

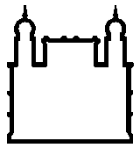
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**DENGUE NO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012:
VIGILÂNCIA VIROLÓGICA E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.**

MÁRIO SÉRGIO DUARTE BRANCO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Mário Sérgio Duarte Branco

Dengue no Estado do Rio Grande do Norte, 2010-2012: Vigilância Viroológica e Aspectos Epidemiológicos.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira
Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B816 Branco, Mário Sérgio Duarte

Dengue no estado do Rio Grande do Norte, 2010-2012: vigilância virológica e aspectos epidemiológicos / Mário Sérgio Duarte Branco. – Rio de Janeiro, 2014.

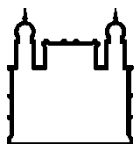
xvii, 96 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 78-96

1. Dengue. 2. Rio Grande do Norte. 3. Epidemiologia. 4. Vigilância virológica. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Mário Sérgio Duarte Branco

Dengue no Estado do Rio Grande do Norte, 2010-2012: Vigilância Viroológica e Aspectos Epidemiológicos.

ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira

Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo

Aprovada em: 14/ 02 / 2014

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ana Maria Bispo de Filippis- Presidente (IOC-FIOCRUZ-RJ)

Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor (IOC-FIOCRUZ-RJ)

Profa. Dra. Marli Tenório Cordeiro (CPqAM-FIOCRUZ-PE)

Prof. Dr. Marcos César Lima de Mendonça (IOC-FIOCRUZ-RJ)

Profa. Dra. Elzinandes Leal de Azeredo (IOC-FIOCRUZ-RJ)

Rio de Janeiro, 14 de Fevereiro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Lúcia e Paulo Sérgio, ao meu irmão, Luiz Paulo e à minha namorada, Julieth Sousa. Obrigado por tudo. Amo vocês!

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida durante o Mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, e à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pelo financiamento deste projeto.

Ao Laboratório Central Dr. Almino Fernandes pela parceria e permissão na utilização de suas amostras. À Carmélia Dantas da Costa e Francisca Paiva pelo imenso apoio e cooperação, imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical por minha formação acadêmica. Ao Coordenador, Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, por todo apoio concedido durante o curso. À Livia e Ingrid, secretárias do programa, por todo apoio e atenção.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira, por sua acolhida, por toda sua atenção e por ter me dado a oportunidade de aprender com seus ensinamentos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Josélio Maria Galvão de Araújo, por ser tudo o que se espera de um orientador, pelo seu exemplo profissional, dedicação e amizade.

À Dra. Flávia Barreto, por sua gentileza e disposição em sempre me ajudar.

À Dra. Ana Bispo de Filippis, pelo conhecimento compartilhado e por aceitar fazer parte da Banca de Defesa desta Dissertação, como Presidente.

À Dra. Marli Tenório Cordeiro, por aceitar ser revisora deste trabalho e por aceitar fazer parte da Banca de Defesa desta Dissertação, obrigado por engrandecer este trabalho com os seus comentários.

Aos Doutores José Gonzalo Bello Bentancor, Marcos César Lima de Mendonça e á Doutora Elzinandes Leal de Azeredo, por aceitarem fazer parte de minha Banca de Defesa e por enriquecerem este trabalho com suas sugestões.

A todos do Laboratório de Doenças Infecciosas e do Câncer, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em especial à Daíse Sousa,

Denise Sousa e Joelma Monteiro, pela participação direta neste trabalho e apoio imprescindível.

A todos do Laboratório de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, pelo ótimo convívio e por todo apoio dado durante minha estada no Rio de Janeiro.

Agradeço aos meus pais, por todo o carinho e compreensão, pelos momentos de amizade e de ensinamentos, por toda a confiança creditada a mim, pelo suporte em momentos difíceis e pelos risos em inúmeros momentos felizes.

Ao meu irmão, Luiz Paulo que sempre me ensina a valorizar pequenas atitudes e a me importar menos com problemas pequenos.

À Julieth de Oliveira Sousa, a qual sempre está disposta a me ouvir e a compartilhar os momentos felizes e de angústia, obrigado por me fazer feliz, por todo seu carinho e amor.

A todos os meus familiares, por sempre torcerem pela minha felicidade.

Todos tem o desejo de vencer, mas apenas campeões tem o desejo de se preparar. (Autor desconhecido)

RESUMO

A dengue é a arbovirose mais importante do mundo. Nos últimos 50 anos, vem progressivamente alcançando o status de pandemia global. Este trabalho descreve a vigilância virológica e os aspectos epidemiológicos da dengue no Estado do Rio Grande do Norte, no período de 2010 a 2012. Foram estudados 1581 casos pela metodologia de isolamento viral e/ou RT-PCR para detecção e tipagem viral, provenientes de diferentes Centros de Saúde do Estado do Rio Grande do Norte, no período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2012. A infecção foi confirmada através do isolamento viral em 27% dos casos, enquanto a RT-PCR confirmou 24% dos casos estudados, a união das duas metodologias confirmou 30% dos casos estudados. Este estudo detectou a circulação de todos os quatro sorotipos do vírus Dengue no Rio Grande do Norte, havendo a circulação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em 2010, já em 2011 ocorreu a circulação do DENV-1, DENV-2 e a introdução do DENV-4 no Estado, após um período de 30 anos sem registro no país. Em 2012 foi detectada apenas a circulação do DENV-4. O sorotipo predominante em 2010 foi o DENV-2, representando 53,33% dos casos positivos, seguido do DENV-1, com 45,33% e DENV-3 com 1,33%. Em 2011, o DENV-1 foi predominante com 75,49% dos casos positivos, seguido por DENV-2 e DENV-4. Em 2012, o DENV-4 foi o único detectado, com 100% dos casos positivos. A distribuição geográfica dos casos concentrou-se em Natal, com 53,97% dos casos confirmados. Em relação à distribuição mensal, tivemos um maior número de casos nos meses de Maio e Abril, 23% e 21% dos casos positivos respectivamente ($p < 0,0001$). A faixa etária mais acometida foi a de 0 a 10 anos, com 38% dos casos positivos, sendo que apenas em 2012, a faixa etária de 11 a 30 anos foi a mais acometida com 51,33% dos casos ($p=0,0001$). A média de idade dos casos confirmados por sorotipo foi significativamente maior para o DENV-4 ($p < 0,0001$), sendo de 29,87 anos (DP: 17,01). Em relação ao gênero, o sexo feminino representou 52% dos casos. A média de idade de mulheres afetadas pela Dengue foi maior ($p=0,0345$) que a dos homens afetados, sendo de 22,69 (DP: 18,85). A caracterização genética das cepas circulantes confirmou a circulação do genótipo V, genótipo Sudeste Asiático/Americano e genótipo II, respectivamente para DENV-1, DENV-2 e DENV-4. Este trabalho subsidiará uma melhor compreensão sobre a ação desses vírus na população Norte-Riograndense, fornecendo auxílio às ações voltadas ao controle da doença na região, constituindo uma importante contribuição ao se considerar o grande impacto dessa doença no RN.

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

ABSTRACT

Dengue is considered as the most important arthropod-borne viral disease throughout the world, which currently represents a major public health problem in tropical and subtropical countries, including Brazil. This work presents results of virological surveillance and epidemiological aspects of dengue in the state of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010-2012. A total of 1,581 cases, reported from January 2010 to December 2012 at various health centers in the state, were studied by the method of viral isolation and / or RT-PCR for viral detection and typing. The infection was confirmed by virus isolation in 27% of the cases, while the RT-PCR confirmed 24% of the cases studied; the union of the two methodologies confirmed 30% of the cases studied. This study detected the circulation of all four serotypes of dengue virus in Rio Grande do Norte, with the circulation of DENV-1, DENV-2, and DENV-3 in 2010, and the circulation of DENV-1, DENV- 2, and the introduction of DENV-4 in the state in 2011, after a 30-year period without registration in the country. The predominant serotype in 2010 was the DENV-2, representing 53.33% of the positive cases, followed by DENV-1, with 45.33% and DENV-3 with 1.33%. In 2011, DENV-1 was predominant with 75.49% of the positive cases, followed by DENV-2 and DENV-4. In 2012, DENV-4 was predominant and exclusive, 100% of positive cases. Regarding the spatial distribution, most of cases occurred in Natal, with 53,97% of confirmed cases. The monthly distribution showed a greater number of positive cases in the months of April (21%) and May (23%) ($p < 0.0001$). The most affected age group was 0-10 years with 38% positive cases, and only in 2012, the age group 11-30 years was the most affected with 51.33% of the cases ($p = 0.0001$). The average age of confirmed cases was significantly higher for serotype DENV-4 ($p < 0.0001$), being 29.87 years (SD: 17,01). Regarding gender, females represented 52% of the cases. The average age of women affected by dengue was higher ($p = 0.0345$) than the affected men, with 22.69 (SD: 18.85). Genetic characterization of circulating strains confirmed the circulation of genotypes V, Southeast Asian / American and II, respectively, for DENV-1, DENV-2 and DENV-4. This work furthers a better understanding of the action of these viruses in the local population. Providing assistance to efforts aimed at controlling the disease in the region is an important contribution when considering the major impact of this disease.

Keywords: Dengue; Rio Grande do Norte; Epidemiology; Virological Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura e composição dos DENV. A) e C) Crio microscopia eletrônica de partícula imatura e madura do DENV, respectivamente. B) Desenho esquemático do DENV, demonstrando sua composição e o processo de maturação da partícula (Adaptado de Lindenbach et al. 2007).....	3
Figura 1.2 Organização do Genoma dos DENV (Adaptado de Rodenhuis-Zybert et al. 2010) ..	3
Figura 1.3 Modelo de biossíntese do vírus da Dengue (Adaptado de Van der Schaar 2009). ...	6
Figura 1.4 Hipótese Integral para o desenvolvimento da DHF/SCD.(Adaptado de Guzman & Kouri 2002)	11
Figura 1.5 Ciclos de transmissão da dengue (Adaptado de Weaver & Vasilakis 2009).....	13
Figura 1.6 Períodos de incubação dos DENV (Adaptado de CDC, 2002).....	15
Figura 1.7 Resumo didático do curso da doença da dengue, demonstrando aspectos clínicos e laboratoriais(Adaptado de World Health Organization 2009).	17
Figura 1.8 Classificação sugerida pela Organização Mundial de Saúde para classificação de casos de Dengue e níveis de gravidade (Adaptado de WHO, 2009).	19
Figura 1.9 Vírus da Dengue, antígenos e respostas de anticorpos utilizados no diagnóstico, correlacionados ao período da doença (Adaptado de Guzman et al. 2010).	21
Figura 1.10 Títulos de Anticorpos IgM e IgG, em resposta à infecção primária e secundária do DENV (Adaptado de Peeling et al. 2010).....	23
Figura 1.11 Construção das quatro vacinas quiméricas (Adaptado de Guy et al. 2010).....	27
Figura 1.12 Países ou áreas de risco de infecção por DENV (Adaptado de World Health Organization 2009)	29
Figura 1.13 Evolução da Dengue nas Américas, 1980-2010 (Adaptado de Brathwaite Dick et al. 2012).	31
Figura 1.14 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando os 20 municípios do Estado que possuem prioridade de monitoramento estratégico.	34
Figura 4.1 Localização do Estado do Rio Grande do Norte.....	37
Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose a 1%. Visualização dos produtos amplificados pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para tipagem dos DENV. Linha 1: Marcador de PM de 100pb (Promega); Linha 2: Controle Negativo; Linhas 3: Controle positivo para DENV-1; Linha 4: Controle positivo para DENV-2; Linha 5: Controle positivo para DENV-3; Linhas 6: Controle positivo para DENV-4; Linha 7: Amostra positiva para DENV-1; Linha 8: Amostra positiva para DENV-2; Linha 9: Amostra positiva para DENV-3; Linha 10: Amostra positiva para DENV-4; Linha 11: Amostra positiva para DENV-1; Linha 12: Amostra positiva para DENV-4.	50
Figura 5.2 Distribuição de Sorotipos detectados por mês, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012.	51
Figura 5.3 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2010.	52

Figura 5.4 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2011.	53
Figura 5.5 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2012.	53
Figura 5.6 Distribuição mensal acumulada dos casos estudados por isolamento viral e/ou RT-PCR, durante o período 2010 - 2012, no Estado do Rio Grande do Norte.	56
Figura 5.7 Distribuição mensal de casos estudados e confirmados para Dengue, nos anos 2010-2012	56
Figura 5.8 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, no período acumulado de 2010-2012.	58
Figura 5.9 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2010.....	58
Figura 5.10 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2011.....	59
Figura 5.11 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2012.....	59
Figura 5.12 Média de idade dos casos positivos por sorotipo, 2010-2012.....	60
Figura 5.13 Número de casos estudados para dengue, relacionados ao gênero, no período acumulado de 2010-2012.....	61
Figura 5.14 Média de idade dos casos confirmados para dengue, relacionados ao gênero, no período acumulado de 2010-2012.	62
Figura 5.15 Análise filogenética das amostras de DENV-1. As sequencias dos diferentes genótipos estão selecionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos <i>branchpoints</i>	63
Figura 5.16 Análise filogenética das amostras de DENV-2. As sequencias dos diferentes genótipos estão selecionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos <i>branchpoints</i>	64
Figura 5.17 Análise filogenética das amostras de DENV-4. As sequencias dos diferentes genótipos estão selecionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos <i>branchpoints</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Classificação genotípica dos DENV(de acordo com Rico-Hesse 2003).....	7
Tabela 1.2 Classificação genotípica dos DENV (de acordo com Weaver & Vasilakis 2009).	8
Tabela 4.1 Meio L-15 para cultivo celular de células C6/36 de <i>Ae.albopictus</i>	39
Tabela 4.2 Antibióticos utilizados no meio de cultura L-15 para cultivo celular de células C6/36 de <i>Ae.albopictus</i>	39
Tabela 4.3 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV.	42
Tabela 4.4 Reagentes utilizados na Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).	43
Tabela 4.5 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-1.	44
Tabela 4.6 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-2.	45
Tabela 4.7 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-4.	45
Tabela 4.8 Oligonucleotídeos iniciadores internos específicos para DENV- 2	45
Tabela 4.9 Valores de referência para comparação do amplicon obtido com peso molecular de massa para determinação da quantidade ideal de DNA a ser aplicada na reação de sequenciamento	46
Tabela 5.1 Metodologias utilizadas para diagnóstico da Dengue, no período de 2010 a 2012.	49
Tabela 5.2 Percentual de detecção dos DENV, por metodologia e ano estudado.	50
Tabela 5.3 Descrição por município de número de casos positivos, percentual de positividade e sorotipos circulantes, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012.	54
Tabela 5.4 Distribuição mensal dos casos estudados por isolamento viral e RT-PCR durante o período 2010 -2012, no Estado do Rio Grande do Norte.	55
Tabela 5.5 Distribuição de casos positivos para Dengue, por faixa-etária, nos anos 2010-2012.	57
Tabela 5.6: Demonstrativo do número de casos positivos por gênero, no período 2010-2012.	61
Tabela 5.7 Relação de amostras selecionadas para o presente estudo, com seus respectivos números de identificação do LADIC, sorotipos, origem e ano de coleta.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl: microlitro

°C: Graus Celsius

Acs: Anticorpos

Ae. aegypti: *Aedes aegypti*

BR: Brasil

C: Proteína estrutural do capsídeo viral

cm: centímetros

D.C.: Depois de Cristo

DC: Dengue clássico

DCC: Dengue com complicações

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

DP: Desvio padrão

E: Proteína estrutural do envelope

ECP: Efeito citopático

ELISA: do inglês, *enzyme linked immunosorbent assay*

EUA: Estados Unidos da América

FHD: Febre hemorrágica da dengue

g: Gramas

gl: Graus de Liberdade

IFI: Imunofluorescência indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

Kb: Kilobase

kDa: Kilodaltons

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

M: Proteína estrutural da membrana

MAC: do inglês, *IgM antibody capture*

MS: Ministério da Saúde
NC: Não codificante
NS: Proteína não estrutural do vírus
OMS: Organização Mundial de Saúde
ORF: do Inglês *Open reading frame*
PAHO: Pan American Health Organization
pb: Pares de bases
PCR: Reação em cadeia pela polimerase
pH: potencial de hidrogênio
PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue
PrM/M: Proteínas estruturais Pré-Membrana/Membrana
qRT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativo
RN: Rio Grande do Norte
RNA: Ácido ribonucleico
Rpm: Rotações por minuto
RT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD: Síndrome de choque da dengue
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ssRNA: do inglês, *single stranded RNA*
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	2
1.2.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	6
1.3 PATOGÊNESE DAS INFECÇÕES POR DENGUE	9
1.4 VETORES	12
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	16
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	20
1.6.1 ISOLAMENTO VIRAL	21
1.6.2 TESTES IMUNOENZIMÁTICOS	22
1.6.3 MÉTODOS MOLECULARES	24
1.7 PREVENÇÃO E CONTROLE	25
1.7.1 VACINA	26
1.8 EPIDEMIOLOGIA	28
1.8.1 DENGUE NAS AMÉRICAS	29
1.8.2 DENGUE NO BRASIL	31
1.8.3 DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 DESENHO DE ESTUDO	37

4.2	ÁREA DE ESTUDO	37
4.3	AMOSTRAS CLÍNICAS E BANCO DE DADOS	38
4.4	ISOLAMENTO VIRAL	38
4.5	TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	39
4.6	RT-PCR (LANCIOTTI ET AL. 1992)	41
4.6.1	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	41
4.6.2	TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO	41
4.7	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	43
4.7.1	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	43
4.7.2	SEQUENCIAMENTO DO GENOMA VIRAL	44
4.7.3	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	48
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
4.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48

5. RESULTADOS **49**

5.1	MONITORAMENTO DOS SOROTIPOS DOS VÍRUS DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	49
5.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS CASOS DE DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	51
5.3	DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS CASOS DE DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	55
5.4	DADOS DEMOGRÁFICOS DOS CASOS ESTUDADOS	57
5.4.1	FAIXA ETÁRIA	57
5.4.2	GÊNERO	60
5.5	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS SOROTIPOS ISOLADOS NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012	62

6. DISCUSSÃO **66**

6.1	MONITORAMENTO DOS SOROTIPOS DOS VÍRUS DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	67
6.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS CASOS DE DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	71
6.3	DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS CASOS DE DENGUE NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	72
6.4	DADOS DEMOGRÁFICOS DOS CASOS ESTUDADOS	73
6.5	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS SOROTIPOS ISOLADOS NO RIO GRANDE DO NORTE, 2010-2012.	74

7. PERSPECTIVAS **76**

8. CONCLUSÕES **76**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O termo “dengue” provavelmente originou-se na Espanha no início do século XIX, sendo um homônimo para a expressão de origem africana Ki Denga Pepo, ou Denga, cujo significado é “pancada ou golpe causado por um espírito mau que provocava um ataque doloroso”. Em 1828, a literatura médica inglesa adotou o termo durante uma epidemia, ocorrida no Caribe, de doença exantemática com artralgia (Halstead 1980; Schatzmayr 2008).

