 V, durou aproximadamente 60 minutos e a concentração do DNA foi estimada a partir da comparação com o peso molecular de massa (Low Mass DNA), de acordo com a bula apresentada pelo fabricante (Tabela 5).

**Tabela 5** -Valores de referência para quantificação do DNA para a reação de sequenciamento.

Tamanho do fragmento	Low Mass DNA (4 µL)	DNA (µL/reação)
1200 pb	120 ng	2 µL
800 pb	80 ng	4 µL
400 pb	40 ng	5 µL
200 pb	20 ng	6 µL
100 pb	10 ng	8 µL

#### **4.6.2.6. Reação de sequenciamento**

Em um microtubo de 0,3 mL foram adicionados 2  $\mu$ L do primer específico (*sense ou antisense*), 2  $\mu$ L de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, Foster City, CA), acrescido da quantidade de DNA determinada pelo ensaio de quantificação (descrito no item 4.7.2.5). Por fim, o volume foi completado com água livre de nucleases, objetivando um volume final de 10  $\mu$ L.

A mistura foi submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 2 minutos com a TM específica do *primer* utilizado e 30 ciclos de 3 minutos a 72 °C. Para este ensaio de amplificação foi utilizado o termociclador modelo 22331 (Eppendorf AG, Hamburg, GER).

#### **4.6.2.7. Purificação do DNA para remoção de dye terminators e processamento da amostra**

A purificação e precipitação do DNA foram realizadas a partir de colunas Centri-Sep (Princeton Separations, Inc, Adelphia, NJ).

Para a hidratação da coluna foram adicionados 800  $\mu$ L de água livre de nucleases à mesma. A coluna foi submetida à agitação com auxílio de um vórtex e deixada em repouso por 30 minutos, evitando a formação de bolhas. Transcorrido o tempo de incubação foi verificada a presença de bolhas que, quando presentes, foram removidas com o auxílio de uma micropipeta. A tampa inferior da coluna foi removida, permitindo assim a drenagem do excesso de água para um tubo de 2 mL. A água drenada foi desprezada e a coluna, encaixada ao tubo coletor de 2 mL, foi centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm. Por fim, o tubo de coleta, contendo o excesso de água drenada, foi desprezado e os 10  $\mu$ L da reação de sequenciamento foram transferidos para o centro do gel, na coluna. A coluna foi então encaixada em um tubo do tipo eppendorf® de 1,5 mL e centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm. Finalmente a coluna foi desprezada e a amostra foi submetida à secagem em estufa por 18 horas a 37 °C.

O sedimento foi ressuspensão em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, P/N 4311320), aquecido por 2 minutos a 95 °C e mantido no banho de gelo até o momento de aplicação na placa de 96 orifícios do sequenciador automático Applied Biosystems ABI-3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### **4.7. Análise das sequências**

As sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas Lite versão 2.1 (Technelysium Pty Ltd) e editadas manualmente por meio de alinhamentos feitos no Clustal W2 (Thompson et al., 1997) com sequência referência coletada no NCBI.

Foi realizado o alinhamento múltiplo dos isolados deste estudo com os do banco de sequências (descrito no item 4.6.1) utilizando o programa Clustal W2. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método de Neighbor-Joining, modelo Tamura-Nei, com auxílio do software MEGA versão 6 (<http://www.megasoftware.net/>).

#### **4.8. Análise de dados**

Para análise dos dados das fichas de notificação, fornecidas pelo LACEN-RN, o programa Microsoft Office Access<sup>®</sup> 2010 foi utilizado. Para a construção de gráficos e tabelas foram utilizados o Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2010 e o Microsoft Office Word<sup>®</sup> 2010, respectivamente.

#### **4.9. Considerações éticas**

O projeto que originou este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Protocolo N° 136/2009 CEP-UFRN).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Monitoramento dos sorotipos dos vírus DENV circulantes no Rio Grande do Norte, 2013-2014.

Durante o período de estudo, 2013-2014, foi realizada a vigilância virológica da dengue no Estado do Rio Grande do Norte através da detecção da presença do vírus, utilizando a metodologia de RT-PCR.

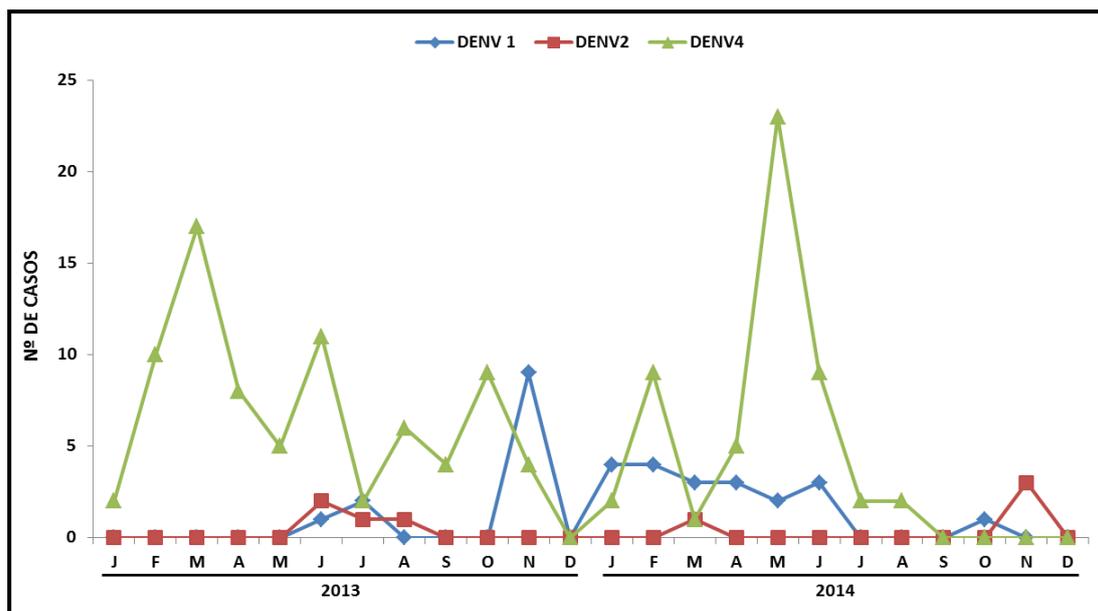
Foram analisadas 483 amostras de pacientes com suspeita clínica de dengue, no período compreendido entre Janeiro de 2013 a Dezembro de 2014, sendo 256 delas referentes ao ano de 2013 e 227 de 2014. A infecção pôde ser confirmada em 36,44% (176/483) dos casos. Quanto ao percentual de detecção do vírus por ano, constatou-se que no ano de 2013 foi detectado um percentual de 37,89% (97/256) e em 2014, 34,80% (79/227) (Tabela 6).

**Tabela 6** - Percentual de detecção dos DENV por ano de estudo.

<b>Diagnóstico por RT-PCR/Ano</b>		
	<b>2013</b>	<b>2014</b>
<b>Positivos/ Analisados</b>	37,89% (97/256)	34,80% (79/227)

Foi constatada a cocirculação de três dos quatro sorotipos da dengue, em ambos os anos, sendo eles: DENV-1, DENV-2 e DENV-4. O sorotipo 4 foi o predominante, representando 76,70% (135/176) dos casos estudados. O sorotipo 1 representou 18,75% (33/176), enquanto o 2 representou apenas 4,55% (8/176).

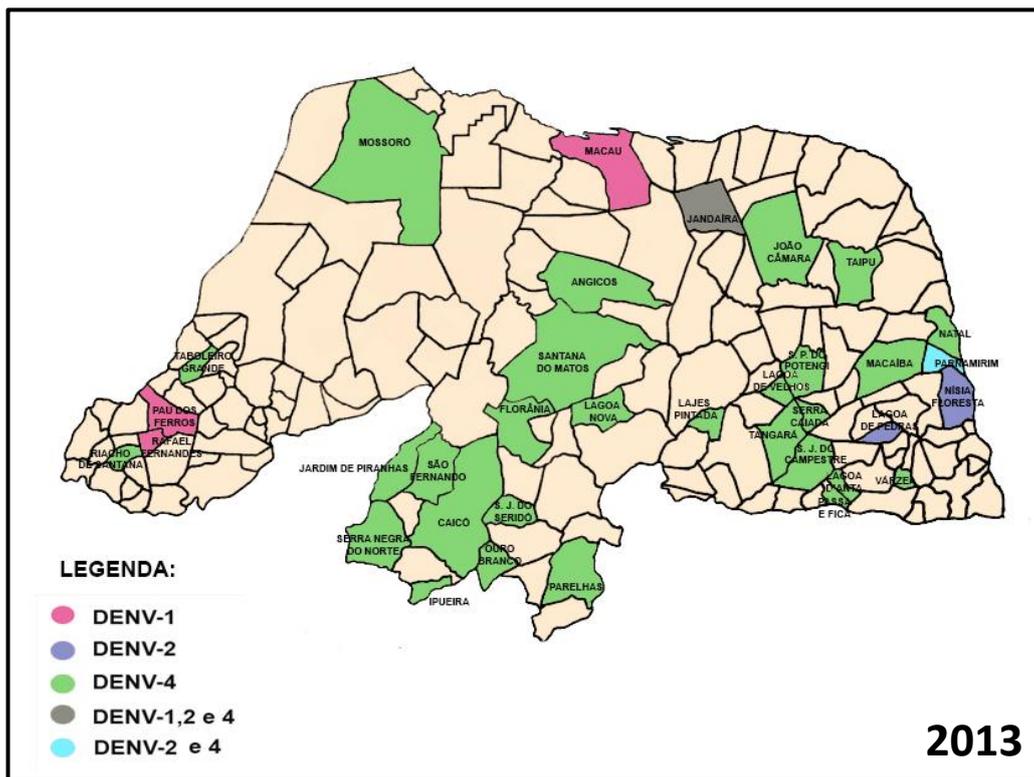
Estratificando por ano, em 2013 o DENV-4 representou 83,51% (81/97) dos casos positivos, o DENV-1 representou 12,37% (12/97) e o DENV-2 4,12% (4/97). Em 2014 a predominância continuou sendo do DENV-4 detectado em 68,35% (54/79) dos casos positivos, seguido do DENV-1 com 26,58% (21/79) e do DENV-2 com 5,06% (4/79) dos casos confirmados (Figura 8).



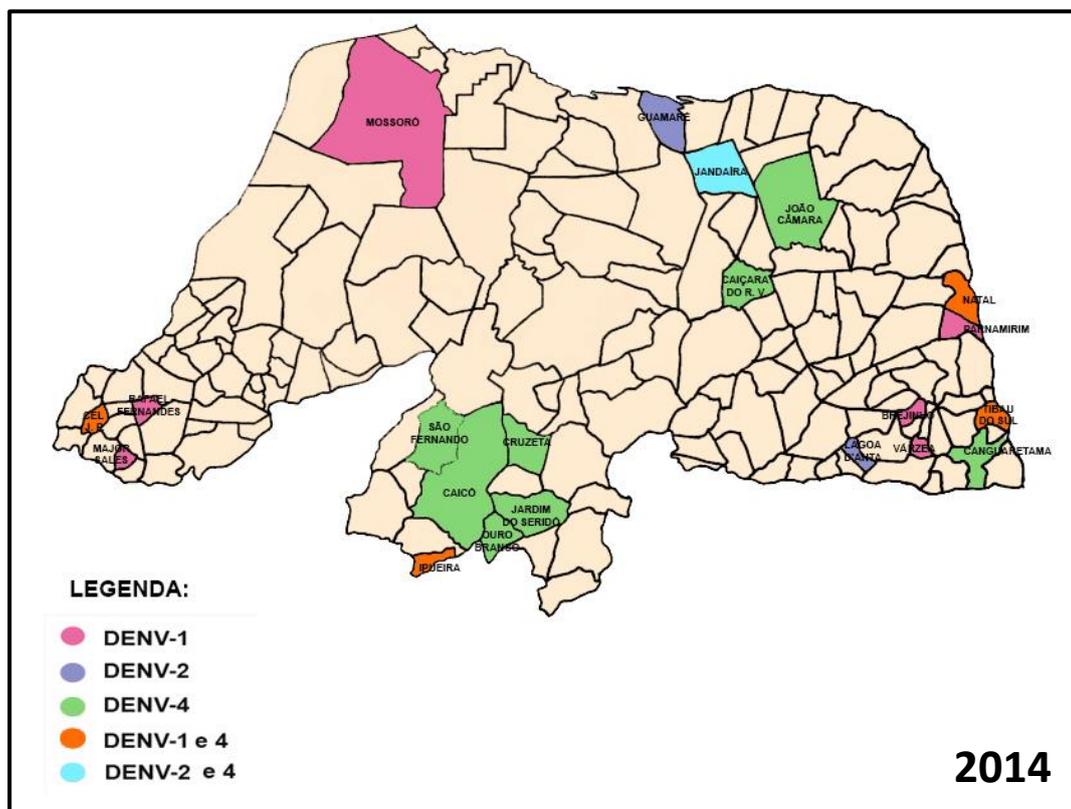
**Figura 8** - Distribuição de sorotipos detectados por mês, 2013 a 2014.

## 5.2. Distribuição geográfica dos casos de dengue nos municípios do Rio Grande do Norte, 2013-2014.

A partir da análise detalhada das fichas de notificação foi possível realizar a distribuição dos casos positivos e dos sorotipos da dengue pelos municípios do RN. No ano de 2013 verificou-se a circulação dos vírus DENV-1, DENV-2 e DENV-4 em 35 municípios, já em 2014 a presença dos mesmos sorotipos foi constatada em 21 dos 167 municípios do Estado. Todas as quatro mesorregiões do Estado apresentaram mais de um município com positividade para a dengue (Figuras 9 e 10).



**Figura 9** - Mapa do Rio Grande do Norte demonstrando a distribuição geográfica dos sorotipos do vírus DENV, ano 2013.



**Figura 10** - Mapa do Rio Grande do Norte demonstrando a distribuição geográfica dos sorotipos do vírus DENV, ano 2014.

Em 2013 o maior número de casos ocorreu nos municípios de Caicó, Lagoa d'Anta, Lagoa de Velhos, Natal, Parelhas, Parnamirim, Pau dos Ferros e Serra Negra do Norte. A cocirculação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foi verificada em Jandaíra e, em Parnamirim, houve a cocirculação dos sorotipos 2 e 4 (Tabela 7). No que concerne ao ano de 2014, o maior número de casos concentrou-se nos municípios de Caicó, Coronel João Pessoa, Jandaíra e Natal. Houve cocirculação dos sorotipos 1 e 4 nos municípios de Coronel João Pessoa, Ipueira, Natal e Tibau do Sul e, dos sorotipos 2 e 4 em Jandaíra (Tabela 8).

**Tabela 7** - Relação dos casos positivos, percentual de positividade e sorotipos detectados por municípios do Estado do Rio Grande do Norte, ano 2013.

<b>Municípios</b>	<b>Nº de positivos</b>	<b>% de positivos</b>	<b>Sorotipos detectados</b>
Angicos	1	1,03%	1 DENV-4
Caicó	5	5,15%	5 DENV-4
Florânia	2	2,06%	2 DENV-4
Ipueira	1	1,03%	1 DENV-4
Jandaíra	4	4,12%	2 DENV 1, 1 DENV 2 e 1 DENV 4
Jardim de Piranhas	1	1,03%	1 DENV-4
João Câmara	1	1,03%	1 DENV-4
Lagoa D'anta	5	5,15%	5 DENV-4
Lagoa de Pedras	1	1,03%	1 DENV-2
Lagoa de Velhos	6	6,19%	6 DENV-4
Lagoa Nova	1	1,03%	1 DENV-4
Lajes Pintadas	1	1,03%	1 DENV-4
Macaíba	1	1,03%	1 DENV-4
Macau	1	1,03%	1 DENV-1
Mossoró	1	1,03%	1 DENV-4
Natal	9	9,28%	9 DENV-4
Nísia Floresta	1	1,03%	1 DENV-2
Ouro Branco	2	2,06%	2 DENV-4
Parelhas	5	5,15%	5 DENV-4
Parnamirim	6	6,19%	1 DENV 2 e 5 DENV 4
Passa e Fica	1	1,03%	1 DENV-4
Pau dos Ferros	8	8,25%	8 DENV-1
Rafael Fernandes	1	1,03%	1 DENV-1
Riacho de Santana	2	2,06%	2 DENV-4
São José do Campestre	2	2,06%	2 DENV-4
Santana do Matos	2	2,06%	2 DENV-4
São Fernando	1	1,03%	1 DENV-4
São José do Seridó	4	4,12%	4 DENV-4
São Paulo do Potengi	1	1,03%	1 DENV-4
Serra Caiada	2	2,06%	2 DENV-4
Serra Negra do Norte	5	5,15%	5 DENV-4
Taboleiro Grande	1	1,03%	1 DENV-4
Taipu	3	3,09%	3 DENV-4
Tangará	2	2,06%	2 DENV-4
Várzea	4	4,12%	4 DENV-4
Não Informado	3	3,09%	3 DENV-4
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>100,00%</b>	<b>12 DENV-1, 4 DENV-2 e 81 DENV-4</b>

**Tabela 8** - Relação dos casos positivos, percentual de positividade e sorotipos detectados por municípios do Estado do Rio Grande do Norte, ano 2014.