Existem registros históricos da ocorrência de doença clinicamente compatível com a dengue na China durante a Dinastia Chin, 265 – 420 D.C., sendo relatada formalmente nas Dinastias Tang, 610 D.C, e Sung do Norte, 992 D.C., a enfermidade foi chamada naquela época de “veneno da água”, já havendo a associação de mosquitos voadores com a água (Gubler 1998; Weaver & Vasilakis 2009). Surtos ocorridos nas Índias Francesas Ocidentais e no Panamá em 1635 e 1699, respectivamente, também são relacionados à Dengue, porém os primeiros registros de grandes epidemias ocorreram nos anos de 1779 e 1780, atingindo os continentes da Ásia, África e América do Norte. Estes episódios importantes da dengue ocorreram, quase que simultaneamente em 1779, em Jakarta, Indonésia e Egito, e em 1780 na Filadélfia (Gubler 1998; Halstead 1980).

Em 1907, Ashburn e Craig encontraram um agente filtrável e infeccioso no sangue humano (Ashburn & Craig 1907). A transmissão do vírus da dengue (DENV) pelo *Aedes aegypti* foi primeiramente descrita por Bancroft, em 1907,(Bancroft 1907) e mais tarde confirmada por Cleland et al., em 1918, ao testarem, em voluntários humanos, a capacidade de transmissão do vírus da dengue pelos mosquitos *Culex fatigans* e *Aedes aegypti*, obtendo sucesso apenas com o *Aedes aegypti* (Cleland et al. 1919).

O vírus da Dengue foi isolado em camundongos por Kimura e Hotta, em 1943, e por Sabin e Schelinger, em 1944, sendo neste caso, feito o isolamento das cepas Hawai e Nova Guiné. Pesquisas realizadas por Sabin, durante a segunda guerra mundial, forneceram a prova da existência de diferentes características antigênicas entre os vírus Dengue, sendo a cepa Hawai caracterizada como sorotipo

1 e a cepa Nova Guiné como sorotipo 2, hoje sendo consideradas protótipos (Kimura & Hotta 1944; Sabin 1952; Sabin & Schlesinger 1945).

Os sorotipos 3 e 4 foram isolados a partir de pacientes com quadro grave de febre hemorrágica, durante epidemia ocorrida em Manila, nas Filipinas, em 1956, onde se registrou a cocirculação dos quatro sorotipos de Dengue, havendo a percepção do maior surgimento de casos graves da doença devido a esse fator (Hammon et al. 1960).

Provavelmente, a origem dos vírus da Dengue ocorreu na Ásia, onde os quatro sorotipos de vírus da Dengue foram demonstrados em ciclos silvestres. Os acontecimentos da Segunda Guerra Mundial, nessa região, criaram condições favoráveis à expansão dos vetores da Dengue, tornando-a epidêmica e proporcionando o surgimento de formas clínicas graves da doença, a Febre Hemorrágica por Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque por Dengue (SCD) (Rudnick 1986; Schatzmayr 2008)

1.2 Agente etiológico

Os vírus da Dengue pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Este gênero abrange mais de 70 vírus, onde todos são classificados como arbovírus (*arthropod-borne viruses*), com transmissão e desenvolvimento mediado, em sua maioria, por carrapatos ou mosquitos. No caso dos vírus da Dengue, mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* e o homem são responsáveis pela manutenção do ciclo de transmissão, sendo esse vertebrado, o único a desenvolver as formas clínicas da doença. Os vírus da Dengue possuem genoma de ácido ribonucleico fita simples (ssRNA) com polaridade positiva, protegido por um capsídeo de simetria icosaédrica, formando o nucleocapsídeo. O DENV é circundado por um envelope constituído por dupla camada lipídica associada à proteína de membrana (M) e a glicoproteína do Envelope (E) que representa as espículas, formando uma partícula com cerca de 40 a 50 nanômetros (nm) (Figura 1.1). Existem quatro sorotipos com características antigênicas diferenciadas, sendo chamados DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (Gubler 1998; Lindenbach et al. 2007; Rodenhuis-Zybert et al. 2010; Ross 2010). Estudos recentes indicam o isolamento e a caracterização de um novo sorotipo de dengue de transmissão silvestre em Sarawak, Malásia, onde este

novos e emergentes sorotipos foram detectados em humanos, associados inclusive a casos graves da doença (Vasilakis 2013).

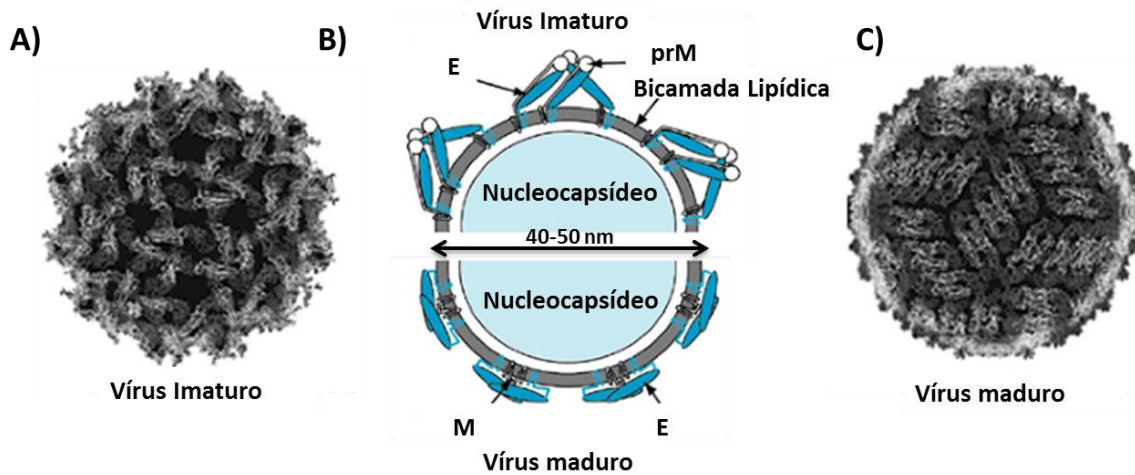


Figura 1.1 Estrutura e composição dos DENV. A) e C) Crio microscopia eletrônica de partícula imatura e madura do DENV, respectivamente. B) Desenho esquemático do DENV, demonstrando sua composição e o processo de maturação da partícula (Adaptado de Lindenbach et al. 2007).

O genoma dos Flavivirus é considerado infeccioso, como para todos os vírus de ácido ribonucleico (RNA) com polaridade positiva. O genoma dos vírus Dengue é composto por cerca de 11.000 nucleotídeos, possuindo apenas uma fase aberta de leitura (ORF). O RNA genômico é inicialmente transcrito em um ssRNA de polaridade negativa que serve como molde de replicação, a partir do qual são sintetizados os RNAs de polaridade positiva, os quais servirão de material genético empacotado no interior de novas partículas virais ou de RNA mensageiro viral, que será traduzido em uma única poliproteína com mais de 3000 aminoácidos. Posteriormente, ao ser clivada, a poliproteína originará as proteínas estruturais do capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana (prM/M), e as não-estruturais que são as NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4b, NS5 (do inglês: “Non-structural”) (Lindenbach et al. 2007; Rice et al. 1985; Ross 2010) (Figura 1.2).

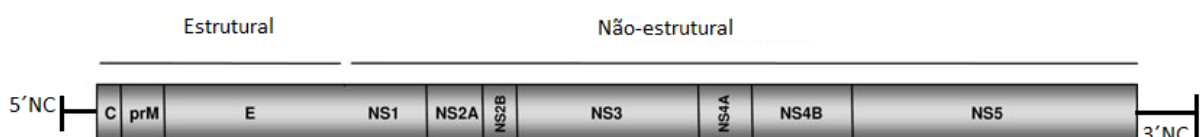


Figura 1.2 Organização do Genoma dos DENV (Adaptado de Rodenhuis-Zybert et al. 2010)

Regiões não codificantes (NC) flanqueiam a ORF nos terminais 3' e 5', de aproximadamente 450 e 100 nucleotídeos respectivamente. A porção 5'NC possui um Cap terminal, além de ser uma região altamente conservada entre os sorotipos dos DENV. A porção 3'NC carece de poliadenilação, mas possui uma estrutura stem-loop conservada em sua região terminal, de papel crucial para a síntese de RNA viral (Lodeiro et al. 2009). Estas regiões NC são requeridas para a biossíntese viral, atuando na regulação e expressão da replicação viral (Alvarez et al. 2005; Alvarez et al. 2008).

A proteína do capsídeo (C) é altamente básica e de aproximadamente 12 kilodaltons (kDa), constituindo um dímero simétrico, onde cada monômero é composto de quatro alfa hélices. A presença de resíduos hidrofóbicos e a distribuição assimétrica de cargas positivas determinam as superfícies de interação desta proteína com a membrana viral e o RNA genômico do vírus (Ma et al. 2004).

A proteína M (22 kDa) é originada de uma glicoproteína precursora, identificada como prM e de aproximadamente 26 kDa. A clivagem deste precursor está relacionada à maturação do vírus e à atividade fusogênica da glicoproteína E (Stadler et al. 1997).

A glicoproteína E é dimérica e de aproximadamente 57 kDa, cada monômero é composto de três domínios: I que forma um barril beta; II que é projetado na superfície do vírus entre as regiões transmembrana das subunidades homodiméricas; III que mantém uma conformação semelhante à imunoglobulina (Lindenbach et al. 2007). O domínio III está envolvido na interação com receptores celulares, influenciando na virulência do vírus (Modis et al. 2004). A glicoproteína do envelope possui papéis biológicos importantes, atuando na adsorção viral e fusão de membranas, além de ser o principal alvo para anticorpos neutralizantes (Chambers et al. 1990).

Em relação às proteínas não estruturais, a NS1(46 kDa) é dimérica, N-glicosilada, sendo uma glicoproteína altamente conservada que parece ser essencial para a atividade infecciosa do vírus, embora sua função precisa ainda não tenha sido descoberta (Young et al. 2000). O fato da NS1 ter circulação extracelular durante fase aguda da doença sugere uma contribuição desta proteína na fisiopatologia do dengue (Alcon et al. 2002). A proteína NS2A (22 kDa) é hidrofóbica e transmembrana, sendo sugerido sua coordenação na mudança entre o

empacotamento do RNA e a sua replicação (Khromykh et al. 2001). A proteína NS2B (14 kDa) é associada à membrana e forma um complexo estável com a NS3 exercendo papel de cofator na atividade proteolítica de clivagem das proteínas não estruturais (Falgout et al. 1991). A proteína NS3 (70kDa) é multifuncional, tem atividade nucleotídeo trifosfatase, RNA helicase e RNA trifosfatase, também agindo no processamento da poliproteína e na replicação do RNA (Li et al. 1999). A NS3 Associa-se a proteína NS5 para montagem do complexo de replicação. As proteínas NS4A e NS4B são hidrofóbicas e relativamente pequenas (16 kDa e 24 kDa, respectivamente), ambas atuam no processo de replicação, sendo a NS4B através de uma interação com a proteína NS3, ambas também atuam na inibição de sinalização de interferon (Jones et al. 2005; Lindenbach et al. 2007; Umareddy et al. 2006). A proteína NS5 (103 kDa) é altamente conservada e multifuncional, com atividade de metiltransferase e de polimerase RNA dependente (Lindenbach et al. 2007).

Em infecções naturais, estudos demonstram que células da linhagem mononuclear fagocitária são alvos primários para a replicação dos DENV (Jessie et al. 2004; Wu et al. 2000). Porém, outros sítios de replicação já foram evidenciados, com a detecção de partículas virais nos tecidos do fígado, coração, pulmão, rim, baço, cérebro e até mesmo na medula óssea. (Araújo et al. 2009b).

Os DENV entram na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor. Após a ligação do vírus a um receptor na superfície celular, o vírus é endocitado em processo mediado por clatrina (Chu & Ng 2004). O endossomo possui o lúmen ácido, o qual induz mudanças conformacionais na proteína E do vírus, o que ativa a sua atividade fusogênica, resultando na fusão da membrana viral com a membrana do endossomo e consequente liberação do nucleocapsídeo no interior da célula (Gollins & Porterfield 1986; Kuhn et al. 2002; Modis et al. 2004).

Assim que o genoma viral é liberado no citosol celular dá-se início a tradução e replicação viral. Vírions imaturos são formados pelo brotamento de nucleocapsídeos recém-formados no lúmen do retículo endoplasmático, assim adquirindo o envelope bilipídico com as proteínas estruturais prM e E (Van der Schaar et al. 2007). A maturação do vírion ocorre durante o transporte através das vesículas do complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da proteína prM, através de uma proteína do tipo furina, a clivagem distingue vírions infecciosos de defectivos

(Stadler et al. 1997). Em seguida, ocorre a liberação destes vírions através de um mecanismo semelhante à exocitose (Figura 1.3).

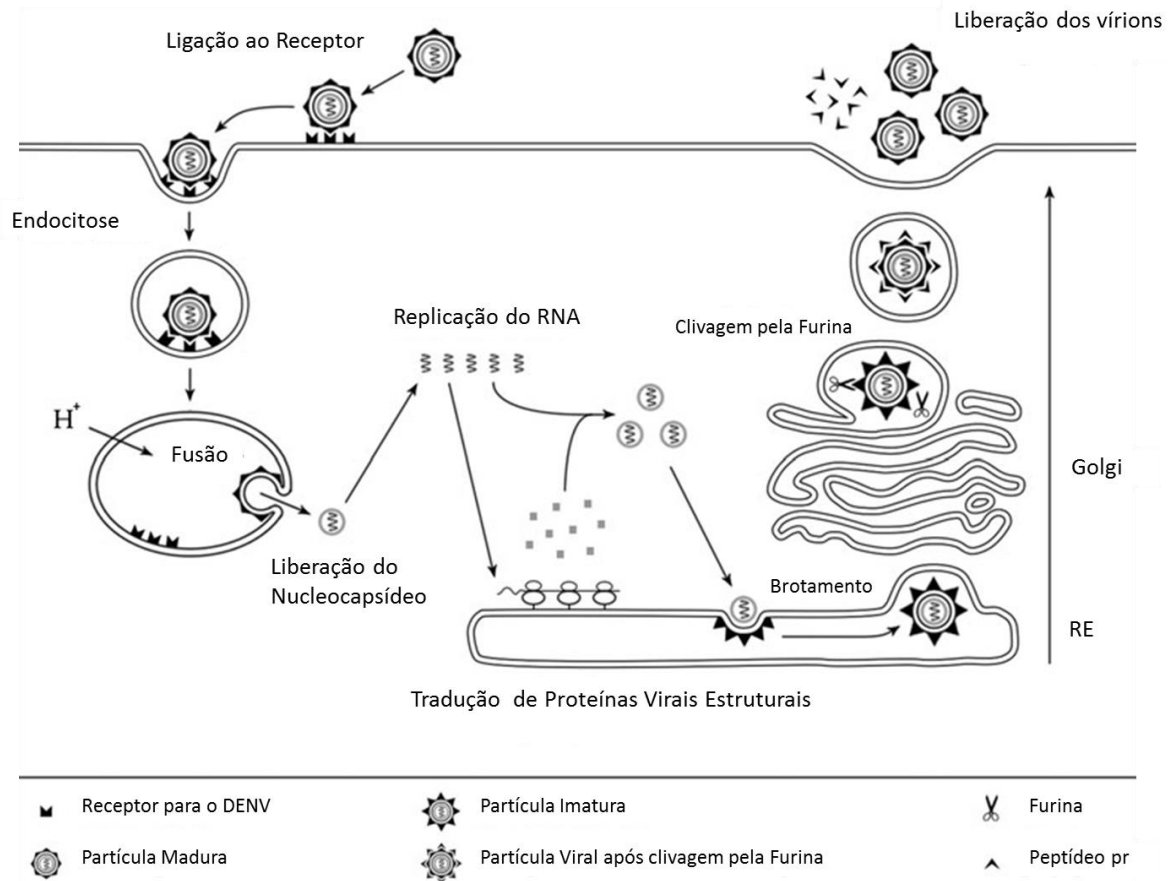


Figura 1.3 Modelo de biossíntese do vírus da Dengue (Adaptado de Van der Schaar 2009).

1.2.1 Diversidade Genética

Os vírus, que possuem RNA, demonstram grande variabilidade genética, devido à alta taxa de mutação intrinsecamente associada a RNA polimerase RNA dependente (Drake & Holland 1999), suas rápidas taxas de replicação e seus imensos tamanhos populacionais. Nos DENV, podemos perceber claramente esta variabilidade na existência de quatro sorotipos distintos antígenicamente. Com a utilização de métodos de sequenciamento e análise do genoma viral, podemos ter uma maior elucidação da estrutura genética dos DENV e dos processos que permeiam a evolução destes vírus (Holmes & Twiddy 2003).

Em 1990, Rico-Hesse realizou um trabalho que seria um dos principais pontos de referência na análise de variação intra-sorotípica dos DENV. Ao analisar

um fragmento de 240 pares de bases (pb) da região de junção dos genes E/NS1, ela pôde reconhecer distintos genótipos, definidos como um grupo de DENV que não possuíssem uma divergência nucleotídica maior que 6% (Holmes & Twiddy 2003; Rico-Hesse 1990).

Numa tentativa de esclarecer ou unificar a classificação dos genótipos dos DENV, Rico-Hesse, em 2003, realizou estudos filogenéticos dos quatro sorotipos, utilizando sequências nucleotídicas do gene E. Foram descritos cinco genótipos para DENV-1, quatro para DENV-2 e DENV-3 e três genótipos para DENV-4, caracterizados por diferenças genéticas e distribuição geográfica (Rico-Hesse 2003) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificação genotípica dos DENV(de acordo com Rico-Hesse 2003).

Sorotipo	Genótipos
DENV-1	Ásia Tailândia Pacífico Sul Américas/África Malásia
DENV-2	Malásia/Subcontinente Indiano Sudeste Asiático Américas Oeste Africano
DENV-3	Sudeste Asiático/Pacífico Sul Tailândia Subcontinente Indiano Américas
DENV-4	Indonésia Sudeste Asiático Malásia

Em trabalho mais recente, uma revisão realizada por Weaver e Vasilakis, em 2009, também analisando trabalhos realizados com sequências nucleotídicas do gene E caracterizaram cinco genótipos para DENV-1, seis para DENV-2, cinco para DENV-3 e quatro para DENV-4 (Weaver & Vasilakis 2009)(Tabela 1.2). Sendo esta, a classificação adotada em nosso estudo.

Tabela 1.2 Classificação genotípica dos DENV (de acordo com Weaver & Vasilakis 2009).

Sorotipo	Genótipo	Distribuição Geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V	Américas, Oeste da África, Ásia
DENV-2	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, subcont. Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950-1960)
	Sudeste Asiático/ Americano	Tailândia, Vietnã, Américas
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul das Ilhas do Pacífico
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, América Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980), América do Sul (2002-2004)
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

No Brasil, Dos Santos e colaboradores (2011) demonstraram que os DENV-1 isolados no período entre 2009 e 2011, pertencem ao genótipo V. Porém linhagens distintas são reconhecidas. As amostras isoladas em 2009/2010 agrupam em clados distintas (Linhagem II) das cepas brasileiras de 1986 e 2001 (Linhagem I), além de sugerirem uma possível origem asiática. Ademais, cepas isoladas em 2010 e 2011 agruparam formando outro clado (linhagem III), sugerindo uma origem Latino-americana para estas cepas. Estes achados indicam origens virais diferentes e possível substituição de linhagens ocasionando casos da doença no país.

As cepas brasileiras de DENV-2 foram descritas como pertencentes ao genótipo Sudeste Asiático/Americano, todavia duas linhagens distintas dentro deste genótipo foram identificadas. A primeira linhagem corresponde às amostras brasileiras isoladas no período entre os anos de 1990 a 2003, a segunda linhagem corresponde às amostras isoladas no período de reemergência do sorotipo 2, após 2007, sendo a linhagem a qual ocasionou uma das piores epidemias de Dengue no país, em 2007-2008. Provavelmente, esta circulação temporal de vírus geneticamente distintos foi resultado de uma evolução local, ou a introdução de uma

nova linhagem proveniente da região do Caribe (Faria et al. 2013; Oliveira et al. 2010).

Em relação ao DENV-3, temos a circulação do genótipo III. Araújo et al. (2012), demonstram quatro linhagens filogeneticamente distintas, deste mesmo genótipo. Três linhagens foram introduzidas através da região das Ilhas do Caribe e uma pela Colômbia ou Venezuela. O trabalho ainda sugere que as regiões brasileiras do Norte e Sudeste são importantes na introdução e disseminação das linhagens de DENV-3 no país.

O DENV sorotipo 4, após um período de 28 anos sem detecção, voltou a circular no Brasil, sendo primeiramente detectado em Roraima (Temporão et al. 2011), Estado da região norte e último local a reportar casos deste sorotipo, em 1981-1982 (Osanaí et al. 1983). Estudos filogenéticos demonstram que os genótipos I e II encontram-se em circulação no Brasil. O genótipo II é o mais comum na América do Sul e nas Ilhas do Caribe, enquanto o genótipo I foi caracterizado em apenas uma amostra proveniente do Estado da Bahia e recentemente foi demonstrada sua circulação em *Ae. aegypti* coletados em 2008, em Manaus (de Figueiredo et al. 2013; Nunes et al. 2012).

Diante do exposto, pode-se verificar que a variabilidade genética dos DENV é de grande importância para o entendimento dos padrões de disseminação do vírus, para o monitoramento de introdução e reintrodução de cepas potencialmente virulentas e o impacto das mesmas sobre a população, como mudanças na gravidade da doença. Isto enfatiza a necessidade de uma rígida e eficaz vigilância virológica, com o objetivo de auxiliar nas medidas de controle da Dengue, no Brasil e no Mundo (Araújo et al. 2012; dos Santos et al. 2011; Faria et al. 2013).

1.3 Patogênese das infecções por Dengue

A patogenia da Dengue ainda permanece com lacunas a serem preenchidas, não sendo ainda totalmente entendida. Acredita-se que os sintomas sistêmicos são, em parte, resultado da liberação de citocinas, devido à infecção viral nas células dendríticas e macrófagos e da ativação de linfócitos T-CD4 e T-CD8. O interferon, liberado pelos linfócitos T, inibe a atividade da medula óssea, tendo como

resultado a depleção de células da linhagem sanguínea, sendo as plaquetas as mais afetadas (Romanos 2008).

A falta de consenso em relação aos mecanismos patogênicos da febre hemorrágica por dengue e a síndrome do choque por Dengue são, principalmente, consequência da falta de um modelo animal adequado, o qual desenvolva todas as manifestações clínicas da doença (Chaudhry et al. 2006).

Rosen, em 1977, sugeriu que a virulência viral varia entre os sorotipos e genótipos dos vírus. Ele propõe que os quatro sorotipos do vírus dengue e diferentes linhagens dentro dos genótipos diferem em termos de patogenicidade. Esta hipótese enfatiza apenas aspectos relacionados à virulência do agente etiológico, não levando em consideração fatores imunológicos do hospedeiro, o que pode explicar a ocorrência de episódios graves da dengue (FHD/SCD) em infecções primárias (Rosen 1977).

Halstead, em 1988, propôs a teoria da infecção sequencial ou da facilitação dependente de anticorpos (do inglês *ADE: antibody dependent-enhancement*), onde a formação de imunocomplexos entre anticorpos heterólogos da classe IgG de infecções anteriores estaria relacionada à resposta imunológica exacerbada em uma segunda infecção com um sorotipo viral diferente (Halstead 1988). A endocitose de partículas virais recobertas por anticorpos heterólogos, via receptor para FC de IgG, presente nas células da linhagem mononuclear, se constitui num mecanismo adicional de entrada dos vírus nestas células resultando em uma amplificação da replicação viral. Os anticorpos heterólogos se ligam às partículas virais circulantes formando complexos antígeno-anticorpo. Esses complexos imunes circulantes vão se depositar nas paredes dos vasos, onde ocorre ativação do complemento resultando em um processo inflamatório. Os anticorpos circulantes também podem se ligar às células do endotélio vascular que estão infectadas e apresentam proteínas virais em sua membrana, o que leva a ativação do complemento promovendo a lise dessas células, resultando em lesão nas paredes dos vasos. Em ambos os mecanismos a ativação do complemento resulta na liberação de citocinas responsáveis por inflamação aguda tendo em vista a indução de quimiotaxia para neutrófilos e a ativação de mastócitos, bem como a liberação de anafilotoxinas, relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular o

que resulta em extravasamento de plasma resultando em choque hipovolêmico (Abbas et al. 2008; Nielsen 2009).

Trabalhos de Kouri et al., em 1987 e em 1989, sugerem uma teoria integral. Ao detalharem os principais achados da epidemia ocorrida em 1981, em Cuba, perceberam que fatores individuais, epidemiológicos e virais estariam relacionados e seriam responsáveis por casos graves da doença (Kouri et al. 1987; Kouri et al. 1989) (Figura 1.4). Desta forma, sem exclusão ao que foi proposto por Rosen (1977) e Halstead (1988), mas indicando que há um caráter multifatorial associado à gravidade da doença.

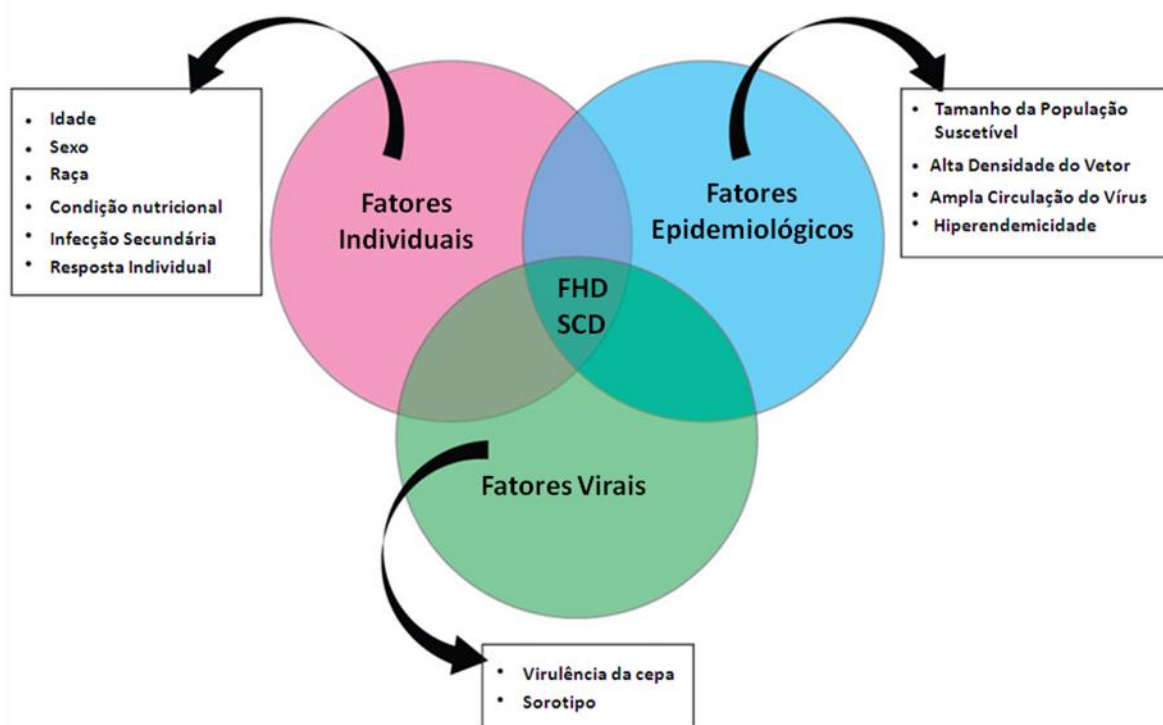


Figura 1.4 Hipótese Integral para o desenvolvimento da DHF/SCD.(Adaptado de Guzman & Kouri 2002)

Em dengue, a teoria do pecado original antigênico foi primeiramente descrita por Halstead et al., em 1983. Nesse trabalho, percebeu-se que a resposta imunológica humoral possui grande afinidade pelo sorotipo infectante em infecções primárias. Ao ocorrer uma infecção secundária, por outro sorotipo, os linfócitos B de memória são rapidamente ativados e produzem anticorpos específicos ao epítopo viral da primeira infecção, tornando a resposta ineficaz e inibindo a ativação de linfócitos B *naive*, os quais produziram anticorpos específicos para o sorotipo da

infecção secundária (Halstead et al. 1983). Mais recentemente, o pecado original antigênico também foi descrito para a resposta imunológica celular direcionada para dengue (Mongkolsapaya et al. 2003). Uma maior ativação de células T CD8+ e T CD4+, com elevada proliferação e morte celular, contribui para uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, dano tecidual, e alteração na permeabilidade vascular, podendo ocorrer extravasamento de plasma. Adicionalmente, esta ineficácia da resposta celular e humoral, em infecções secundárias, resulta em maior carga viral, diretamente relacionada à gravidade da doença (Mongkolsapaya et al. 2003).

O mimetismo molecular é um dos mecanismos de resposta autoimune devido à infecção viral. Este tipo de mecanismo, em dengue, foi primeiramente demonstrado por Markoff et al., em 1991, onde foi evidenciado reatividade cruzada entre anticorpos dirigidos a proteína do Envelope (E) do vírus Dengue e o plasminogênio humano (Devido a uma similaridade de 20 aminoácidos) (Markoff et al. 1991). Atualmente, já foi demonstrado que anticorpos dirigidos a outras regiões do vírus, como a proteína não estrutural 1 (NS1) e a proteína da pré-membrana (prM), também podem apresentar reatividade cruzada com o plasminogênio, células do tecido endotelial e plaquetas do hospedeiro (Chuang et al. 2011; Lin et al. 2001; Lin et al. 2003). Este funcionamento anormal da coagulação sanguínea e a mudança na permeabilidade vascular podem ser responsáveis pela patogênese da FHD/SCD, porém Halstead, em 2012, questiona o porquê da não ocorrência de trombocitopenia e permeabilidade vascular crônica, já que a resposta de anticorpos pode perdurar por anos e esses mesmos anticorpos são os causadores desta resposta autoimune (Halstead 2012).

1.4 Vetores

Os vírus da Dengue circulam em ambientes florestais por mosquitos do gênero *Aedes* e primatas inferiores, porém, os DENV são os únicos arbovírus que se adaptaram ao ambiente urbano a ponto de não necessitarem de ciclos silvestres para a sua manutenção (Gubler 2002). Sendo assim, o seu principal ciclo de transmissão envolve apenas humanos e mosquitos de gênero *Aedes*, com *Aedes aegypti* como principal vetor e *Aedes albopictus* como vetor secundário (Gubler et al. 2007) (Figura 1.5).