Municípios	Nº de positivos	% de positivos	Sorotipos detectados
Brejinho	1	1,27%	1 DENV-1
Caiçara do Rio do Vento	1	1,27%	1 DENV-4
Caicó	15	18,99%	15 DENV-4
Canguaretama	1	1,27%	1 DENV-4
Coronel João Pessoa	13	16,46%	3 DENV-1 e 10 DENV-4
Cruzeta	4	5,06%	4 DENV-4
Guamaré	2	2,53%	2 DENV-2
Ipueira	3	3,80%	2 DENV-1 e 1 DENV-4
Jandaira	10	12,66%	1 DENV-2 e 9 DENV-4
Jardim do Seridó	1	1,27%	1 DENV-4
João Câmara	1	1,27%	1 DENV-4
Lagoa D'anta	1	1,27%	1 DENV-2
Major Sales	2	2,53%	2 DENV-1
Mossoró	1	1,27%	1 DENV-1
Natal	6	7,59%	2 DENV-1 e 4 DENV-4
Ouro Branco	3	3,80%	3 DENV-4
Parnamirim	1	1,27%	1 DENV-1
Rafael Fernandes	4	5,06%	4 DENV-1
São Fernando	2	2,53%	2 DENV-4
Tibau do Sul	4	5,06%	3 DENV-1 e 1 DENV-4
Várzea	1	1,27%	1 DENV-1
Não Informado	2	2,53%	1 DENV-1 e 1 DENV-4
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>100,00%</b>	<b>21 DENV-1, 4 DENV-2 e 54 DENV-4</b>

### 5.3. Análise de sazonalidade

A análise de sazonalidade dos casos de dengue revelou que, em 2013, Fevereiro, Março, Junho e Novembro foram os meses que apresentaram maior número de casos positivos da doença, sendo o mês de Março o mais representativo, com 17,53% (17/97) dos casos confirmados (Tabela 9 e Figura 11).

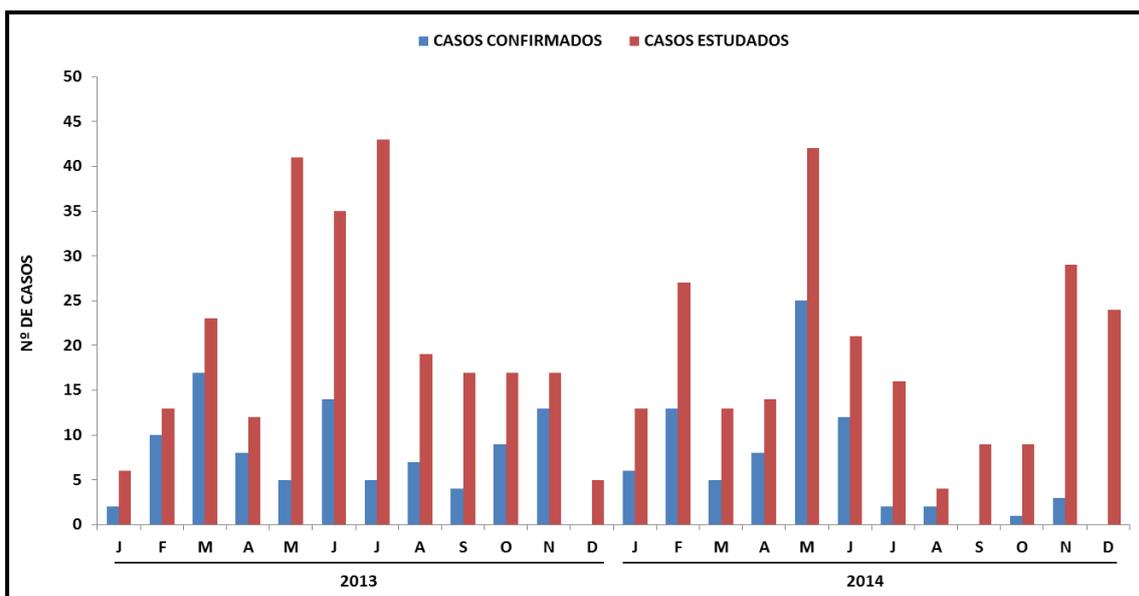
**Tabela 9** - Distribuição mensal dos casos confirmados, casos estudados e sorotipos detectados de dengue no Estado do Rio Grande do Norte, ano 2013.

Mês	Nº de casos confirmados	Nº de casos estudados	Sorotipos detectados
Janeiro	2	6	2 DENV-4
Fevereiro	10	13	10 DENV-4
Março	17	23	17 DENV-4
Abril	8	12	8 DENV-4
Maio	5	41	5 DENV-4
Junho	14	35	1 DENV-1, 2 DENV-2 e 11 DENV-4
Julho	5	43	2 DENV-1, 1 DENV-2 e 2 DENV-4
Agosto	7	19	1 DENV-2 e 6 DENV-4
Setembro	4	17	4 DENV-4
Outubro	9	17	9 DENV-4
Novembro	13	17	9 DENV-1 e 4 DENV-4
Dezembro	0	5	---
Não Informado	3	8	3 DENV-4
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>256</b>	<b>12 DENV-1, 4 DENV-2 e 81 DENV-4</b>

Em 2014, os meses de Fevereiro, Maio e Junho foram os de maior positividade, com destaque para Maio, que sozinho representou 31,65% (25/79) dos casos confirmados, sendo o mês mais representativo do ano (Tabela 10 e Figura 11).

**Tabela 10** - Distribuição mensal dos casos confirmados, casos estudados e sorotipos detectados de dengue no Estado do Rio Grande do Norte, ano 2014.

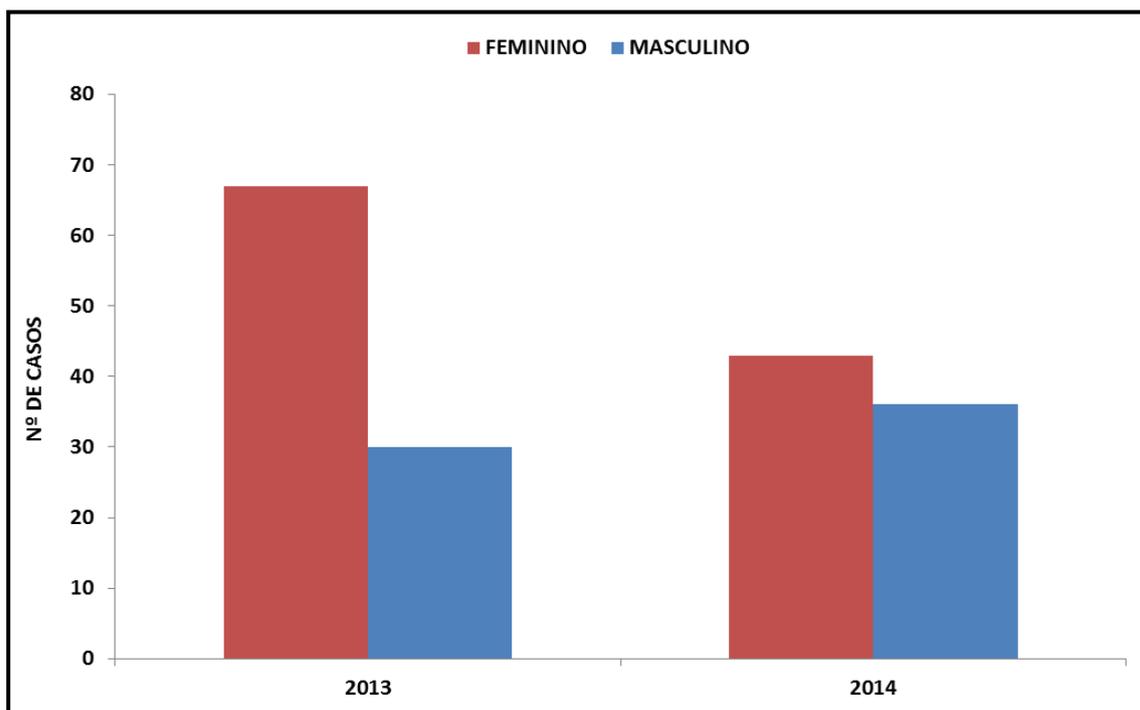
Mês	Nº de casos confirmados	Nº de casos estudados	Sorotipos detectados
Janeiro	6	13	4 DENV-1 e 2 DENV-4
Fevereiro	13	27	4 DENV-1 e 9 DENV-4
Março	5	13	3 DENV-1, 1 DENV-2 e 1 DENV-4
Abril	8	14	3 DENV-1 e 5 DENV-4
Maio	25	42	2 DENV-1 e 23 DENV-4
Junho	12	21	3 DENV-1 e 9 DENV-4
Julho	2	16	2 DENV-4
Agosto	2	4	2 DENV-4
Setembro	0	9	---
Outubro	1	9	1 DENV-1
Novembro	3	29	3 DENV-2
Dezembro	0	24	---
Não Informado	2	6	1 DENV-1 e 1 DENV-4
<b>Total</b>	<b>79</b>	<b>227</b>	<b>21 DENV-1, 4 DENV-2 e 54 DENV-4</b>