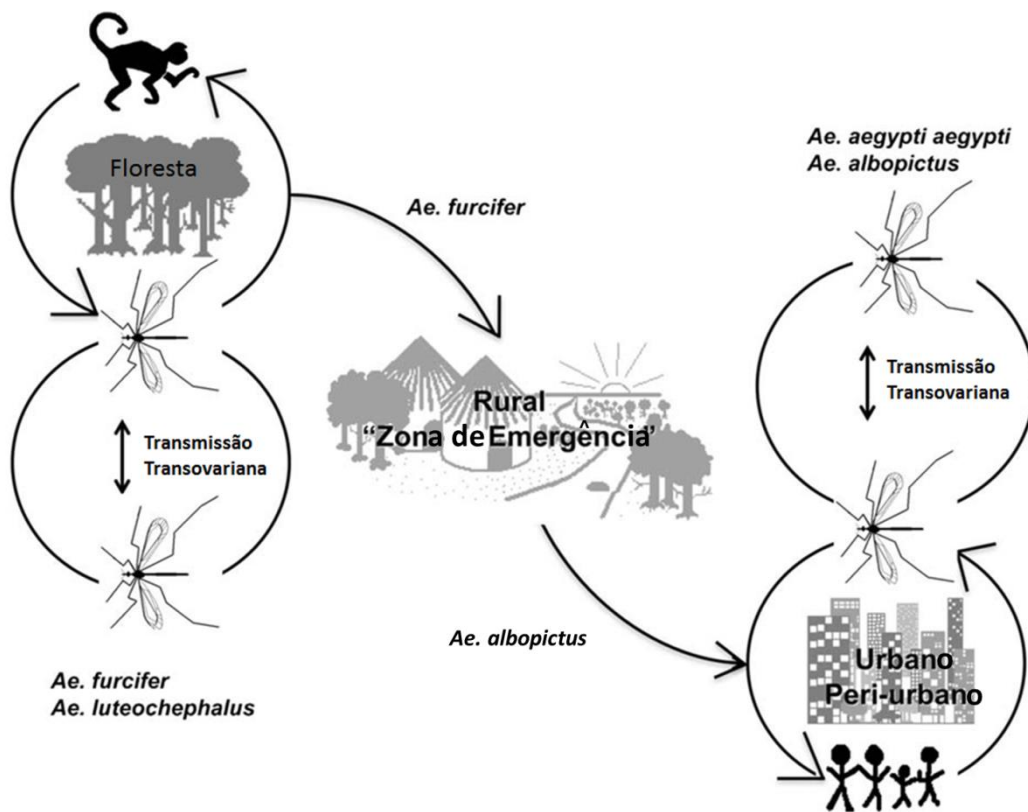


Figura 1.5 Ciclos de transmissão da dengue (Adaptado de Weaver & Vasilakis 2009).

Aedes aegypti é o principal vetor urbano dos vírus da dengue em todo o mundo. Nos últimos 25 anos, um aumento global da dengue e da distribuição do *Ae. aegypti* tem ocorrido, causando inúmeras epidemias (Jansen & Beebe 2010).

Esse mosquito possui características determinantes para o agravamento da disseminação do vírus da Dengue, sendo bastante domiciliado e adaptado a ambientes urbanos. Seu repasto sanguíneo ocorre durante o dia, estando adaptado ao horário de atividade humana no peridomicílio, além de realizar inúmeros repastos para apenas um evento de oviposição. As fêmeas possuem preferência de alimentação em humanos, fator que determina o aumento de ovos quando comparado com alimentação em outros vertebrados. Os ovos são postos em objetos antrópicos que acumulam água e podem resistir à dessecação por mais de um ano, outro agravante é o modo de transmissão transovariana que facilita a transmissão do vírus para os humanos, modificando a epidemiologia da doença (Jansen & Beebe 2010; Woke 1937).

De origem africana, *Ae. aegypti*, se adaptou bem a regiões áridas, passando também a acompanhar as migrações humanas. Por meio de navios e outras formas de dispersão, este vetor chegou as Américas e a Ásia. O comércio de escravos, durante os séculos XVIII e XIX, favoreceu a introdução desse mosquito, afetando principalmente cidades portuárias com saneamento precário. Na África, a raça *formosus* do *Ae. aegypti* demonstra baixa capacidade vetorial para a Dengue, o que explica o baixo impacto desta doença no continente (Schatzmayer 2008).

Aedes albopictus é um vetor competente para pelo menos 26 arbovírus. Dentre eles, a importância deste artrópode, na transmissão e ecologia viral, é reconhecida para os 4 sorotipos de Dengue e o vírus Chikungunya. O que não exclui o seu intenso potencial para disseminação de outras doenças virais (Paupy et al. 2009).

Nos últimos 10 anos, esta espécie foi o vetor primário em surtos de Dengue no Havaí, em Ilhas do Oceano Índico, na África Central e na China meridional, além de ter sido responsável pela transmissão dos primeiros casos autóctones de Dengue na Europa (Bonizzoni et al. 2013). Em países do sudeste da Ásia e nas Ilhas do Pacífico, este mosquito tem papel de vetor secundário da Dengue, atuando apenas em áreas rurais. A larga disseminação deste vetor, sendo encontrado na Europa, Ásia, Américas e África, aliada à capacidade competitiva em relação ao *Aedes aegypti* e à competência na transmissão de inúmeros patógenos, tem colocado esta espécie como uma das principais preocupações das autoridades de saúde (Gratz 2004).

Estudos sugerem que a emergência do DENV, do ciclo selvagem para o epidêmico/endêmico urbano, só foi possível devido à adaptação às espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, não havendo necessidade de grande adaptação aos hospedeiros vertebrados, o que implica na possível reemergência de linhagens selvagens em ciclos endêmicos de Dengue (Moncayo et al. 2004; Vasilakis et al. 2007).

As fêmeas desses mosquitos ingerem o vírus da Dengue ao realizarem o repasto sanguíneo em humanos, no período de viremia. Após ser ingerido pelo mosquito, o vírus infecta as células epiteliais do intestino médio, onde se replica e é disseminado para outros tecidos e órgãos, incluindo ovários, cordão nervoso ventral, e gordura corporal. O mecanismo de disseminação dos DENV ainda não foi bem

elucidado, mas estudos sugerem que o sistema traqueal possa estar envolvido. Do oitavo ao décimo segundo dia, já se pode detectar os DENV nas glândulas salivares do inseto, finalizando o período de incubação extrínseca, o que torna o mosquito apto à disseminação a outro humano suscetível. O período de incubação intrínseca dura entre 4 a 10 dias, reiniciando o ciclo (Gubler et al. 2007; Salazar et al. 2007; World Health Organization 2009) (Figura 1.6).

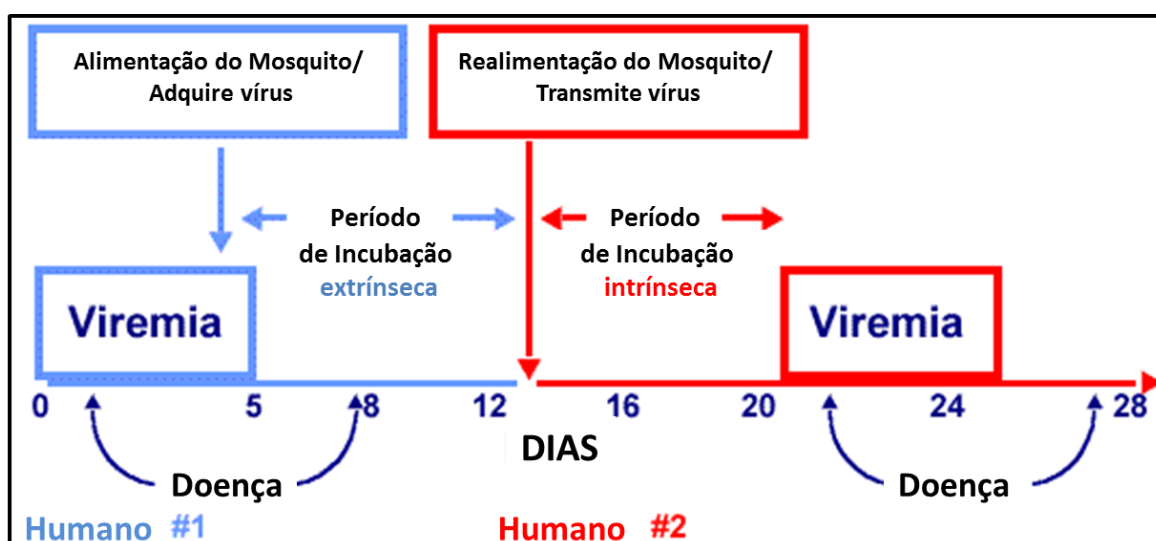


Figura 1.6 Períodos de incubação dos DENV (Adaptado de CDC, 2002).

Fatores ambientais e inerentes ao mosquito modulam a habilidade desses insetos na transmissão do vírus da Dengue (Gubler et al. 2007). Os fatores inerentes influenciam diretamente na competência vetorial dos mosquitos, onde a variabilidade genética entre o vetor e o vírus é o principal fator. A infecção do DENV nas glândulas salivares do mosquito não só regula genes que modulam a replicação viral, mas também genes que aumentam a busca por alimentação, amplificando a probabilidade de transmissão do vírus (Sim et al. 2012). A susceptibilidade oral dos mosquitos pode variar por seleção genética, assim como diferentes genótipos virais podem ter capacidade de infecção distinta em uma mesma população de mosquitos, o que demonstra a interação específica entre patógeno e vetor em nível de genótipo, afetando a dinâmica da Dengue e sua epidemiologia (Lambrechts 2011).

Os fatores ambientais são principalmente as condições climáticas, pois o metabolismo e a biologia dos vetores são afetados pela temperatura, umidade,

velocidade do vento, índice pluviométrico, entre outros fatores naturais (Gubler et al. 2007). Já tem se demonstrado que o período de incubação extrínseca pode durar de 5-33 dias a 25°C e de 2-15 dias a 30°C, afirmando a influência climática no ciclo de vida do mosquito e conseqüentemente na replicação e disseminação viral (Chan & Johansson 2012).

1.5 Manifestações Clínicas

A dengue é uma infecção sistêmica dinâmica, apresentando um amplo espectro de manifestações clínicas. O período de incubação é em média de 4 a 7 dias, após este período o quadro clínico tem início súbito e é seguido de três fases: febril, crítica e de recuperação. Podem ocorrer de quadros assintomáticos a graves de formas hemorrágicas e de choque, podendo até mesmo evoluir ao óbito. Todas estas variações assumidas pela doença dificultam o correto diagnóstico e influenciam no devido tratamento (Souza et al. 2008; World Health Organization 2009).

A fase febril aguda dura em média de 2 a 7 dias e é geralmente acompanhada por rubor facial, eritema cutâneo, dor retroorbital, cefaléia, mialgia e artralgia. Anorexia, náusea e vômitos também são comuns. Nesta fase inicial há dificuldades de distinção entre dengue e outras doenças febris. O monitoramento de sinais de alerta é crucial para que se possa reconhecer a entrada na fase crítica da doença e a possível evolução para um caso de alta gravidade (World Health Organization 2009).

Na fase de defervescência, entre o terceiro e sexto dia, o paciente pode apresentar aumento na permeabilidade capilar e aumento nos níveis do hematócrito, marcando o início da fase crítica. O período clinicamente significativo de vazamento de plasma dura de 24 a 48 horas. Neste ponto a diminuição ou o aumento de extravasamento capilar determinará a melhora ou agravamento da situação do paciente, respectivamente. O choque ocorre quando um volume crítico de plasma é extravasado. Com o choque prolongado pode haver danos aos órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada, este por sua vez leva a hemorragias graves. Entretanto, prejuízos aos órgãos, como fígado, encéfalo e coração, além de sangramentos, podem ocorrer sem óbvio extravasamento capilar e choque. A melhora após a fase de defervescência é dita como dengue branda ou

clássica, enquanto alguns pacientes podem evoluir para a fase crítica sem ao menos passar por esta fase de diminuição da temperatura, o que torna o monitoramento sanguíneo importante (Souza et al. 2008; World Health Organization 2009).

O período de recuperação ocorre após a passagem pelo período de 24 a 48 horas da fase crítica. Uma reabsorção extravascular ocorre gradualmente nas 48 a 72 horas posteriores, enquanto os sintomas gerais apresentam melhora. Há estabilização do hematócrito, do número de leucócitos e, mais tardiamente, do número de plaquetas (Figura 1.7) (World Health Organization 2009). Podem ser necessárias de 3 a 4 semanas para a recuperação completa do paciente. Neste período pode haver persistência de anorexia, emagrecimento, prostração, edemas de mão e quadros de desânimo à depressão (Souza et al. 2008).

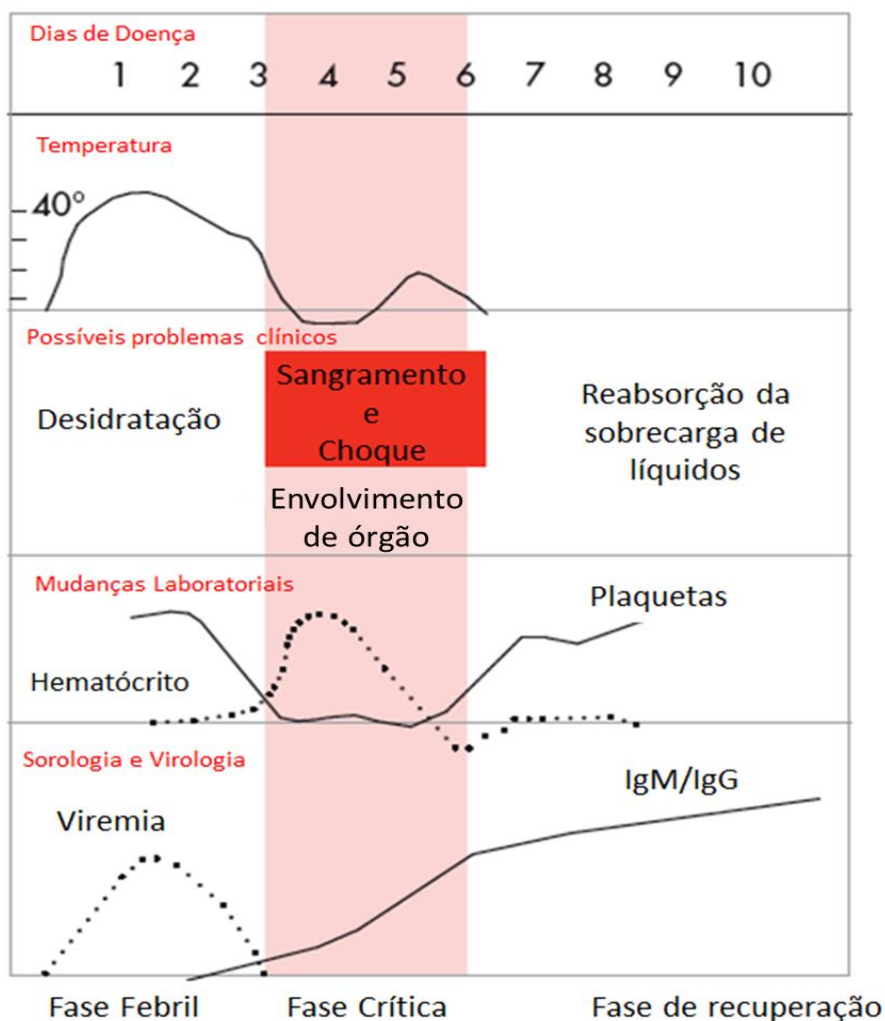


Figura 1.7 Resumo didático do curso da doença da dengue, demonstrando aspectos clínicos e laboratoriais (Adaptado de World Health Organization 2009).

A classificação de casos clínicos para a dengue passou, recentemente, por um estudo multicêntrico de avaliação, no intuito de melhorar o manejo clínico dos pacientes. Trabalhos como os de Phuong et al. (2004) e Bandyopadhyay et al. (2006) demonstraram falta de aplicabilidade da antiga classificação estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), demonstrando que a rigidez de definições e incompatibilidade de critérios para a definição de formas graves da doença são os principais problemas (Bandyopadhyay et al. 2006; Phuong et al. 2004).

A classificação de casos estabelecida pela OMS há mais de 30 anos, e ainda extensamente utilizada, estabelece a classificação da Dengue em assintomática, indiferenciada, clássica e febre hemorrágica por Dengue (World Health Organization. 1997).

A forma assintomática pode ocorrer devido a fatores relacionados ao vírus, como a baixa virulência da cepa, ou devido a fatores ligados ao hospedeiro, devido ao seu tipo de resposta imunológica. Estima-se que seja a forma clínica mais comum, ocorrendo cinco casos assintomáticos para cada caso sintomático (Souza et al. 2008).