**Figura 11** - Distribuição mensal de casos confirmados e estudados de dengue, 2013-2014.

#### **5.4. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo como gênero.**

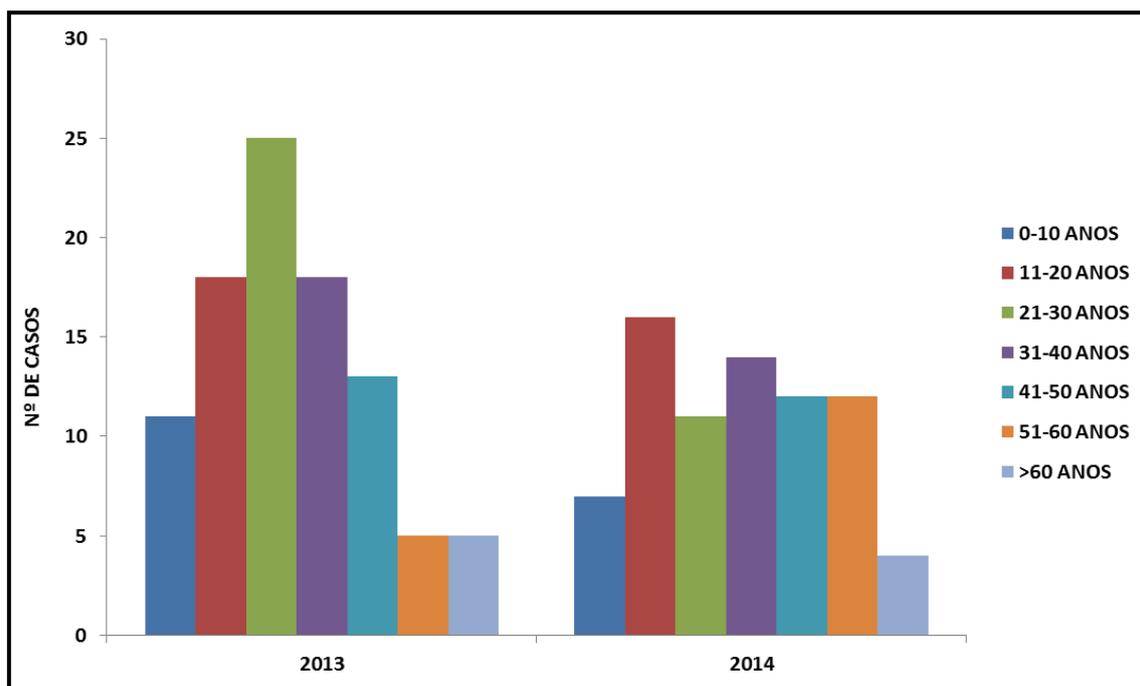
A análise das fichas individuais dos pacientes mostrou que, nos dois anos de estudo, o sexo feminino foi o mais afetado pela dengue no Estado do Rio Grande do Norte, representando 69,07% (67/97) dos casos positivos em 2013 e 54,43% (43/79) em 2014 (Figura 12).



**Figura 12** - Casos positivos de dengue por gênero, 2013-2014.

### **5.5. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com a faixa etária.**

Constatou-se neste estudo que os adultos da faixa etária de 21-30 anos foi o segmento da população mais atingido pela dengue no Estado, durante o ano de 2013, representando 25,77% (25/97) dos casos positivos. Em 2014, os jovens da faixa etária de 11-20 anos foram os mais acometidos pela doença, representando 20,25% (16/79) dos casos positivos (Figura 13).



**Figura 13** - Casos positivos de dengue por faixa etária, 2013-2014.

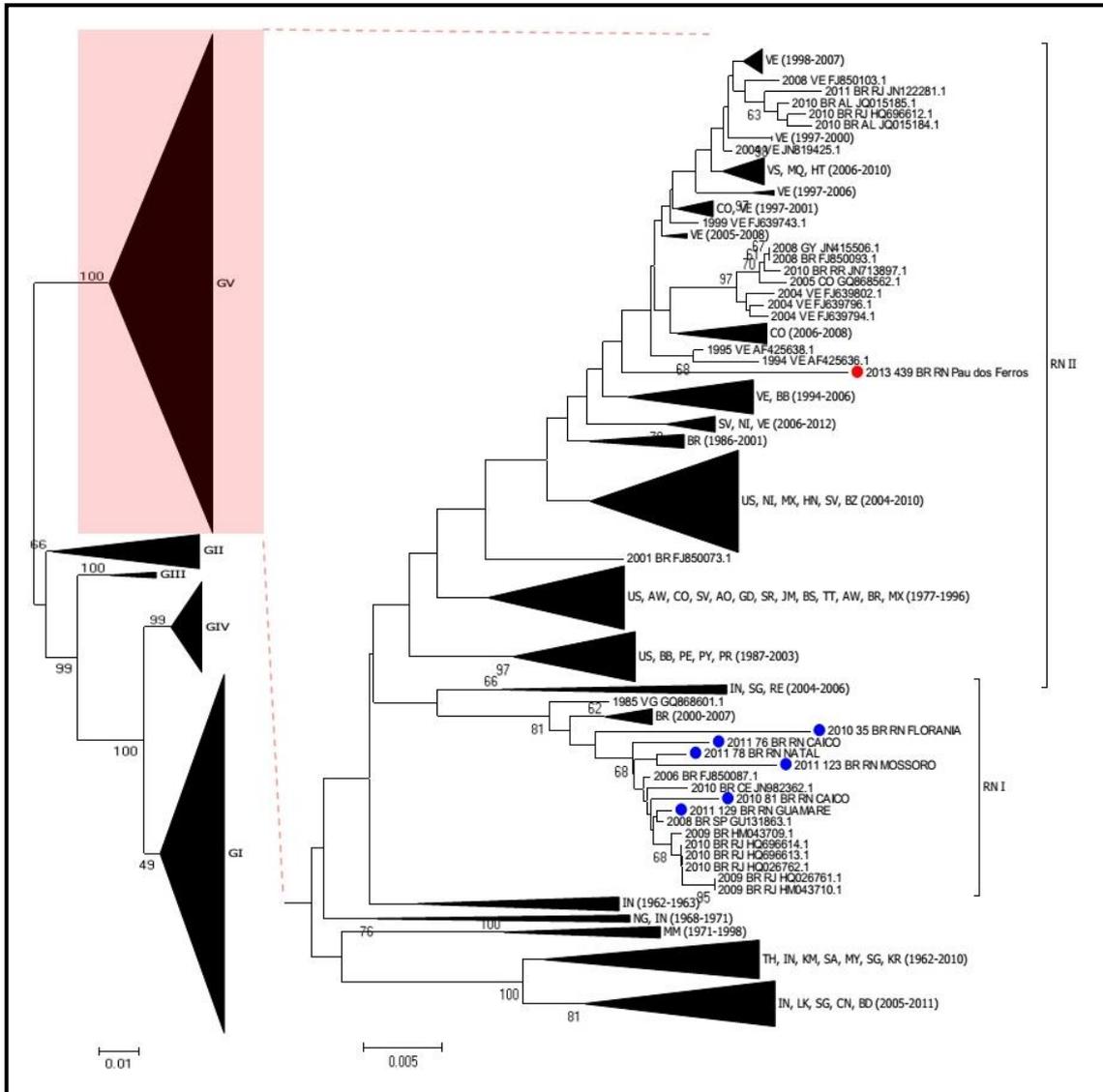
## 5.6. Caracterização molecular dos vírus DENV isolados no Rio Grande do Norte, 2013-2014.

Foram selecionadas uma amostra representante do sorotipo 1 e três do sorotipo 4, isoladas no RN durante os anos de 2013-2014 (Tabela 11), para o sequenciamento da região do gene que codifica a proteína do envelope viral (1485 pb). Os DENV-2 detectados neste estudo não puderam ser recuperados para o sequenciamento.

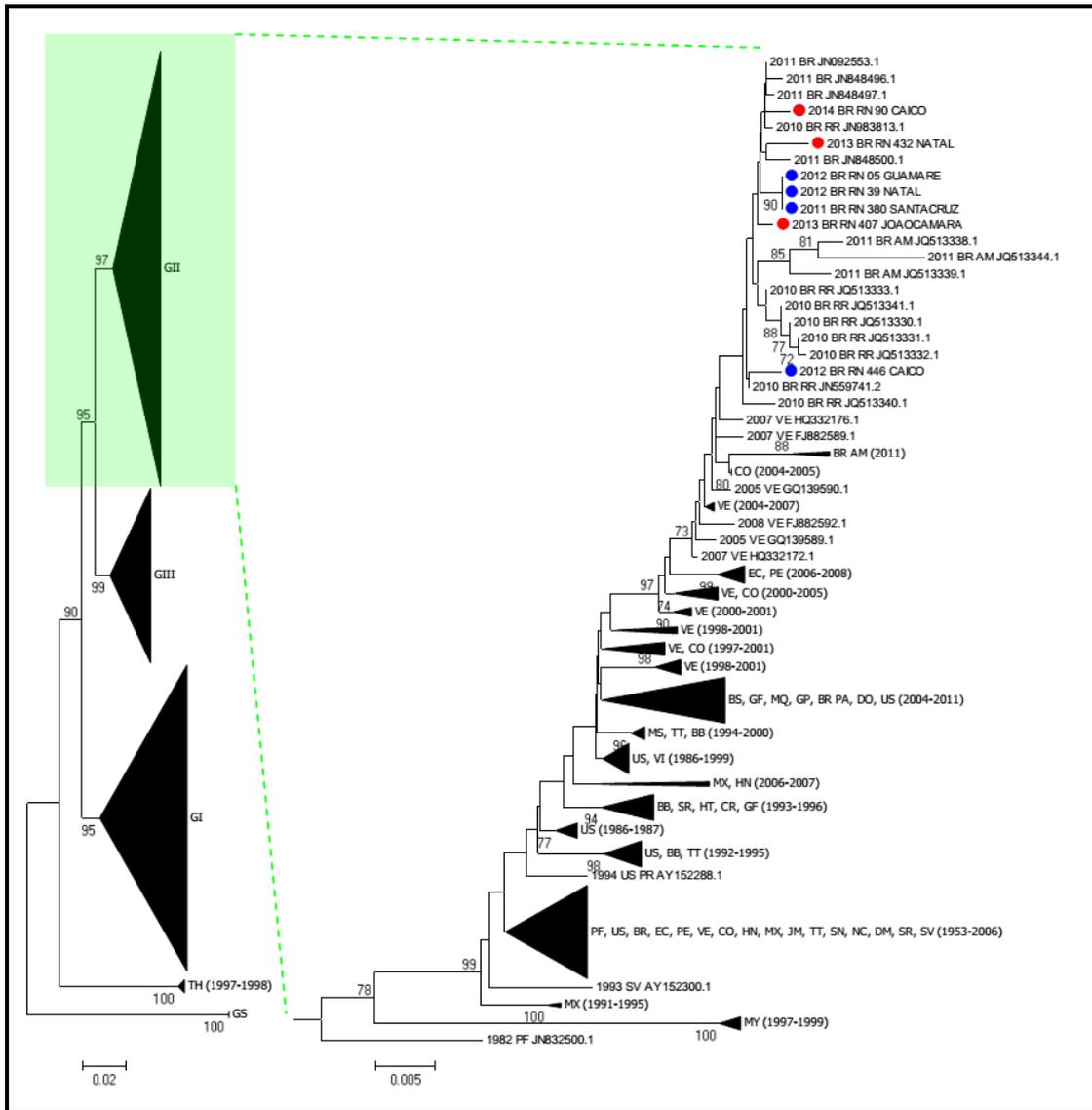
**Tabela 11** - Amostras selecionadas para caracterização molecular com seus respectivos sorotipo, município de origem e ano de coleta.

Número de identificação do LADIC	Sorotipo	Município de origem	Ano
439	DENV-1	Pau dos Ferros	2013
407	DENV-4	João Câmara	2013
432	DENV-4	Natal	2013
90	DENV-4	Caicó	2014

Foi verificada a circulação do genótipo V do DENV-1 (Figura 14) e do genótipo II do DENV-4 (Figura 15).



**Figura 14** - Árvore filogenética dos DENV-1. O genótipo V, em rosa, apresenta amostras potiguares isoladas por Sousa (2014) e Branco (2014) marcadas de azul e, a amostra isolada neste estudo marcada de vermelho. Os números próximos aos ramos da árvore representam os valores de *bootstrap*.



**Figura 15** - Árvore filogenética dos DENV-4. O genótipo II, em verde, apresenta amostras potigüares isoladas por Sousa (2014) e Branco (2014) marcadas de azul e, marcadas de vermelho, as amostras isoladas neste estudo. Os números próximos aos ramos da árvore representam os valores de *bootstrap*.

## 6. DISCUSSÃO

Desde a introdução dos vírus dengue no Brasil, a região Nordeste vem sendo amplamente atingida por epidemias da doença (Barboza et al., 2013). O Estado do Rio Grande do Norte convive com esta importante arbovirose desde 1994, ano em que os primeiros casos foram notificados. Passados mais de 20 anos a população potiguar vem convivendo com sucessivas epidemias de dengue, onde a doença se apresenta com um perfil endêmico (Barbosa et al., 2012).

Apesar do impacto causado à saúde pública do Estado, pouco se conhece a respeito da dinâmica da doença no RN. Isto pode ser constatado pela carência de trabalhos disponíveis sobre a temática. O trabalho mais recente acerca da doença no Estado foi realizado por Barbosa e colaboradores em 2012 e trata-se de um estudo de dados secundários do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, bem como de planilhas paralelas da dengue. O único estudo que trabalhou com dados primários foi desenvolvido há mais de 15 anos por Cunha e colaboradores (1999).

A falta de conhecimentos a respeito da doença no Estado pode ser explicada pelo fato de que o RN carecia de um sistema de vigilância virológica até pouco tempo. Apenas em 2009 o LACEN-RN passou a realizar o isolamento viral em sua rotina de diagnóstico e, no mesmo ano, o nosso laboratório implementou a técnica molecular de RT-PCR, passando a contribuir com a vigilância virológica do Estado.

Considerando que as frequentes epidemias da dengue são coincidentes com a introdução (ou reintrodução) dos diferentes sorotipos, fica clara a grande importância da vigilância virológica.

A relevância do nosso trabalho reside no fato de que através de técnicas laboratoriais rápidas e sensíveis, como a RT-PCR e o sequenciamento viral, é possível definir o perfil epidemiológico da doença e, esse conjunto de informações sobre o comportamento da doença no Estado, pode servir de base para as tomadas de decisões que visam à sua prevenção.

## **6.1. Monitoramento dos sorotipos dos vírus DENV circulantes no Rio Grande do Norte, 2013-2014.**

Durante os anos de 2013-2014, a partir do ensaio molecular da RT-PCR, pudemos confirmar a infecção em 36,44% (176/483) dos casos estudados, sendo o percentual de detecção em 2013 de 37,89% (97/256) e em 2014 de 34,80% (79/227). Nossos resultados mostraram taxas de incidência da infecção superiores às encontradas por Branco, 2014 (24,13%), em um estudo realizado no período de 2010-2012 utilizando o mesmo protocolo.

Apesar de a técnica de RT-PCR corresponder a uma importante ferramenta para o diagnóstico, uma vez que é uma metodologia rápida e eficaz para a detecção e tipagem dos vírus da dengue, faz-se necessário um maior controle das amostras visando descartar a possibilidade de resultados falsos negativos, considerando que a qualidade dos ácidos nucleicos extraídos é bastante afetada pela forma de coleta da amostra, pelo seu manuseio e transporte (Riemann, 2007; Käser, 2010; Okello, 2010).

A co-circulação de três dos quatro sorotipos da dengue, DENV-1, DENV-2 e DENV-4, com ênfase neste último, foi claramente demonstrada no nosso estudo. Tal padrão já havia sido observado no Estado anos atrás. Cunha e colaboradores (1999) e Barbosa e colaboradores (2012) relataram a presença simultânea dos sorotipos 1 e 2. Já em 2014, Branco encontrou o mesmo padrão encontrado em nosso trabalho, com a circulação dos DENV-1, 2 e 4.

Esta constatação é de fato preocupante e deve servir de alerta às autoridades de saúde pela possibilidade de eventos de coinfeção por mais de um sorotipo. Apesar de estudos como o de Gubler e colaboradores, realizado em Porto Rico no ano de 1985, relatarem casos de coinfeção pelos sorotipos 1 e 4 que estavam relacionados a apenas sintomas leves, são necessários estudos mais aprofundados para responder questões a respeito das manifestações e gravidade da doença relacionadas à eventos deste tipo. Além disto, de acordo com Dos Santos et al. (2003), existe o agravante de que a infecção concomitante por diferentes linhagens dos DENV, em células hospedeiras humanas ou de mosquitos, proporciona um potencial para a recombinação entre sorotipos do vírus.

Mesmo que a infecção por mais de um sorotipo não ocorra de forma simultânea, existe o risco de se desenvolver a doença grave quando há infecção sequencial das

populações por dois ou mais sorotipos, resultando em um aumento da incidência de dengue hemorrágica e síndrome do choque, de acordo com Haslthead (1988), em decorrência da pré-existência de anticorpos para o vírus.

A maior prevalência do sorotipo 4 nos dois anos de estudo já era esperada, uma vez que este foi o último sorotipo a ser introduzido no Estado. O seu percentual de detecção foi de 83,51% (81/97) em 2013 e 68,35% (54/79) em 2014. Este sorotipo foi detectado pela primeira vez no Estado em Maio de 2011, no município de Santa Cruz, provavelmente durante um evento religioso, se espalhou rapidamente para outros municípios, sendo detectado na capital Natal poucos dias após sua introdução. No ano de 2012 foi o único sorotipo detectado no Estado (Branco, 2014). Este padrão é explicado pelo fato de que o novo sorotipo encontrou aqui uma população susceptível, nunca antes exposta a ele.