Quando sintomática indiferenciada o paciente normalmente apresenta-se com febre, tendo manifestação clínica semelhante à gripe. Pacientes com este quadro, às vezes, erroneamente são diagnosticados como simples virose, ou até mesmo gripe (Souza et al. 2008).

A dengue clássica é a forma branda da doença, com manifestações clínicas já explicitadas neste trabalho, onde o paciente apresenta melhora após a fase de defervescência, sem agravamento hemorrágico e extravasamento de plasma (Souza et al. 2008)

Segundo Souza e colaboradores (2008), o termo “Febre Hemorrágica por Dengue” é a classificação mais imprecisa, pois o que caracteriza essa forma da doença não é a presença de sufusões hemorrágicas, mas sim o aumento da permeabilidade vascular (Souza et al. 2008).

A OMS estabelecia a divisão da Dengue hemorrágica em graus de I a IV, sendo os Graus III e IV classificados como síndrome do choque por Dengue. Em resumo, a Febre hemorrágica por Dengue de Grau I só apresenta manifestações hemorrágicas provocadas, a de Grau II apresenta manifestações hemorrágicas

espontâneas, a de Grau III apresenta além de hemorragias espontâneas, instabilidade hemodinâmica, havendo hipotensão postural ou choque. A de Grau IV apresenta além de manifestações hemorrágicas, choque profundo (World Health Organization. 1997).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) sugeriu a classificação como Dengue com complicações (DCC) para casos graves que não se enquadram nos critérios sugeridos pela OMS. A presença de um destes fatores caracteriza este tipo de Dengue sugerido: alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, insuficiência hepática, plaquetopenia igual ou inferior a 50.000/mm³ e óbito (Brasil 2008).

Com vistas à simplificação do manejo clínico de pacientes e melhoramento no tratamento de casos graves da Dengue, a OMS sugeriu uma nova forma de classificação e triagem para os casos de Dengue. Os pacientes com dengue foram agrupados em dois grupos: Dengue com ou sem sinais de alerta e Dengue grave. Fatores determinantes para a classificação em Dengue grave são: intenso extravasamento de plasma, grave envolvimento de órgãos e hemorragia grave (World Health Organization 2009) (Figura 1.8).



Figura 1.8 Classificação sugerida pela Organização Mundial de Saúde para classificação de casos de Dengue e níveis de gravidade (Adaptado de WHO, 2009).

Segundo a OMS (2009), a classificação em níveis de gravidade tem alto potencial prático no uso clínico, facilitando a tomada de decisão em relação ao tipo e intensidade do tratamento, além de resultar em dados mais consistentes para a vigilância epidemiológica e para os testes de drogas e vacinas (World Health Organization 2009).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a nova classificação de casos, sugerida pela OMS, é mais específica e sensível na detecção e triagem de casos graves da Dengue. Porém faz-se necessário um maior refinamento nos critérios de definição para extravasamento de plasma, comprometimento hemodinâmico, sangramento grave, e envolvimento de órgãos para uma melhora na relevância clínica. Além disso, é fundamental uma definição mais precisa para os sinais de alerta, no intuito de se evitar uma alta taxa de hospitalização desnecessária. Foi averiguado que esta nova classificação, apesar de promissora na perspectiva clínica, ainda precisa ser melhor avaliada quanto a sua efetividade em estudos epidemiológicos e fisiopatológicos (Gan et al. 2013; Hadinegoro 2012; Narvaez et al. 2011; van de Weg et al. 2012; Wanigasuriya et al. 2011).

A partir de janeiro de 2014, o Brasil começou a utilizar a nova classificação de casos de dengue da Organização Mundial de Saúde, de acordo com documento emitido pelo MS na página da internet do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Ministério da Saúde 2014).

1.6 Diagnóstico laboratorial

Aliados ao manejo clínico estão os métodos de diagnóstico laboratoriais específicos para Dengue, os quais se fazem necessários devido à semelhança clínica em relação a várias outras doenças. Por ser uma doença aguda, inclusive de notificação compulsória, a Dengue necessita de métodos rápidos e eficazes na constatação da enfermidade, com vistas a auxiliar nas medidas de controle do vetor na região e no manejo clínico, além de melhorar o conhecimento da epidemiologia da doença. A escolha do teste diagnóstico estará condicionada à infraestrutura do laboratório e ao período da doença em que o paciente se encontra, sendo este fator de suma importância para um resultado preciso (Figura 1.9) (Nogueira 2008).

Os métodos mais utilizados são: isolamento viral em cultivo de células, detecção do ácido nucléico viral pelo método de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), técnicas sorológicas para a pesquisa de anticorpos específicos (IgM/IgG) e antígenos específicos (NS1).

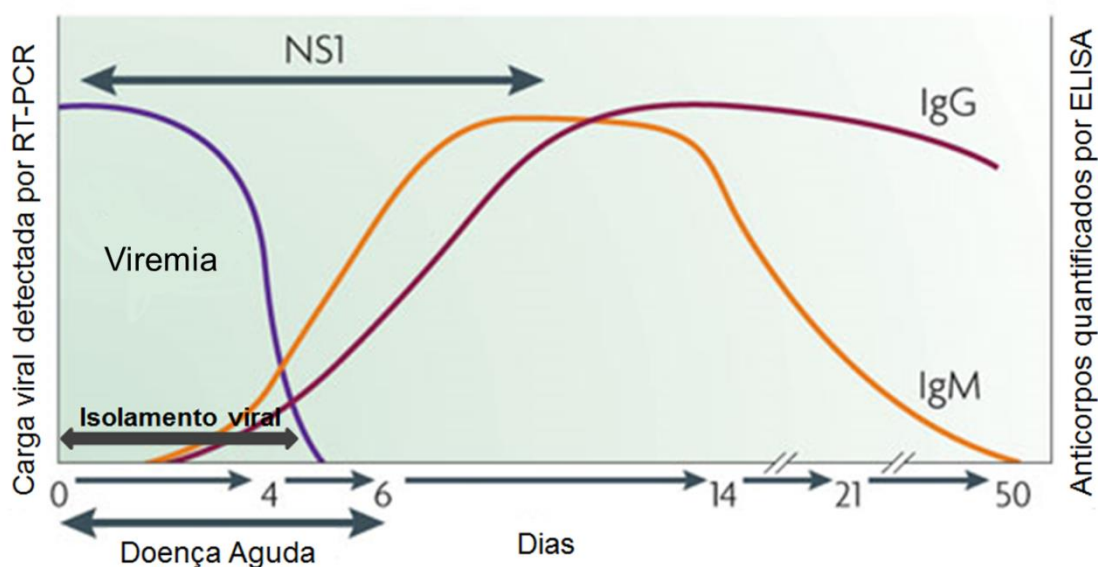


Figura 1.9 Vírus da Dengue, antígenos e respostas de anticorpos utilizados no diagnóstico, correlacionados ao período da doença (Adaptado de Guzman et al. 2010).

1.6.1 Isolamento viral

O isolamento viral é o método que fornece o resultado mais específico, pois se comprova de forma direta a infecção viral, sendo considerado “Padrão-Ouro” no diagnóstico para Dengue (Yamada et al. 2002). As amostras de casos suspeitos de dengue devem ser coletadas nos primeiros 4-5 dias, de início dos sintomas, ou seja, na fase aguda da doença e período virêmico do paciente. Geralmente o soro é utilizado para o isolamento viral, porém o plasma, leucócitos, sangue total e tecidos de casos fatais (fígado, baço, pulmão, rim, cérebro, coração, medula óssea) também podem ser utilizados (Araújo et al. 2009b; Guzman et al. 1999; Guzman et al. 2010).

Como o DENV é termolábil, o manejo rápido e adequado das amostras, para entrega ao laboratório, é necessário para o êxito do isolamento viral. Para o armazenamento de curto prazo, os espécimes podem ser mantidos à temperatura

de 4°C, no entanto, para um armazenamento mais prolongado é recomendada a temperatura de -70°C (Guzman & Kouri 2004).

O vírus da dengue pode ser isolado através da inoculação em mosquitos, cultura de células, utilizando linhagens celulares de mosquito, como C6/36 e AP61 ou linhagens celulares de mamíferos, tais como células Vero e LLC-MK2, ou a inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos (Peeling et al. 2010).

Os sistemas de isolamento viral em linhagens celulares de mosquito são mais fáceis de serem mantidos, sendo facilmente cultivados e estocados à temperatura ambiente, além de apresentarem uma maior sensibilidade à infecção do DENV em comparação às linhagens celulares de mamíferos (Race et al. 1978; Race et al. 1979; Teles et al. 2005; Tesh 1979). Atualmente, a inoculação de espécimes em culturas de células de mosquitos *Ae. albopictus* clone C6/36 tem sido amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa e/ou diagnóstico. O DENV induz efeito citopático (ECP) nas linhagens celulares de mosquito, em seguida, é realizada a técnica de imunofluorescência indireta, para detecção e tipagem viral, utilizando anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV. Porém, nem todas as culturas com vírus produzem ECP, sendo submetidas à técnica de IFI utilizando soros hiperimunes, desta forma, as culturas com resultado negativo são consideradas negativas. (Gubler et al. 1984; Igarashi 1978; World Health Organization 2009).

1.6.2 Testes Imunoenzimáticos

Os testes imunoenzimáticos são os mais utilizados na confirmação de casos suspeitos de Dengue. Quando comparados ao isolamento viral e a métodos moleculares, esses testes sorológicos são relativamente mais baratos e fáceis de serem executados, além de possibilitarem o processamento de um número elevado de amostras (Guzman et al. 2010; Nogueira 2008).

Uma das mais importantes ferramentas no diagnóstico de rotina para dengue é o MAC-ELISA (do inglês: *IgM Antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*), um teste imunoenzimático usado para detecção da Imunoglobulina M (IgM) específica para Dengue (Guzman & Kouri 2004). O teste consiste na captura do IgM anti-dengue do soro por um anticorpo anti-IgM humano ligado a uma fase sólida, em seguida, uma mistura dos antígenos dos quatro

sorotipos reage com o IgM anti-dengue e esta reação é detectada por anticorpos policlonais ou monoclonais para Dengue ou Flavivírus em geral, conjugados a uma enzima fluorescente (Innis et al. 1989; Kuno et al. 1991; Nawa et al. 2001). A IgM pode ser detectada precocemente até antes do quinto dia de início dos sintomas, permanecendo de 30 a 60 dias, com o pico de detecção após uma semana do início do quadro (Nogueira 2008).

O Elisa para a Imunoglobulina G (IgG) pode ser usado para confirmar infecções passadas ou ativas, quando disponíveis amostras pareadas. Infecções por dengue podem ser classificadas como primária ou secundária, por determinação da proporção de unidades de dengue de IgM para IgG (Innis et al. 1989), por quantificação dos títulos de IgG (Miagostovich et al. 1999) ou por testes de avidéz da IgG (de Souza et al. 2004). Durante uma infecção primária a IgM possui títulos elevados e mais específicos, enquanto na resposta a uma infecção secundária, a IgG possui uma titulação mais elevada e maior avidéz (Peeling et al. 2010) (Figura 1.10)

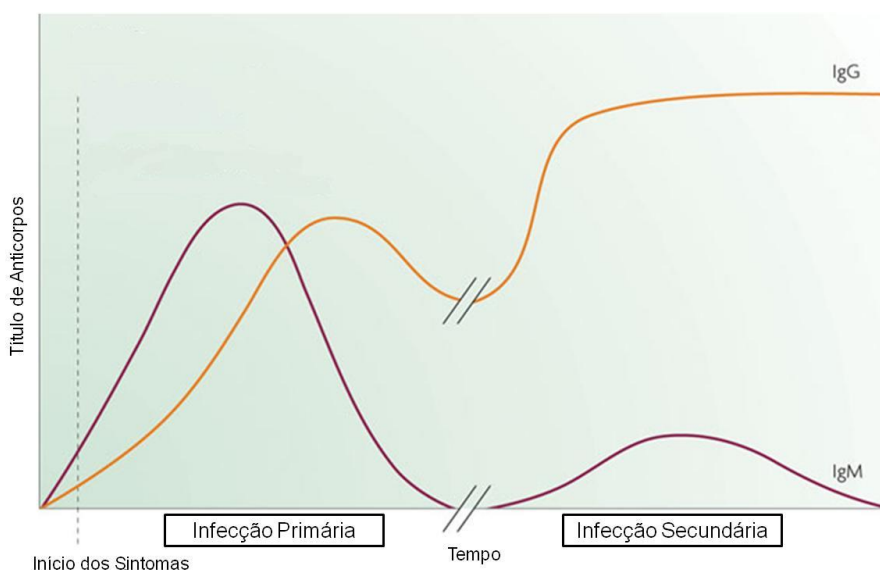


Figura 1.10 Títulos de Anticorpos IgM e IgG, em resposta à infecção primária e secundária do DENV (Adaptado de Peeling et al. 2010)

O antígeno Não estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína altamente conservada, presente em todos os Flavivírus, e possui um importante papel na viabilidade viral. É secretada por células infectadas, como um hexâmero solúvel e

também já foi demonstrado estar associada à membrana sob forma de dímero (Flamand et al. 1999; Winkler et al. 1989).

Desde o aparecimento dos sintomas até o nono dia, a NS1 pode ser encontrada no sangue periférico, o que é de grande valia para o diagnóstico precoce do Dengue (Alcon et al. 2002). Kits comerciais, dentre eles, o pan-E DENGUE EARLY ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia), PLATELIA™ DENGUE NS1 ANTIGEN e DENGUE NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes La Coquette, França), estão disponíveis e apresentam boa sensibilidade e especificidade (Lima et al. 2010). Estes testes também podem ser usados para captura do antígeno NS1 em outros tipos de amostras, além do soro e plasma, tais como, fígado, pulmão, rim, cérebro, baço e timo. A detecção do antígeno NS1 tem se mostrado uma ferramenta alternativa e bastante útil no diagnóstico prematuro para Dengue, podendo ser utilizada como mecanismo de triagem para o isolamento viral e em conjunto com o MAC-ELISA para o aumento nas taxas de confirmação de casos (Lima et al. 2011; Lima et al. 2010).

1.6.3 Métodos Moleculares

Todos os ensaios de amplificação molecular envolvem três passos básicos: 1- Extração e purificação do ácido nucleico, 2- Amplificação do ácido nucleico, 3- Detecção/ Caracterização do produto amplificado. O ácido ribonucleico (RNA) do DENV pode ser detectado em uma variedade de amostras, como tecidos, líquido, sangue total, soro ou plasma, através das técnicas moleculares (Lanciotti 2003).

A técnica de RT-PCR se mostra uma ferramenta rápida, sensível e específica para detecção e confirmação da Dengue em fase aguda (Tang & Ooi 2012). Vários protocolos têm sido desenvolvidos e se baseiam na utilização de iniciadores de oligonucleotídeos (*primers*) dirigidos a regiões específicas do genoma de cada sorotipo do DENV (Peeling et al. 2010). Nas Américas, o protocolo mais utilizado é o descrito por Lanciotti e colaboradores, em 1992, e indicado pela Organização Pan-Americana de Saúde. Este protocolo descreve um procedimento *semi-nested* onde inicialmente se amplifica uma região conservada para os 4 sorotipos do DENV, localizada na junção dos genes das proteína C e prM. Em etapa posterior, são utilizados *primers* específicos para cada sorotipo (Lanciotti et al.

1992). Este processo é capaz de detectar os quatro sorotipos do DENV de modo qualitativo, podendo detectar até mesmo coinfeções de sorotipos diferentes (Araújo et al. 2006; dos Santos et al. 2003). Técnicas de *Nested* PCR aumentam a sensibilidade de detecção, pois o produto de amplificação inicial é usado como alvo na segunda etapa de amplificação (Peeling et al. 2010).

A técnica de PCR convencional também pode ser utilizada na vigilância entomológica. A detecção do vírus nos mosquitos serve de sentinela, fornecendo informações sobre quem são os vetores que transportam o DENV na natureza e o que está acontecendo em termos de transmissão do vírus antes e durante estes surtos (de Figueiredo et al. 2010; Kow et al. 2001).

A técnica de qRT-PCR em tempo real combina a amplificação por RT-PCR com a marcação fluorescente de sondas específicas capazes de detectar o material genético viral amplificado durante a reação, desta forma já quantificando a carga viral (Lanciotti 2003). Esta quantificação permite relacionar a gravidade da doença com a carga viral, já havendo estudos demonstrando que há correlação positiva (Araújo et al. 2009a; Kong et al. 2006; Vaughn et al. 2000). A qRT-PCR em tempo real é realizada em um sistema fechado e tem duração de aproximadamente 3 horas, sem necessidade de manipulação após a amplificação, o que diminui bastante o risco de contaminação (Johnson et al. 2005).