Quanto aos demais sorotipos detectados, DENV-1 e DENV-2, apesar de terem circulado no RN em anos anteriores tornando significativas parcelas da população adulta imune a eles, de acordo com Teixeira e colaboradores (2009) as coortes de nascimentos reabastecem constantemente as reservas de indivíduos suscetíveis aos sorotipos circulantes, favorecendo a ocorrência de novas epidemias.

## **6.2. Distribuição geográfica dos casos de dengue nos municípios do Rio Grande do Norte, 2013-2014.**

No que diz respeito à distribuição espacial da dengue (casos positivos e sorotipos) no Rio Grande do Norte, pudemos verificar que todas as quatro mesorregiões geográficas do Estado apresentaram casos da doença, fato este também constatado por Branco (2014). Merecem destaque os municípios de Natal e Caicó, que apresentaram maior positividade em 2013 e 2014, respectivamente.

Ambos os municípios possuem grandes extensões territoriais, elevado número de habitantes e recebem, anualmente, um expressivo número de turistas. Natal durante todo ano é visitada por um grande número de pessoas em virtude de seus atrativos naturais. Caicó recebe uma grande quantidade de turistas em dois momentos do ano: em Fevereiro, durante o Carnaval, e em Julho, durante uma festa religiosa. Isto pode justificar o maior número de casos positivos de dengue nestes municípios, uma vez que

de acordo com Rodhain e Rosen (1997) o aglomerado populacional proporciona uma maior circulação e transmissão do vírus.

Uma elevada quantidade de municípios apresentou baixa ou nenhuma incidência de dengue. Leite e colaboradores (2011) observaram o mesmo em um estudo realizado em Minas Gerais. Estes autores explicam que pode estar ocorrendo dificuldades no diagnóstico dos casos da doença em razão de uma possível deficiência na área de atenção a saúde e, alertam para a necessidade de uma maior investigação nestes municípios, visando descobrir se realmente não estão ocorrendo casos de dengue ou se estão sendo subnotificados, o que pode estar provocando desvios no perfil da doença.

A maioria dos municípios apresentou a circulação de apenas um sorotipo. De acordo com Lima e colaboradores (1999), quando a distribuição geográfica de um sorotipo fica restrita a determinada região, existe o grande risco de novas epidemias acometendo outras regiões pelo mesmo sorotipo do vírus e da ocorrência de casos de FHD/SCD com a introdução de outro sorotipo na área com indivíduos imunes a sorotipos diferentes.

Quanto à cocirculação de múltiplos sorotipos, ela pôde ser observada em alguns municípios. Em 2013 foi verificada a presença dos DENV-1, 2 e 4 em Jandaíra e, em Parnamirim, dos sorotipos 2 e 4. Já em 2014, houve cocirculação dos sorotipos 1 e 4 nos municípios de Coronel João Pessoa, Ipueira, Natal e Tibau do Sul e, dos sorotipos 2 e 4 em Jandaíra. A importância deste tipo de evento já foi relatada anteriormente.

### **6.3. Análise de sazonalidade**

Os meses com maior número de casos confirmados foram Março, em 2013, e Maio, em 2014, representando 17,53% (17/97) e 31,65% (25/79), respectivamente.

Os dados obtidos neste estudo demonstram que as maiores incidências de casos de dengue coincidem com o período de chuvas do Estado, sendo observado um padrão de sazonalidade da doença.

Monteiro e colaboradores (2009) observaram que os casos de dengue em Teresina também foram significativamente mais frequentes na estação chuvosa, chagando a ocorrer uma diminuição na incidência da doença no final desta estação.

Em 2013, Viana & Ignotti concluíram que a variação sazonal da temperatura e da pluviosidade influencia diretamente o desenvolvimento do vetor e, conseqüentemente a incidência da doença em todo território brasileiro, estando a dengue intimamente relacionada com as variáveis meteorológicas.

Durante a estação chuvosa, recipientes ou resíduos gerados a partir de produtos de consumo descartados inadequadamente no ambiente acumulam água das chuvas, tornando-se criadouros ideais para os mosquitos altamente domiciliados, cenário este que reúne as condições necessárias para ocorrência da dengue (Gubler, 1998).

#### **6.4. Distribuição dos casos de dengue no Rio Grande do Norte, 2013-2014, de acordo com o gênero.**

O gênero feminino foi o mais acometido pela dengue em todo o período de estudo, representando 69,07% dos casos positivos em 2013 e 54,43% em 2014. Nossos resultados estão de acordo com achados de outros autores como Ribeiro e colaboradores (2006), Cunha & Bohland (2012) e Monteiro e colaboradores (2009) que realizaram trabalhos em São Paulo, Sergipe e Piauí, respectivamente.

Duas hipóteses existentes poderiam explicar estes resultados: o fato de as mulheres procurarem mais os serviços de saúde do que os homens, sendo a dengue mais frequentemente notificada entre elas (Ribeiro et al., 2008); e o fato de elas permanecerem mais tempo dentro de suas residências, habitat do *Aedes aegypti*, ficando desta forma mais expostas ao vetor (Vasconcelos, 1993).

#### **6.5. Distribuição dos casos de dengue no município de Natal, 2013-2014, de acordo com a faixa-etária.**

Quanto à distribuição por grupo etário, foi observada a ocorrência da doença em todas as faixas, sendo a de 21-30 anos a que apresentou o maior número de casos positivos em 2013, representando 25,77% (25/97). Em 2014 a faixa etária de 11-20 anos foi a que apresentou maior número de casos de dengue, com 20,25% (16/79) dos casos

positivos. Nossos resultados divergem daqueles obtidos por Cavalcanti et al. (2011), onde foi demonstrada uma maior incidência na faixa etária de 0-10 anos na população afetada pela dengue do Nordeste brasileiro. Porém, corroboram com os obtidos por Ribeiro e colaboradores (2006) e Monteiro e colaboradores (2009) que constataram taxas de incidência que aumentaram com a idade.

Gonçalves Neto & Rebêlo (2004) destacam que apesar de todas as faixas etárias serem suscetíveis à infecção pelos vírus dengue, existe um padrão de maior incidência de casos em faixas etárias mais elevadas quando ocorre a introdução de um novo sorotipo do vírus, em razão de praticamente toda a população não apresentar imunidade. Branco (2014) pôde constatar isso, quando observou que em 2012, um ano após a introdução do sorotipo 4 no RN, houve um aumento na média de idade da população acometida pela doença.

#### **6.6. Caracterização molecular dos vírus DENV isolados no Rio Grande do Norte, 2013-2014.**

A partir da caracterização molecular dos vírus DENV circulantes no Rio Grande do Norte, em 2013 e 2014, foi constatada a presença do genótipo V, do DENV-1, e do genótipo II, do DENV-4.

Nosso achado em relação ao sorotipo 1 está de acordo com vários trabalhos da literatura, como o de Cordeiro (2010) e o de Silva (2013), que estudando amostras deste sorotipo em Roraima e Pernambuco, respectivamente, observaram que elas pertenciam também ao genótipo V, sendo este o único com circulação relatada nas Américas.

Nossos resultados quanto ao DENV-1 demonstram, ainda, a presença de duas linhagens em circulação no Rio Grande do Norte: a RN-I, que compreende amostras sequenciadas por Sousa (2014) e Branco (2014) e, a RN-II com a amostra sequenciada no presente estudo. Entretanto, faz-se necessário sequenciar um número maior de amostras para confirmar esta constatação.

Quanto ao DENV-4, nossos resultados se opõem aos encontrados por Pinho (2013) que, estudando amostras de Salvador, verificou a circulação do genótipo I para este sorotipo. Porém, estudos como o de Nunes (2012) determinaram além do I, a circulação do genótipo II.

Estudos de caracterização genética apresentam grande importância, uma vez que através deles é possível realizar o monitoramento da transmissão dos genótipos virais e associá-los, deste modo, a eventos epidêmicos ou ao aparecimento de casos graves da doença. Com base nisto, torna-se essencial a realização de mais estudos sobre esta temática, que visem identificar e rastrear as populações de vírus em circulação não só no Rio Grande do Norte como em todo o território brasileiro.

## 7. CONCLUSÕES

1. A vigilância virológica e construção do perfil epidemiológico da dengue, no período de 2013-2014, envolveu a análise de 483 amostras, sendo a infecção confirmada em 36,44% (176/483);
2. No período estudado foi constatada a circulação de três sorotipos da dengue: DENV-1, DENV-2 e DENV-4;
3. Durante os dois anos de estudo o sorotipo 4 foi o predominante, representando 83,51% (81/97) dos casos positivos em 2013 e 68,35% (54/79) em 2014;
4. Em 2013 o maior número de casos ocorreu em Natal e, em 2014, no município de Caicó;
5. Os meses com maior incidência da doença foram Março (2013) e Maio (2014), representando 17,53% (17/97) e 31,65% (25/79) dos casos confirmados, respectivamente;
6. O gênero feminino foi o mais acometido pela dengue em 2013 e 2014, representando 69,07% (67/97) e 54,43% (43/79), respectivamente;
7. A faixa etária com maior número de casos confirmados foi a de 21-30 anos em 2013 e a de 11-20 anos em 2014, representando 25,77% (25/97) e 20,25% (16/79), respectivamente;
8. A caracterização molecular dos vírus circulantes em 2013 e 2014 revelou a presença do genótipo V e do genótipo II, para DENV-1 e DENV-4 respectivamente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M 2002. Enzymelinked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*, 40:376-381.

Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV 2005. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*, 339:200-212.

Araújo JMG 2009b. Vírus dengue tipo 3 (DENV-3): contribuição para a patogenia, sítios de replicação, filogenia e evolução. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 111 pp.

Araújo JMG, Bello G, Romero H, Nogueira RM 2012. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 6:e1784.

Araújo JMG, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RM 2009a. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. *J Virol Methods*, 155:34-38.

Ashburn PM, Craig CF 1907. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. *J Infect Dis*, 4:440-475.

Bancroft TL 1907. On the etiology of dengue fever. *Aust Med Gaz*, 25:17-18.

Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A 2006. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue hemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*, 11:1238-1255.

Barbosa IR, Araújo LF, Carlota FC, Araújo RS, Maciel IJ 2012. Epidemiology of dengue fever in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2000 to 2009 *Epidemiol. Serv. Saúde*, 21:149-157.

Barboza MMO 2013. Caracterização genômica do sorotipo 1 de vírus dengue isolados no Ceará no ano de 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 72 pp.

Barcellos C, Lowe R 2013. Expansion of the dengue transmission area in Brazil: the role of climate and cities. *Trop Med Int Health*.

Bona AC, Twerdochlib AL, Navarro-Silva MA 2012. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Parana, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45:297-300.

Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16:113-118.

Branco MSD 2014. Dengue no Estado do Rio Grande do Norte, 2010-2012: Vigilância virológica e aspectos epidemiológicos. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 114 pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde 2001. *Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas*. 3 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 84 pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2009. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 816 pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2008. *Dengue: Manual de enfermagem - adulto e criança*. Ministério da Saúde, Brasília, 48 pp.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde 2011. *Dengue : diagnóstico e manejo clínico: criança*. 1 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 52 pp.

Bricks LF 2004. Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatrics*, 4:268-81.

Bricks LF 2008. Progressos no desenvolvimento de vacinas contra a dengue. In LJ Souza, *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, Rubio, Rio de Janeiro, p. 109-113.

Câmara FP, Theophilo RL, Dos Santos GT, Pereira SR, Câmara DC, de Matos RR 2007. Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40:192-196.

Cardoso IM, Cabidelle Ade S, Borges Pde C, Lang CF, Calenti FG, Nogueira Lde O, Falqueto A, Cerutti Junior C 2011. Dengue: clinical forms and risk groups in a high incidence city in the southeastern region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44:430-435.

Carneiro AR, Cruz ACR, Vallinoto M, Melo DV, Rommel TJR, Medeiros DBA, Da Silva EVP, Vasconcelos PFC 2012. Molecular characterization of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107:805-812.

Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG 2011. Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*, 17:132-134.

Cecílio AB, Campanelli ES, Souza KPR, Figueiredo LB, Resende MC 2009. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. *Braz. J. Biol.*, 1:123-127.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 44:649-688.

Chaudhry S, Swaminathan S, Khanna N 2006. Viral Genetics as a Basis of Dengue Pathogenesis. *Dengue Bulletin*, 30:121 -132.

Chu JJ, Ng ML 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *J Virol*, 78:10543-10555.

Cleland JB, Bradley B, Macdonald W 1919. Further Experiments in the Etiology of Dengue Fever. *J Hyg (Lond)*, 18:217-254.

Consoli RAGB, Oliveira RL 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228 p.

Cordeiro JS 2010. Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 59 pp.

Cunha PEL, Bohland AK 2012. Dengue: describing the epidemic in Aracaju, Sergipe, Brazil, 2008. *Rev. Bras. Med. Fam. Comunidade*, 25:247-254.

Cunha RV, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Barbosa AM, Paiva FG, Miranda RM, Ramos CC, Coelho JC, dos Santos FB, Nogueira RM 1999. Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, in 1997. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93:247- 249.

De Paula SO, Pires Neto RJ, Correa JA, Assumpcao SR, Costa ML, Lima DM, Fonseca BA 2002. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RTPCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96:266-269.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I, 2004. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *Journal of Virological Methods*, 121:171-180.

Dos Santos CL, Bastos MA, Sallum MA, Rocco IM 2003. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 45:11 -16.

Dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, Simoes JB, Sampaio SA, Santos CR, Nogueira RM 2011. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J*, 8:387.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML 2012. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol*, 157:2061 -2073.

Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*, 65:2467-2475.

Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simoes JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, dos Santos FB 2013. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis*, 7:e2095.

Ferreira GS 2004. Análise Espaço-Temporal da Distribuição dos Casos de Dengue na Cidade do Rio de Janeiro no Período de 1986 a 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Estatísticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 124 pp.

Goméz-Dantés H, Willoquet JR 2009. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25 Sup 1:S19-S31.

Gonçalves Neto VS, Rebêlo JM 2004. Epidemiological characteristics of dengue in the Municipality of Sao Luis, Maranhao, Brazil, 1997-2002. *Cad Saude Publica*, 20:1424-1431.

Gonçalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, Liprandi F 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, 303:110-119.

Gratz NG 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, 18:215-227.

Gubler DJ 1997. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem. In: GUBLER, D.J. & KUNO, G. (Eds). Dengue and dengue hemorrhagic fever. London: CAB International, p.1-22.

Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 11:480-496.

Gubler DJ 2004. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27:319-330.

Gubler DJ 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health*, 39:3-11.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Waterman SH 1985. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 34:170-173.

Guy B, Nougarede N, Begue S, Sanchez V, Souag N, Carre M, Chambonneau L, Morrisson DN, Shaw D, Qiao M, Dumas R, Lang J, Forrat R 2008. Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine*, 26:5712-5721.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, 8:S7- 16.

Guzman MG, Kouri G 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*, 2:33-42.

Guzman MG, Kouri G 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*, 8:69-80.

Halstead SB 1980. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*, 58:1-21.

Halstead SB 1988. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239:476-481.

Hammon WM, Rudnick A, Sather GE 1960. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, 131:1102-1103.

Holmes EC, Bruch S 2000. The causes and consequences of genetic variation in Dengue virus. *Trends in Microbiol*, 8:74-77.

Holmes EC, Tio PH, Perera D, Muhi J, Cardoso J 2009. Importation and cocirculation of multiple serotypes of dengue virus in Sarawak, Malaysia. *Virus Research*, 143:1-5.

Hombach J 2007. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 21:254-260.

Hss AS, Koh MT, Tan KK, Chan LG, Zhou L, Bouckenoghe A, Crevat D, Hutagalung Y 2013. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2–11 years in Malaysia: A randomized, placebo-controlled, Phase III study. *Vaccine*, 31:5814-5821.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage on the Internet], Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011 [updated January 29, 2013; cited 2014 January 28]. Censo Demográfico 2010 - Rio Grande do Norte.

Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect*, 12:272-279.

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*, 189:1411-1418.

Käser M, Ruf MT, Hauser J, Pluschke G 2010. Optimized DNA preparation from mycobacteria. *Cold Spring Harb Protoc*.

Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNAbased full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J Virol*, 75:4633-4640.

Kimura R, Hotta S 1944. Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue with virus into mice. *Nippon Igaku*, 3379:629-633.

Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S 2006. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods*, 138:123-130.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR 1987. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81:821 -823.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108:717-725.

Kukreti H, Chaudhary A, Rautela RS, Anand R, Mittal V, Chhabra M, Bhattacharya D, Lal S, Rai A 2008. Emergence of an independent lineage of dengue virus type 1 (DENV-1) and its co-circulation with predominant DENV-3 during the 2006 dengue fever outbreak in Delhi. *Int J Infect Dis.*, 12:542-549.

Kumar K, Singh PK, Tomar J, Baijal S 2010. Dengue: epidemiology, prevention and pressing need for vaccine development. *Asian Pac J Trop Med*, 3:997-1000.

Kurane I 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 30:329-340.

Lanata CF, Andrade T, Gil AI, Terrones C, Valladolid O, Zambrano B, Saville M, Crevat D 2012. Immunogenicity and safety of tetravalent dengue vaccine in 2-11 year-

olds previously vaccinated against yellow fever: randomized, controlled, phase II study in Piura, Peru. *Vaccine*, 30:5935-5941.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 30:545-551.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, 75 ( Pt 1): 65-75.