1.7 Prevenção e Controle

Apesar de muito pesquisada, ainda não está disponível uma vacina preventiva eficaz, assim como terapêutica etiológica e uma quimioprofilaxia efetiva. O combate ao *Ae. aegypti* ainda é o único elo passível de intervenção no controle e prevenção da dengue (Medronho 2008; Tauil 2002). A luta contra este mosquito, extremamente urbanizado, é multifacetada e exige ações coordenadas de múltiplos setores públicos e privados da sociedade, além de ações educativas que possibilitem a conscientização e a mudança de hábitos da população, visando à eliminação de criadouros para o inseto. Devido a esta complexidade de fatores, observamos uma falta de efetividade das medidas de controle (Tauil 2007).

No Brasil, após a introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro, em 2000, e a confirmação da cocirculação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em outros Estados, foi implantado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (Brasil 2002). O

plano tinha como objetivo: diminuir a infestação pelo *Aedes aegypti*, reduzir a incidência e a letalidade da doença. Porém, já foi demonstrado que os objetivos não foram atingidos, havendo até mesmo agravamento de alguns índices pós-implantação do plano, o que aponta para uma necessidade de revisão operacional do PNCD (Pessanha et al. 2009).

Em 2012, a OMS publicou um documento instituindo o novo plano de estratégias globais para a prevenção e controle da Dengue. Os objetivos específicos são reduzir a mortalidade e morbidade da Dengue em pelo menos 50% e 25%, respectivamente, até o ano de 2020. Para atingir estes objetivos, são frisados cinco elementos técnicos: a) o rápido diagnóstico e tratamento clínico adequado; b) vigilância integrada e prevenção de surtos; c) medidas efetivas de controle do vetor; d) futura implantação da vacina; e) pesquisa básica, operacional e de execução, embasando toda a estratégia (World Health Organization. 2012).

1.7.1 Vacina

O desenvolvimento de drogas anti-dengue enfrenta inúmeros desafios. Apesar do grande aumento no conhecimento da biologia estrutural do vírus da Dengue, vários pré-requisitos são necessários para a garantia de eficácia e bom custo-benefício. Entre eles estão, a atividade contra todos os sorotipos, eficácia em infecções primárias e secundárias, a escolha de um alvo viral adequado, além de possuir baixo custo de produção e necessitar ser administrada como meio profilático. Embora existam inúmeras barreiras no desenvolvimento e implantação de drogas anti-dengue, progressos substanciais tem ocorrido (World Health Organization 2009).

Em relação às vacinas, existem várias candidatas em desenvolvimento. Entre as vacinas com vírus atenuados podemos citar algumas estratégias de desenvolvimento, como a tecnologia clássica de atenuação em cultura, a atenuação através de engenharia genética, a construção de vacinas quiméricas e vacinas de DNA. Também existem as vacinas com vírus inativados e vacinas contendo proteínas recombinantes do envelope do vírus, com ou sem adjuvantes, além de tecnologias mistas (Bricks 2008).

A vacina candidata em fase mais avançada está sendo desenvolvida pela Sanofi Pasteur, a vacina tetravalente ChimeriVax™-Dengue (CYD-TDV). Os vírus

que compõem a CYD-TDV foram construídos por meio da substituição dos genes que codificam as proteínas prM/M e E da cepa utilizada na vacina de febre amarela, pelos respectivos genes de cada um dos quatro sorotipos da dengue. Trata-se, portanto, de uma vacina combinada, que contém as cepas recombinantes resultantes CYD1, CYD2, CYD3 e CYD4 em uma única preparação (CYD1-4) (Guy et al. 2010; Monath 2007)(Figura 1.11).

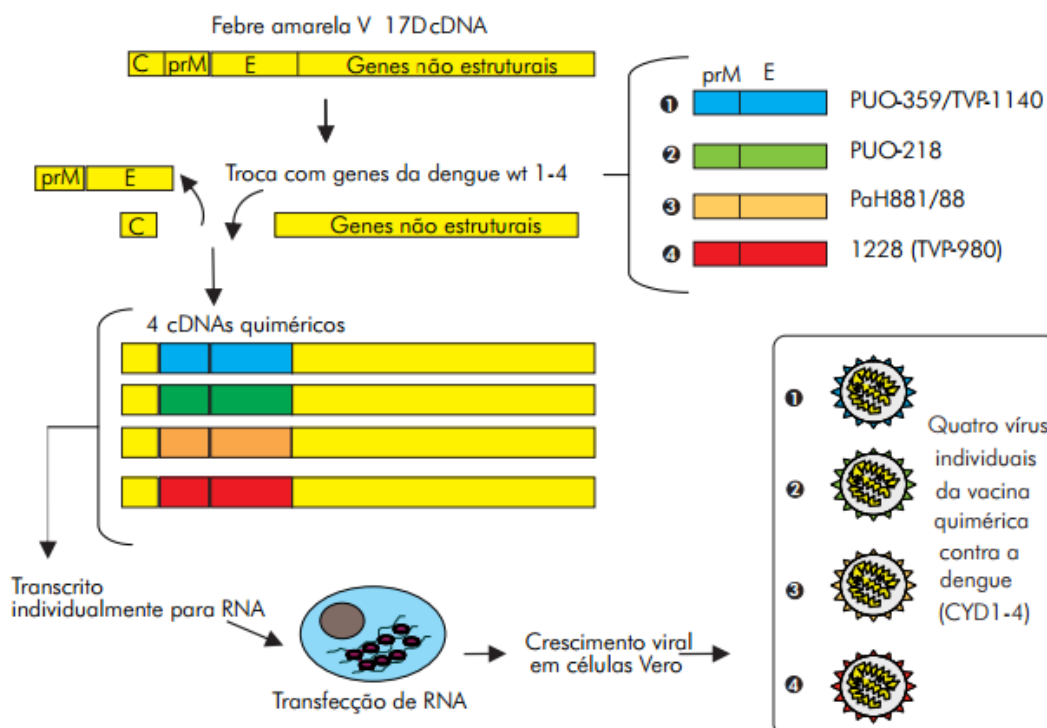


Figura 1.11 Construção das quatro vacinas quiméricas (Adaptado de Guy et al. 2010)

Três estudos independentes de fase I foram realizados na Austrália e nos Estados Unidos revelando a indução de significativa resposta do tipo T-CD4 e T-CD8 (Guy et al. 2008). Em estudo anterior, Deauvieu e colaboradores (2007) demonstraram que a vacina quimérica induz a maturação de células dendríticas e resposta controlada, acompanhada por limitada produção de citocina inflamatória e consistente expressão de interferons e outros fatores antivirais, assegurando um padrão que condiz com as observações clínicas de segurança e imunogenicidade (Deauvieu et al. 2007).

Estudos de fase I e II, realizados na Ásia, nos Estados Unidos e na América Latina, com vacina quimérica tetravalente atenderam a todas as exigências para a realização de estudos de fase III (Bricks 2008). A fase IIb foi iniciada em crianças no final de 2009 para dar suporte ao início de estudos de fase III na Ásia e na América Latina (Trent et al. 2010). Na Tailândia um estudo de fase 2b realizado em crianças, demonstrou segurança, porém baixa eficácia (30%), além de não ter induzido proteção contra o sorotipo 2 do vírus (Sabchareon et al. 2012). No Peru e na Malásia, estudos de fase II e III, respectivamente, em crianças de 2 a 11 anos, demonstraram um satisfatório perfil de segurança e uma resposta humoral balanceada para os 4 sorotipos, sendo administrada em esquema de três doses. Estes resultados apoiam a continuidade no desenvolvimento da CYD-TDV. Estudos adicionais em áreas endêmicas estão em andamento para expandir a compreensão de problemas potenciais no uso da vacina (Hss et al. 2013; Lanata et al. 2012).

Embora muito se tenha avançado e exista uma expectativa de licenciamento da vacina para Dengue nos próximos anos (Bentsi-Enchill et al. 2013), muitas perguntas não respondidas a respeito da patogênese de casos graves da Dengue e a falta de um modelo animal perfeito que manifeste todos os aspectos clínicos da doença são os principais fatores limitantes para o sucesso no desenvolvimento da vacina (Kumar et al. 2010).

1.8 Epidemiologia

Nos últimos 50 anos a dengue vem progressivamente alcançando o status de pandemia. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas residem nos mais de 100 países, de clima tropical e subtropical, localizados em regiões da África, Américas, Mediterrâneo oriental, sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental, endêmicos para esta enfermidade (Figura 1.12). A OMS estima que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente e que 500.000 pessoas desenvolvam a forma grave da doença, das quais 2,5% evoluem a óbito (World Health Organization 2011).



Figura 1.12 Países ou áreas de risco de infecção por DENV (Adaptado de World Health Organization 2009) .

A dinâmica da transmissão do vírus da dengue é afetada pela interação de fatores ambientais e sociais, agente etiológico, vetor e população de hospedeiros (Silva Júnior & Pimenta Júnior 2008). Gubler (2011) aponta quatro fatores que podem ser citados como principais impulsionadores do aumento da incidência e propagação da dengue: a falta de um controle efetivo do vetor, o novo estilo de vida consumista e insustentável dos seres humanos, a urbanização não planejada e a globalização (Gubler 2011).

1.8.1 Dengue nas Américas

Em 1947, foi aprovado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) o plano de erradicação continental do *Ae. aegypti*, proposto pelo Brasil e com o objetivo de eliminar a febre amarela urbana nas Américas (Pan American Health Organization 1997). O grande sucesso deste plano pôde ser verificado com a erradicação do vetor em 18 países continentais e em algumas ilhas do Caribe, já em 1962. Apesar dos esforços neste período, em 1953 foi isolado o DENV-2 do sangue de paciente em Trinidad, porém em situação não epidêmica (Anderson et al. 1956).

Em 1972, mais três países foram adicionados à lista de erradicação do *Ae. aegypti*. Porém já nos anos 60, alguns países começaram a ser reinfestados, tendo como fonte os países que não haviam erradicado o mosquito, como: Venezuela, Cuba, Estados Unidos da América e algumas áreas do Caribe (Pan American Health Organization 1997, 1998). Dois grandes eventos epidêmicos ocorreram, na década de 60, devido a estes países. O primeiro foi em 1963-1964 e iniciado na Jamaica, disseminando-se por Porto Rico, Ilhas do Caribe e Venezuela. O agente etiológico causador desta epidemia foi o DENV-3 de origem asiática (Halstead 2006). O segundo ocorreu em 1968-1969, iniciando novamente na Jamaica e alastrando-se por Porto Rico, Pequenas Antilhas e Venezuela. O DENV-2 foi isolado em todos os países envolvidos e o DENV-3 apenas na Jamaica (Brathwaite Dick et al. 2012).

A falta de sustentação e até mesmo abandono dos programas de vigilância vetorial, devido à perda de importância política em países que haviam conseguido a erradicação, ocasionou a reintrodução e expansão geográfica do mosquito, na década de 70 (Brathwaite Dick et al. 2012; Pan American Health Organization 1997, 1998).

Em 1977, o DENV-1, de origem asiática, foi reportado pela primeira vez causando epidemias, atingindo Cuba, Jamaica, Venezuela, Porto Rico, alastrando-se pelas Ilhas do Caribe, México, Texas e América Central (Guzman & Kouri 2003; Halstead 2006).

Em 1981, uma epidemia em Cuba, causada pelo DENV-2, foi reconhecida como a primeira epidemia na região com casos graves da doença, registrando 10.312 casos de DHF e 158 mortes (Kouri et al. 1989). No mesmo ano, o DENV-4 foi introduzido através de ilhas caribenhas orientais (Guzman & Kouri 2003).

O DENV-3 havia sido isolado pela última vez na Colômbia e Porto Rico, em 1977-1978, permanecendo 16 anos sem detecção. Em 1994, foi reintroduzido nas Américas, sendo isolado no Nicaraguá e Panamá, porém, pertencente a genótipo diferente do qual já havia circulado nas Américas e com associação a casos de DHF (Centers for Disease Control and Prevention. 1995; Guzman et al. 1996).

Desde o início do século 21, tem ocorrido um grande aumento no número de casos de Dengue nas Américas, com circulação dos 4 sorotipos. Durante este

período, dois surtos Pan-americanos ocorreram. Em 2002, 1.015.420 casos foram registrados, incluindo 14.374 casos de DHF/SCD e 255 mortes. O Brasil correspondeu a mais de 75% dos casos do continente. O sorotipo mais frequente foi o DENV-3, seguido do DENV-2. Em 2010, ocorreram mais de 1,7 milhões de casos e 1.185 mortes, os sorotipos DENV-1 e DENV-2 foram os mais frequentes. Os países mais afetados foram: Brasil, Colômbia, Venezuela, Honduras, Guadalupe e Martinica (Brathwaite Dick et al. 2012).

A América evoluiu de um estado de baixa endemicidade para um estado hiperendêmico, com casos autóctones em quase todos os países e circulação dos quatro sorotipos. Nos últimos 30 anos, ocorreu um aumento de 4,6 vezes no número de casos notificados e aumento no número de casos graves, especialmente em crianças (Brathwaite Dick et al. 2012; San Martin et al. 2010) (Figura 1.13).

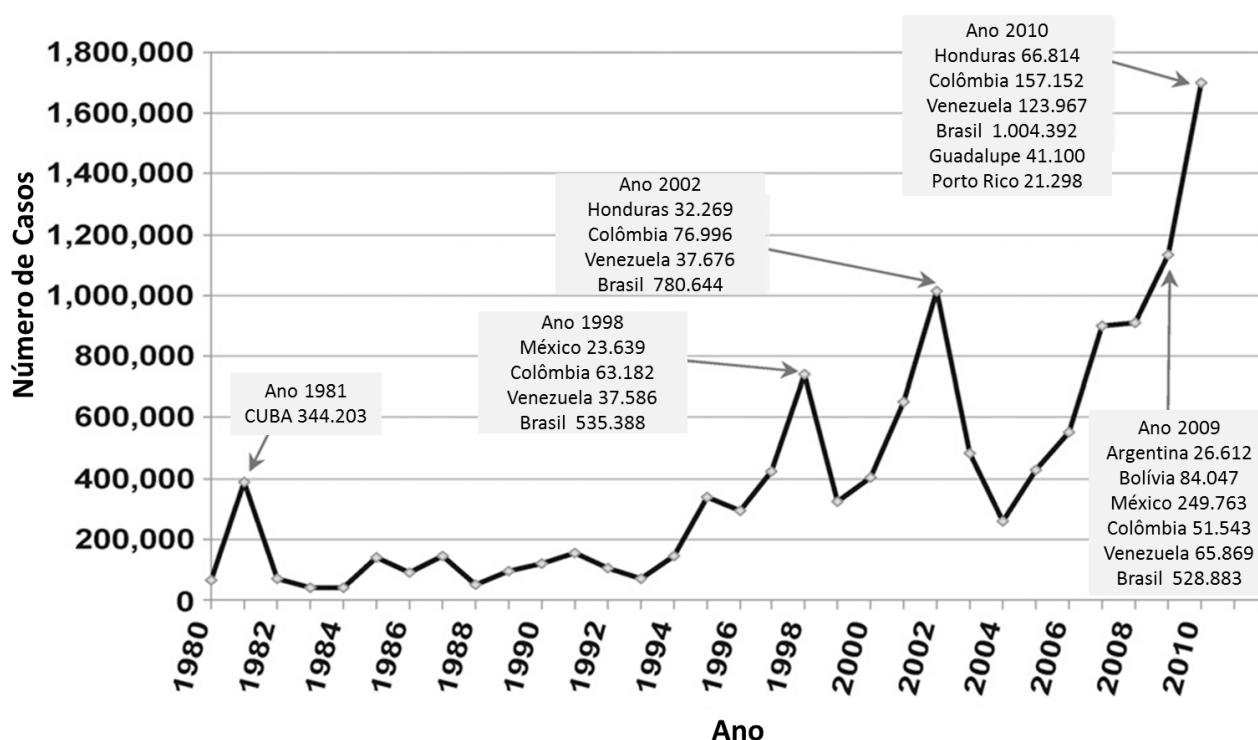


Figura 1.13 Evolução da Dengue nas Américas, 1980-2010 (Adaptado de Brathwaite Dick et al. 2012).

1.8.2 Dengue no Brasil

No Brasil, a reintrodução do *Aedes aegypti* em 1975, após uma intensa campanha de erradicação deste mosquito nas décadas de 40 e 50, adicionada a

epidemia de DENV-1 ocorrida na América em 1978 e a introdução do DENV-4 em 1981 pelo Caribe oriental, moldou um quadro epidemiológico favorável à introdução da Dengue no país (Schatzmayr 2008; Teixeira et al. 2009).