Leite MR, Vieira EM, Gomes I, Machado ML, Simão MLR, Silva MHI, Dos Santos TH 2011. Distribuição espaço-temporal da dengue nos municípios de Minas Gerais e sua relação entre o desenvolvimento municipal e a temperatura. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. p. 8397.

Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R 1999. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*, 73:3108-3116.

Lima MRQ, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* [serial on the Internet], 2010 2897844; 4(7):[e738 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20625558>.

Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Limonta D, Dos Santos FB. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues. *PLoS Negl Trop Dis* [serial on the Internet], 2011 3;5(5):[e1147p.]. Available from: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001147>.

Lima VLC, Figueiredo LTM, Correa HR, Leite OF, Rangel O, Vido AA, Oliveira SS, Owa MA, Carlucci RH 1999. Dengue: inquérito sorológico pós epidêmico em zona urbana do Estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Pública*, 6:566-574.

Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM 2007. Flaviviridae: The viruses and their replication. . In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 1101-1152.

Lodeiro MF, Filomatori CV, Gamarnik AV 2009. Structural and functional studies of the promoter element for dengue virus RNA replication. *J Virol*, 83:993-1008.

Lupi O, Carneiro CG, Coelho ICB 2007. Mucocutaneous manifestations of dengue. *An Bras Dermatol*, 82:291-305.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:3414-3419.

Martins VEP, Alencar CHM, Facó PEG, Dutra RF, Alves CR, Pontes RJS, Guedes MIF 2010. Spatial distribution and breeding site characteristics of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Fortaleza, State of Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 1:73-77.

Martins VEP, Martins MG, Araújo JMP, Silva LOR, Monteiro HAO, Castro FC, Vasconcelos PFC, Guedes MIF 2006. First report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the state of Ceará, Brazil. *Rev Saúde Pública*, 4:737-439.

Miagostovich MP, dos Santos FB, de Araujo ES, Dias J, Schatzmayr HG, Nogueira RM 1997. Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92:595-599.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2014 [updated January 28, 2015; cited 2015 January 28]. Sistema de informação de agravos de notificação - Dengue. Available from: [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/Download/Nova\\_classificacao\\_de\\_caso\\_de\\_dengue\\_OMS.pdf](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/Download/Nova_classificacao_de_caso_de_dengue_OMS.pdf).

Ministério da Saúde, Portal da Saúde (SUS). Programa Nacional de Controle da Dengue. Disponível em:

<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23614](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23614)> Acesso em: 01 Mar. 2012.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427:313-319.

Monath TP 2007. Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines. *N Engl J Med*, 357:2222-2225.

Monteiro ESC, Coelho ME, Cunha IS, Cavalcante MAS, Carvalho FAA 2009. Epidemiological and vector-related indicators of dengue fever in Teresina city, Piauí State, Brazil, from 2002 to 2006. *Epidemiol Serv Saúde*, 18:365-374.

Müller VDM 2011. Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 102 pp.

Nascimento PSR, Petta RA, Farias DR 2009. Análise espaço-temporal da incidência dos casos de dengue no Rio Grande do Norte entre os anos de 2004 e 2007. *Anais XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. p. 7561-7568.

Nielsen DG 2009. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology*, 6:211.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Dos Santos FB, Araújo E SM, Filippis AMB, Souza RV, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira GF 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC, Jr., Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF 2012. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*, 18:1858-1864.

Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D, Poinar HN 2010. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem*, 400:110-117.

Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG 2007. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and Cell Biology*, 85:43-45.

Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vazquez S, Yoksan S 2010. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*, 8:S30-38.

Phuong CX, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, van Thien C, Nga NT, Thuy TT, Solomon T, Stepniowska K, Wills B 2004. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am J Trop Med Hyg*, 70:172-179.

Pinho ACO 2013. Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 76 pp.

Pires Neto RJ, Lima DM, De Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BAL 2005. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res.*, 38:843-852.

Posada D 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 25:1253-1256.

Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE, Mccown JM, Russell PK 1983. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32:577-589.

Ribeiro AF, Marques GRAM, Voltolini JC, Condino MF 2006. Association between dengue incidence and climatic factors. *Rev. Saúde Pública*, 4:671-676.

Ribeiro PC, Sousa DC, Araújo TME 2008. Perfil clínico - epidemiológico dos casos suspeitos de Dengue em um bairro da Zona Sul de Teresina. *Rev Bras Enferm.*, 2:227-232.

Rico-Hesse R 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174:479-493.

Rico-Hesse R 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 59:315-341.

Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Schmid KW, Brockmeyer NH, Siffert W 2007. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal*, 21:244-248.

Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet*, v. 352.

Rio Grande do Norte. Secretaria de Estado do Planejamento e das Finanças. Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente 2013. *Perfil do Rio Grande do Norte*. 1 ed., Governo do Estado do Rio Grande do Norte, Natal, 191 pp.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM 2010. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.*, 67:2773-2786.

Rodhain F, Rosen L 1997. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: Gubler, D. J.; Kuno, G. Editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. New York: CABInternational, p. 45-60.

Rudnick A 1986. Dengue fever epidemiology in Malaysia 1901 -1980. In Rudnick A, Lim TW, *Dengue fever studies in Malaysia, Bulletin No. 23*, Institute of Medical Research, Kuala Lumpur, p. 9-38.

Sabin AB 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*, 1:30-50.

Sabin AB, Schlesinger RW 1945. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science*, 101:640-642.

Schatzmayr HG 2008. Aspectos históricos da dengue e seus vetores. In LJ Souza, *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, 2 ed., Rubio, Rio de Janeiro, p. 12-35.

Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte [homepage on the Internet], Natal: Governo do Estado do Rio Grande do Norte; 2008 [updated January 06, 2015; cited 2015 January 06]. SITUACÃO DO DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE. Available from: [http://www.portal.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap/saude\\_destaque/gerados/nota\\_situacao\\_da\\_dengue\\_no\\_rn\\_070208.pdf](http://www.portal.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap/saude_destaque/gerados/nota_situacao_da_dengue_no_rn_070208.pdf)

Silva AM 2013. Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 128 pp.

Sousa DMC 2014. Caracterização genética e evolução dos vírus Dengue no Estado do Rio Grande do Norte. Dissertação (Mestrado em Sistemática e Evolução) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 97 pp.

Tang KF, Ooi EE 2012. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10:895-907.

Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cad. Saúde Pública*, 17:99-102.

Tauil PL 2002. Critical aspects of dengue control in Brazil. *Cad Saúde Pública*, 18:867-871.

Tauil PL 2007. O desafio do controle do *Aedes aegypti* e da assistência adequada ao dengue. *Epidemiol Serv Saúde*, 16:153-154.

Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*, 25 Suppl 1:S7-18.

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Azevedo RDS, Nunes MRT, Vasconcelos PFD 2011. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 17:938-940.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*, 25:4876-4882.

Trent DW, Manske CL, Fox GE, Chu MC, Kliks SC, Monath TP 1990. The molecular epidemiology of dengue viruses: genetic variation and microevolution. *Appl. Virol. Res.*, 2:293-315.

Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A 2003. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*, 20:122-129.

Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*, 87:2605-2614.

Van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE 2012. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *Am J Trop Med Hyg*, 86:166-170.

Van der Schaar HM 2009. *Cell entry mechanisms of dengue virus*. University Library Groningen, Groningen, 155 pp.

Vasconcelos PFC, Lima JWO, Rosa APAT, Timbó MJ, Rosa EST, Lima HR, Rodrigues SG, Rosa JFST 1998. Dengue epidemic in a Northeastern Brazil: random epidemiological serum survey. *Rev. Saúde Pública*, 5:447-454.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa JFS, de Freitas RB, Dégallier N, Rodrigues SG, Travassos da Rosa AP 1993. Dengue epidemic, serotype 2, in Araguaina, Tocantins, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 35:141-148.

Viana DV, Ignotti E 2013. The occurrence of dengue and weather changes in Brazil: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol*, 16:240-256.

Wanigasuriya K, Gurugama P, Wijewickrama A, Seneviratne S, Gunatilake S 2011. Usefulness of World Health Organization (WHO) dengue case classifications in a Sri Lankan clinical setting. *Journal of the Ceylon College of Physicians*, 42:21-27.

Weaver SC, Vasilakis N 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*, 9:523-540.

World Health Organization 2009. *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New Edition*. 1 ed., World Health Organization, Geneva, x + 147 pp.

World Health Organization 2011. *Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever*. Rev. and expanded. ed., World Health Organization Regional Office for South-East Asia, New Delhi, India, xiv, 196 p. pp.

Worobey M, Rambaut A, Holmes EC 1999. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:7352-7357.

Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W 2000. An antigen capture enzymelinked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*, 38:1053-1057.