Em 1981-1982 ocorreu no Brasil o primeiro surto de Dengue registrado clínica e laboratorialmente, causado pelos sorotipos 1 e 4, com um total de 7.000 casos, no Estado de Roraima (Osanai et al. 1983). Em 1986, houve o isolamento do DENV-1 em soro de pacientes residentes em Nova Iguaçu, no Rio de Janeiro (Schatzmayr et al. 1986). Foram estimados mais de 1 milhão de casos por DENV-1 neste surto, desde então, a Dengue se tornou um grande problema de saúde pública no Brasil (Nogueira et al. 1991). Em Abril de 1990, após quatro anos da detecção do DENV-1, o DENV-2 foi isolado em paciente residente em Niterói, também no Rio de Janeiro, alastrando-se e causando os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira et al. 1990; Nogueira et al. 1991).

A circulação do DENV-3 foi identificada em Dezembro de 2000, no município de Nova Iguaçu, mais uma vez no Rio de Janeiro (Nogueira et al. 2001). Em 2002, foram notificados cerca de 700.000 casos, onde ocorreram 1831 casos de FHD e 91 óbitos, excedendo o somatório do número de casos graves notificados e óbitos desde a introdução da doença no país. A rápida dispersão deste sorotipo determinou a cocirculação, em 2004, dos sorotipos 1, 2 e 3 em 23 dos 27 estados brasileiros (Brasil 2009).

A introdução do sorotipo 3 gerou aspectos epidemiológicas marcantes no Brasil, com a ocorrência de FHD e óbitos em crianças e adolescentes, além de casos fatais em infecções primárias, demonstrando maior virulência do DENV-3, em relação aos sorotipos previamente introduzidos (Nogueira et al. 2005). O Brasil passou de um quadro endêmico e de baixa letalidade, para um quadro epidêmico com casos graves e fatais (Schatzmayr 2008).

Desde a introdução do vírus da dengue na década de 80, tem sido observado que ocorre a circulação predominante de um sorotipo, com revezamentos de predominância ao passar dos anos, mudança esta normalmente acompanhada de epidemias. O sorotipo 3 do vírus da dengue predominou na grande maioria dos estados do Brasil entre 2002 e 2006. No período entre 2007 e 2009, ocorreu uma alteração no sorotipo predominante, sendo o DENV-2 o mais incidente (Ministério da Saúde 2010).

Em 2008, foram notificados 555.266 casos de dengue, 4.195 casos de FHD e 229 óbitos, em epidemia causada pela reemergência do DENV-2. Em 2009, A Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, registrou 393.583 casos suspeitos de dengue. Foram confirmados 2.338 casos e 159 óbitos por FHD/SCD, e 6.376 casos de DCC, com 153 óbitos, havendo circulação do DENV-2 e reemergência do DENV-1 (Ministério da Saúde 2010, 2012).

Em 2010, durante epidemia causada predominantemente pelo DENV-1, foram notificados 1.011.548 casos de dengue no Brasil, havendo 656 casos que evoluíram a óbito por tal enfermidade. Este ano ainda foi marcado pela introdução do DENV-4 no país, pelo Estado de Roraima, após 28 anos sem detecção (Temporão et al. 2011). O ano de 2011 obteve 764.032 casos notificados e 191 óbitos, ocorrendo ainda a predominância do DENV-1, mas com a propagação do DENV-4 por praticamente todo o país (Ministério da Saúde 2011, 2012). Atualmente, o Brasil vive um contexto hiperendêmico para a Dengue, o que nos traz sérias consequências, como o aumento da diversidade genética viral, resultando numa ampla gama de propriedades patogênicas, no aumento da transmissibilidade e em maior virulência. O controle vetorial ainda é a maior forma de prevenção da Dengue, porém o país tem falhado constantemente na luta contra o *Ae. aegypti*. Desta forma, uma vacina eficaz permanece como a grande esperança de controle desta enfermidade na população brasileira (Figueiredo 2012).

1.8.3 Dengue no Rio Grande do Norte

Há 20 anos que a Dengue representa um problema de saúde pública no Estado do Rio Grande do Norte. Em 1994, foram registrados os primeiros casos de Dengue, no município de Assú, disseminando-se por todo o Estado ao longo dos anos. Recentemente, de acordo com critérios epidemiológicos e demográficos, 20 municípios do Estado possuem prioridade de monitoramento estratégico, pois registram o equivalente a 78% de todos os casos do RN, dentre eles estão: Natal, Parnamirim, Macau, Apodi, São Miguel, Currais Novos, João Câmara, Assú, Mossoró, São José de Mipibú, Ceará-Mirim, Acari, Caicó, Extremoz, São Gonçalo do Amarante, São Paulo do Potengi, Macaíba, Santa Cruz, Jardim do Seridó e Pau dos Ferros (Figura 1.14) (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2010).

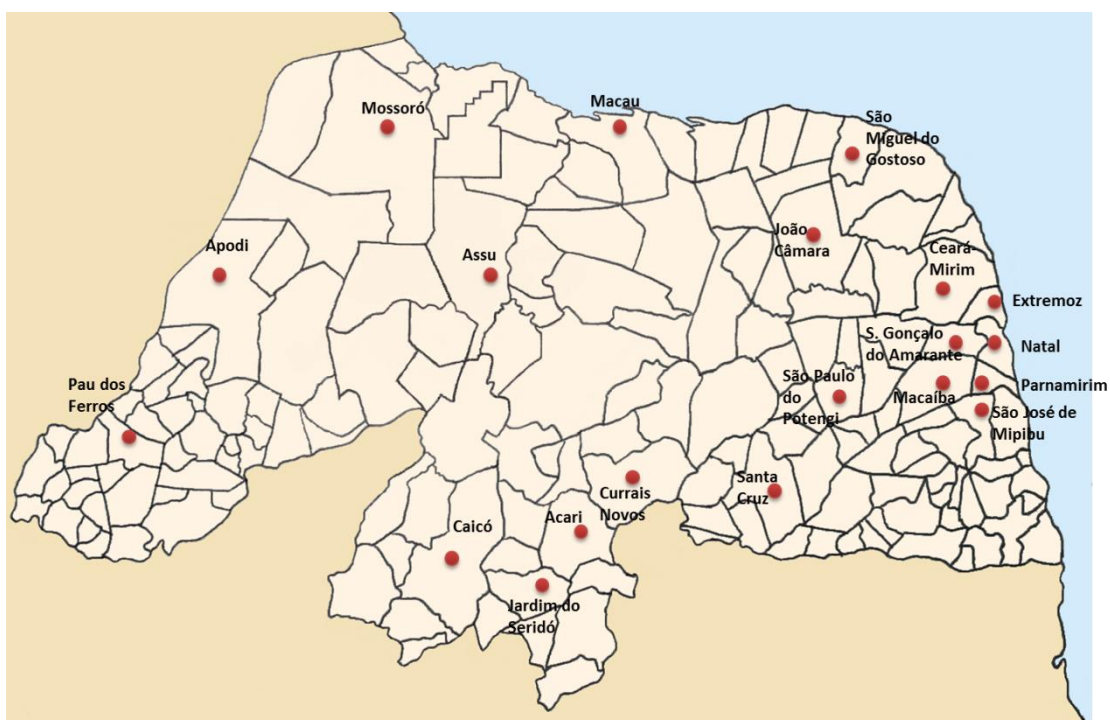


Figura 1.14 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando os 20 municípios do Estado que possuem prioridade de monitoramento estratégico.

Já foram registrados índices de infestação por *Aedes aegypti* em 99,4% dos municípios do Estado e a circulação dos quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2010). O ano de 2009 no RN foi caracterizado como um período interepidêmico, com 2528 casos notificados de dengue. Foram confirmados 28 casos de FHD, 5 óbitos e 8 casos de DCC. A letalidade por formas graves no Estado do Rio Grande do Norte foi de 13,9%. No ano de 2010, o Rio Grande do Norte obteve a notificação de 7846 casos de Dengue, com óbito em 7 casos, demonstrando aumento aproximado de 110% no número de casos notificados quando comparados a 2009. No ano de 2011 foram notificados 23.171 casos e 17 óbitos, mais que o dobro em relação ao ano anterior (Ministério da Saúde 2012) Em 2012, 26.534 casos e 11 óbitos foram registrados para Dengue (Ministério da Saúde 2013).

2. Justificativa

Apesar da grande importância da dengue no Estado do RN, poucos estudos têm sido realizados para caracterizar estas epidemias, principalmente aqueles que envolvem métodos de diagnóstico específicos para dengue, como o isolamento viral e métodos moleculares de detecção e tipagem. Estas informações são essenciais para traçar o perfil epidemiológico, compreender a atividade desses vírus e dar suporte a pesquisas relacionadas à patogênese, caracterização genética, filogenia e evolução molecular dos vírus dengue no RN. Além disso, muitas vantagens têm sido atribuídas ao diagnóstico molecular dos vírus dengue, como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e rapidez (Araújo et al. 2009b).

A vigilância virológica contínua, através do isolamento viral e de métodos moleculares específicos, é de suma importância para a Dengue. Este monitoramento é primordial não apenas para a detecção precoce da introdução de um novo sorotipo, mas também para a previsão de graves epidemias e para podermos entender as mudanças no padrão epidemiológico da doença, como mudanças na faixa etária acometida e na melhor compreensão das circunstâncias que ocasionam os casos graves da doença (Féres et al. 2006).

No contexto do desenvolvimento tecnológico, foram implantados métodos rápidos de diagnóstico dos vírus dengue, no Rio Grande do Norte. As metodologias de caracterização genética dos vírus dengue permitirão o entendimento dos padrões de dispersão da doença, substituição de genótipos, os quais poderão levar a novas epidemias, e servirão para estudos da dinâmica de transmissão.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Descrever o perfil epidemiológico dos vírus dengue no Estado do Rio Grande do Norte, no período de 2010 a 2012.

3.2 Objetivos Específicos

- Monitorar os sorotipos dos DENV circulantes no período e local estudado;
- Descrever a distribuição geográfica dos casos de Dengue no RN;
- Descrever a distribuição temporal dos casos de Dengue no RN;
- Descrever e analisar os dados demográficos dos casos estudados;
- Caracterizar geneticamente os vírus dengue circulantes, a partir do sequenciamento do gene E.

4. Materiais e Métodos

4.1 Desenho de estudo

Estudo epidemiológico observacional transversal, predominantemente descritivo, de dados primários.

4.2 Área de estudo

O Estado do Rio Grande do Norte possui área de 52.811,047 km², com uma população estimada em 3.373.959 habitantes e densidade demográfica de 63,9 hab./km² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2011). O RN possui 167 municípios, 4 mesorregiões e 19 microrregiões divididas de acordo com aspectos físicos e humanos. A região metropolitana é composta por 10 municípios: Natal, Parnamirim, Ceará-Mirim, Extremoz, Macaíba, Monte Alegre, Nísia Floresta, São Gonçalo do Amarante, São José de Mipibú e Vera Cruz. O Estado está situado na região Nordeste do Brasil, 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. Limita-se com o Estado do Ceará a Oeste, ao Sul com o Estado da Paraíba, e a Leste e ao Norte com o Oceano Atlântico (Figura 4.1).



Figura 4.1 Localização do Estado do Rio Grande do Norte.

O clima do RN pode ser dividido em tropical chuvoso, no litoral oriental e extremo oeste (precipitação anual de 800 até mais de 1.200 mm), tropical típico nas

áreas da Chapada do Apodi e das Serras de Santana, São Bernardo e Serra Negra do Norte (600-800 mm), semiárido no Vale do Açu, parte do Seridó e do Sertão Central e o litoral que vai de São Miguel do Gostoso ao município de Areia Branca (400-600 mm) e árido, nos municípios de Equador, Parelhas, Carnaúba dos Dantas, São Tomé, Lajes, Pedro Avelino, Fernando Pedrosa, Angicos e Afonso Bezerra (em torno de 400 mm) (Rio Grande do Norte 2013).

4.3 Amostras Clínicas e banco de dados

Foram estudados 1581 amostras de casos suspeitos de Dengue (323 de 2010, 658 de 2011 e 600 de 2012) com até uma semana após o início dos sinais e sintomas da doença, entre o período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012. Foram analisadas amostras de soros provenientes de pacientes com suspeita de dengue, atendidos em diferentes Centros de Saúde e Hospitais da Rede Pública do Estado do Rio Grande do Norte, aonde cada amostra vinha acompanhada de ficha de notificação compulsória de Dengue, com dados de informação pessoal e de coleta. As informações disponíveis nas fichas de identificação e os resultados de diagnóstico foram armazenados em banco de dados nos programas Microsoft Access e Microsoft Excel.

Os espécimes clínicos foram enviados para o Laboratório Central Doutor Almino Fernandes (LACEN-RN), para a realização do isolamento viral, e para o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer - LADIC (DMP/CB/UFRN), para análise molecular visando à detecção do genoma viral. As amostras foram mantidas a -70°C até o momento da utilização.

4.4 Isolamento viral

Foram inoculadas 1433 amostras de soro em tubo de culturas de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi 1978). Após inoculação, as culturas foram incubadas à temperatura de 28°C e observadas diariamente, por um período de 10 a 14 dias.

Foi utilizado o meio L-15 (Leibovitz)(Tabela 4.1) modificado com 0,29 g/l de L-Glutamina, triptose fosfato (10%) e antibiótico-antimicótico (1%)(Tabela 4.2), adquirido sob forma desidratada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Tabela 4.1 Meio L-15 para cultivo celular de células C6/36 de *Ae.albopictus*

Reagente	Peso/Vol
Leibovitz 15	14,69 g
Água tridestilada q.s.p.	1000 ml

Tabela 4.2 Antibióticos utilizados no meio de cultura L-15 para cultivo celular de células C6/36 de *Ae.albopictus*

Reagente	Peso/Vol
Penicilina Sódica Cristalina (Gibco BRL, USA)	100 U/ml
Sulfato de estreptomicina (Gibco BRL, USA)	1mg/ml

O meio foi filtrado em membrana Milipore (0,22 μ) e após prova de esterilidade, conservado a 4^oC. A este meio foi adicionado soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) nas concentrações de 2% ou 10%, conforme utilizado para manutenção ou crescimento celular, respectivamente.

As células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16 cm contendo 2,0 ml de meio L-15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), com 10% SFB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Após formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB.

Os soros diluídos 1/10 em meio L-15 foram inoculados em alíquotas de 0,1ml na monocamada celular. Para cada grupo de espécimes inoculados, foram incluídos controles de vírus e controle de células. Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28^oC e observados diariamente, por um período de até 14 dias, em microscópio óptico invertido com aumento de até 400 vezes, para a verificação de ECP.

4.5 Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

As culturas, mesmo não apresentando ECP, foram inicialmente testadas com fluido hiperimune de camundongo para dengue. Posteriormente, confirmada a

positividade da amostra, foi feita a tipagem viral, empregando-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV, sendo visualizados pela técnica de imunofluorescência Indireta (IFI) (Gubler et al. 1984; Henchal et al. 1982).

Após agitação, os tubos de células inoculados foram mantidos a 4°C por no mínimo 2 horas para sedimentação das células. Aproximadamente 1ml do fluido de cada cultura foi retirado e as células ressuspensas no meio restante.

Para a detecção viral, cerca de 0,02 ml de suspensão celular de cada cultura foi depositada sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26 x 76mm (Biolab Merieux, New Zealand). Após secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) a -20°C durante 20 minutos. Controles de células infectadas e não infectadas foram incluídos em cada grupo de lâminas processadas.

Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado em cada orifício da lâmina 0,02 ml de fluido ascítico hiperimune de camundongo inoculado com amostra, Research Reference Reagent, Bethesda, USA, do inglês "mouse immune ascitic fluid" (MIAF), diluído 1:50 em PBS (Tampão Salina Fosfato, do inglês: *Phosphate Buffer Saline*) pH 7,5. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 0,02 ml de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Antibodies Incorporated, Davis, USA.), diluído 1:20 em preto de naftaleno a 0,1% e incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos, as lâminas foram rinsadas com água destilada, colocadas à temperatura ambiente para secagem e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 60mm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Para tipagem viral, foi preparada uma lâmina para cada amostra, depositando cerca de 0,02 ml de suspensão celular em seis orifícios da lâmina. As lâminas foram colocadas à temperatura ambiente para secagem e após 18 horas fixadas com acetona a -20°C durante 20 minutos.

Em cada orifício, foram adicionados 0,02 ml de anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1 (15F3), DENV-2 (3H5), DENV-3 (5D4) e DENV-4

(1H10) (Henchal et al. 1982), diluídos 1:5 (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e 1:20 (DENV-2) em PBS pH 7,5. Em cada lâmina, foram incluídos um controle positivo (Policlonal (DENV 1+2+3+4+F.A) diluído 1:50 em PBS pH 7,5) e um controle negativo (PBS pH 7,5).

Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e colocadas à temperatura ambiente para secagem. A seguir, foram adicionados 0,025 ml de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) diluída 1:20 em preto de naftaleno 0,1% em PBS pH 7,5. Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos, rinsadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 50mm).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss, Alemanha), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50W e jogo de filtro convencional (FT 510 / LP 520).

4.6 RT-PCR (Lanciotti et al. 1992)

4.6.1 Extração do RNA viral

Os RNAs das amostras de soro de pacientes foram extraídos através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, para a realização da técnica de RT-PCR.

4.6.2 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir de amostras de soro ou sangue total. Um total de 804 amostras foram submetidas a este método. Este procedimento consegue detectar os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos (pb) para cada sorotipo dos DENV.

A técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, foram utilizados iniciadores consensuais, 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*, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente, além do iniciador D1 (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV.

Oligonucleotídeo iniciador (Sentido do primer)	Seqüência	Posição No genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG-	134-161	511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-	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'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-	506-527	392 (D1 + TS4)

Na 1ª etapa (transcrição reversa seguida de PCR) foi realizado o seguinte procedimento: em tubo tipo eppendorf® de 0,3ml, 2,5µl do RNA extraído foram adicionados a 8 µl de água livre de nucleases, 0,75 µl dos iniciadores D1 e D2, em concentração de 100µM, 0,5µl da enzima AMV-RT à 5U/µl e 12,5µl do PCR Acessquick Master Mix (2x) (Promega, Madison, EUA), totalizando 25µl da mistura RT-PCR (Tabela 4.4). Os tubos foram colocados imediatamente no bloco aquecido do termociclador. Após a transcrição reversa (45°C por 45 minutos), a enzima foi ativada (95°C por 2 minutos) e 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 um tempo de extensão final (72°C por 10 minutos).

Para a realização da etapa *semi-nested* PCR, os produtos obtidos da 1ª etapa foram diluídos 1:100 em água deionizada (IDT, Iowa, USA) (2,5µl do produto da 1ª etapa + 247,5µl de água). Em novos tubos tipo eppendorf® de 0,3mL, foram adicionados 6,25µl de água livre de nucleases, 0,75µl dos iniciadores D1, TS1, TS2, TS3 e TS4 (100µM), 12,5µl do PCR Acessquick Master Mix (2x) (Promega, Madison, EUA) e 2,5µl da amostra diluída (Tabela 4.4). As amostras foram submetidas a ativação da enzima (95°C por 2 minutos) e em seguida, 18 ciclos de desnaturação

(94°C por 35 segundos), hibridização (56°C por 1 minuto), extensão (72°C por 2 minutos) e um tempo de extensão final (72°C por 10 minutos).

Tabela 4.4 Reagentes utilizados na Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).

Reagentes	Mistura para RT-PCR (1X)	Mistura para Semi-nested (1X)
Água livre de nucleases	8 µl	6,25 µl
100µM iniciador D1	0,75 µl	0,75 µl
100µM iniciador D2	0,75µl	-----
100µM iniciadores TS1-4	-----	0,75µl
5 U/µl enzima AMV-RT	0,5µl	-----
PCR Master Mix 2X	12,5 µl	12,5 µl
RNA	2,5µl	-----
cDNA da RT-PCR	-----	2,5µl

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese à 100V por 60 minutos onde 5µl do produto amplificado acrescido de 2,5µl de azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA) e 2,5µl de GelRed® foram aplicados em um gel de agarose (BioAmerica, Inc., Miami, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5X, acrescido de brometo de etídio 0,1% (Invitrogen), em seguida foi visualizado em luz ultravioleta.

4.7 Sequenciamento e Análise Filogenética

4.7.1 Construção do Banco de Sequências Nucleotídicas

Foram coletadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sequencias completas do gene do envelope (E) dos DENV-1, DENV-2, e DENV-4 (com vistas a estabelecer relações filogenéticas entre os DENV aqui estudados e os DENV isolados em outras localidades ou países). Cada uma das cepas foi identificada pelo local (utilizando a sigla de duas letras dos países, disponível em <http://www.inf.ufrgs.br/~cabral/Paises.html>), ano de isolamento e número de acesso ao GenBank. Sequências previamente identificadas como recombinantes (Worobey et al. 1999) foram excluídas, utilizando os mesmos critérios adotados por Twiddy et al. (2003).

4.7.2 Sequenciamento do Genoma viral

Foi utilizado o sequenciador automático da Applied Biosystem ABI-3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA) da plataforma genômica de sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz. Para caracterização genética dos DENV, foi realizada a estratégia de *primer walking*. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar fragmentos de aproximadamente 900 pb por região, com aproximadamente 200 pb de sobreposição entre regiões. A região que codifica o gene do envelope foi o alvo do estudo. Esta região é descrita como informativa para estudos de filogenia e evolução (Araújo 2009; Lanciotti et al. 1994).

4.7.2.1 Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores para DENV-1 (Tabela 4.5) e DENV-2 (Tabela 4.6) utilizados neste procedimento foram desenhados e avaliados durante a tese de doutorado de Araújo (2009). Para o DENV-4 (Tabela 4.7), iniciadores foram desenhados especificamente para este trabalho. Também foram desenhados *primers* internos específicos para regiões não sequenciadas do DENV-2 (Tabela 4.8).

Tabela 4.5 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-1.

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

Tabela 4.6 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-2.

Região	Primer sense A (5'-3')	Primer antisense B (5'-3')	Posição genoma (de acordo com AF489932)	do	Produto (pb)	Tm (°C) A/B
1	CGT GGA CCG ACA AAG ACA GA	GGA GCG ACG GCT GTC AGT AA	14 - 906		892	62/64
2	GAT CAG TGG CAC TCG TTC CA	CTC CGC GTA GCC ATG GTA AC	708 - 1586		878	62/62
3	ATG GCA CTG TCA CGA TGG AG	CAC TAT CAG CCT GCA CCA TAG CT	1467 - 2405		938	62/63
4	GGA TCC CTG GGA GGA GTG TT	TCC ATT GCT CCA GAG GGT GT	2202 - 3106		904	63/63
5	GAC TCA AAA CTC ATG TCA GCG G	GTC CTT TGG GAA AGG AGT GC	2958 - 3800		842	62/62

Tabela 4.7 Oligonucleotídeos iniciadores para sequenciamento do gene do envelope dos DENV-4.

Região	Primer sense A (5'-3')	Primer antisense B (5'-3')	Posição genoma (de acordo com JN559741.2)	do	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

Tabela 4.8 Oligonucleotídeos iniciadores internos específicos para DENV- 2

Região	Primer sense (A)	Primer anti-sense (B)	Tm (°C) A/B
1(I)	GGG AAC CCA GTC TAA ATG AAG	GAC ATC TGG ATT TCT GTA GCC	62
2(I)	CGC CTG ATT ACA GTT AAC CCA	TTT GAA GGG GAT TCT GGT TGG	62

4.7.2.2 RT-PCR para Sequenciamento

Em um tubo tipo eppendorf[®] adicionamos 14µl de água livre de nucleases (Promega, Madison, EUA), 2,5µl (10µl) do iniciador *sense* (Invitrogen, EUA), 2,5µl (10µl) do iniciador *antisense* (Invitrogen, EUA), 1µl da enzima AMV-RT (Promega, Madison, EUA) e 25µl do Acessquick Master Mix (2x) (Promega, Madison, EUA). Em seguida foi adicionado 5µl do RNA extraído e o tubo foi submetido à agitação.

O RNA extraído foi reversamente transcrito a 45°C por 60 min., ativação da enzima a 95°C por 2 min., diretamente seguidos de 30 ciclos de desnaturação

94°C por 30 seg., 54°-62°C por 1 min. (dependendo do par de iniciadores utilizado) e 72°C por 2 min., com uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação foi realizada utilizando termociclador modelo 22331 (Eppendorf AG, Hamburg, GER).

Após o término da RT-PCR, analisamos os produtos amplificados por eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Inc., Miami, USA – cat nº D1500 – LE) a 1% em TBE 0,5X, por 60 minutos a 100V.

Quando foram observados amplicons únicos na eletroforese em gel de agarose, a purificação foi feita diretamente do produto da PCR usando o kit comercial *PCR Purification* (Qiagen, Inc., Valencia, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Havendo a presença de múltiplos amplicons, o produto foi isolado e purificado utilizando o kit comercial *Gel Extraction* (Qiagen, inc., Valencia, CA) conforme protocolo descrito pelo manual do fabricante.

4.7.2.3 Quantificação do DNA e reação de sequenciamento

A partir do produto da purificação, realizamos uma eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0,5X com objetivo de quantificar o DNA presente em cada amostra. Aplicamos 4 µl de peso molecular de Massa (Invitrogen, Carlsbad, CA) no primeiro orifício do gel e 4 µl do DNA a ser quantificado nos demais orifícios, juntamente com 2µl de GelRed® e 2µl de sacarose. O procedimento teve duração de 60 minutos a 100v. A concentração foi estimada de acordo com os parâmetros de comparação entre o DNA a ser quantificado e o “*low mass DNA*”, conforme bula apresentada pelo fabricante. (Tabela 4.9).

Tabela 4.9 Valores de referência para comparação do amplicon obtido com peso molecular de massa para determinação da quantidade ideal de DNA a ser aplicada na reação de sequenciamento

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

Os fragmentos de cDNA, amplificados por RT-PCR, foram submetidos a reação de sequenciamento (*cycle sequencing*), de ambos os sentidos das amostras. Em um microtubo, adicionamos 2µl do *primer* específico (*sense ou anti-sense*), 2µl de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA), a quantidade de cDNA determinada pelo processo de quantificação e completamos o volume com água livre de nucleases até atingir o volume final de 10µl.

A solução foi submetida aos seguintes parâmetros de termociclagem: 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de 2 minutos com a temperatura de hibridização específica do *primer* utilizado e 30 ciclos de 3 minutos a 72°C. A amplificação foi realizada utilizando termociclador modelo 22331 (Eppendorf AG, Hamburg, GER).

4.7.2.4 Purificação do DNA para remoção de Dye Terminators e processamento da amostra

O DNA foi purificado e precipitado utilizando colunas “Centri-Sep” (Princeton Separations, Inc, Adelphia, NJ), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida o DNA foi seco a 37°C, por 18 horas. O sedimento foi ressuspensão em 10 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA) e aplicado em placa de 96 orifícios para ser colocado no sequenciador Applied Biosystems ABI-3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.7.3 Análise de Sequências

A análise dos produtos da reação de sequenciamento foi realizada utilizando o Programa Chromas Lite versão 2.1 (Technelysium Pty Ltd). A identidade da sequência foi determinada pelo uso do BLAST (Altschul et al. 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>).

Para alinhamento e edição de sequências, foram utilizados os programas CLUSTAL W (Larkin et al. 2007) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa MEGA versão 5 (Tamura et al. 2011). Foi estipulado um *bootstrap* de 1000 pseudoréplicas, utilizou-se o método Neighbor-Joining, modelo Tamura-Nei (<http://www.megasoftware.net/>).

4.8 Análises Estatísticas

Os programas Microsoft Excel e GraphPad Prism[®] 6 foram utilizados para a configuração de gráficos, tabelas e análises estatísticas. Foram realizados testes de Qui-quadrado para avaliar a dispersão de variáveis de escala nominal. O teste t de *student* foi utilizado para a comparação de duas médias. A análise de variância (*One-way Anova*, teste F) foi utilizada para a avaliação de três médias e o teste de Tukey foi utilizado para a comparação, entre si, destas três médias.

4.9 Considerações éticas

Para a realização deste estudo, este projeto 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 Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

Foram estudados 1581 casos pela metodologia de isolamento viral e/ou RT-PCR para detecção e tipagem viral, provenientes do período compreendido entre Janeiro de 2010 e Dezembro de 2012. A infecção foi confirmada através do isolamento viral em 27,01% (387/1433) dos casos, enquanto a RT-PCR confirmou 24,13% (194/804) dos casos estudados, a junção das duas metodologias confirmou 30,23% dos casos em análise (478/1581) (Tabela 5.1). Ao estratificarmos os anos, em 2010, evidenciamos um percentual de detecção de 17,84% (48/269) para a RT-PCR e 15,34% (27/176) para o isolamento viral. Em 2011, o percentual é de 39,57% para a RT-PCR e 34,80% para o isolamento viral. No ano de 2012, obtivemos 18,03% (55/305) para a RT-PCR e 21,87% (131/599) para o isolamento viral (Tabela 5.2). Este estudo detectou a circulação de todos os quatro sorotipos do vírus Dengue no Rio Grande do Norte (Figura 5.1), havendo a circulação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em 2010, já em 2011 ocorreu a circulação do DENV-1, DENV-2 e a introdução do DENV-4, no mês de Maio. Em 2012 foi detectada apenas a circulação do DENV-4 (Figura 5.2).

Tabela 5.1 Metodologias utilizadas para diagnóstico da Dengue, no período de 2010 a 2012.

	ISOLAMENTO VIRAL			Total
	Positivo	Negativo	Não realizado	
RT-PCR				
Positivo	103	72	19	194
Negativo	48	433	129	610
Não Realizado	236	541	0	777
Total	387	1046	148	1581

Tabela 5.2 Percentual de detecção dos DENV, por metodologia e ano estudado.

Diagnóstico/Ano	2010	2011	2012	2010-2012
RT-PCR (Positivos/Analisados)	17,84% (48/269)	39,57% (91/230)	18,03% (55/305)	24,13% (194/804)
Isolamento viral (Positivos/Analisados)	15,34% (27/176)	34,80% (229/658)	21,87% (131/599)	27,01% (387/1433)

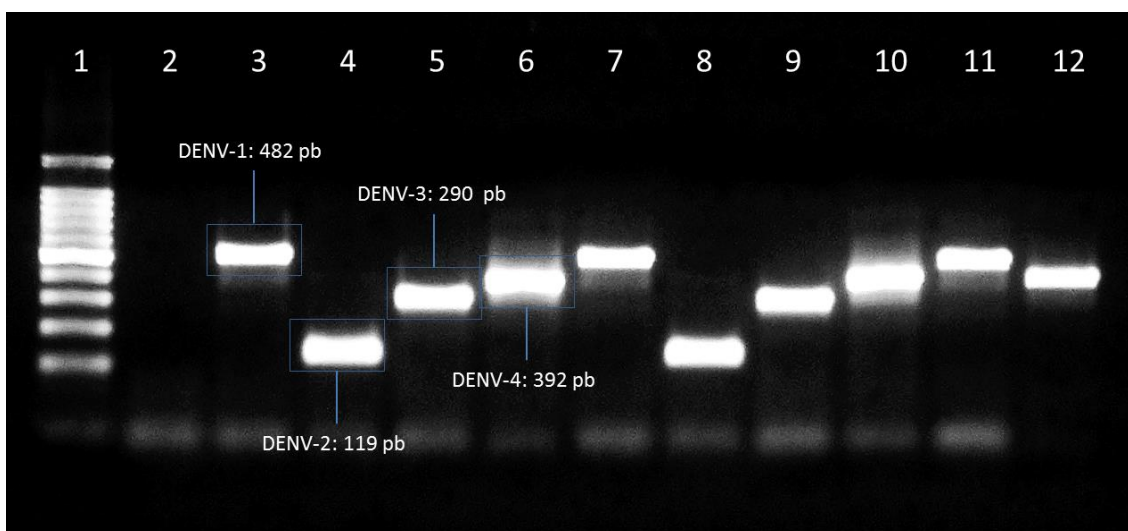


Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose a 1%. Visualização dos produtos amplificados pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para tipagem dos DENV. Linha 1: Marcador de PM de 100pb (Promega); Linha 2: Controle Negativo; Linhas 3: Controle positivo para DENV-1; Linha 4: Controle positivo para DENV-2; Linha 5: Controle positivo para DENV-3; Linhas 6: Controle positivo para DENV-4; Linha 7: Amostra positiva para DENV-1; Linha 8: Amostra positiva para DENV-2; Linha 9: Amostra positiva para DENV-3; Linha 10: Amostra positiva para DENV-4; Linha 11: Amostra positiva para DENV-1; Linha 12: Amostra positiva para DENV-4.

O sorotipo predominante em 2010 foi o DENV-2, representando 53,33% (40/75) dos casos positivos, seguido do DENV-1 com 45,33% (34/75) e do DENV-3 com 1,33% (1/75). Em 2011, a predominância foi do DENV-1 com 75,49% (191/253) dos casos positivos, enquanto o DENV-2 representou 20,55% (52/253) e o DENV-4 foi identificado em 3,95% (10/253) dos casos confirmados. Já no ano de 2012, apenas o DENV-4 foi detectado, representando 100% (150/150) dos casos positivos (Figura 5.2).

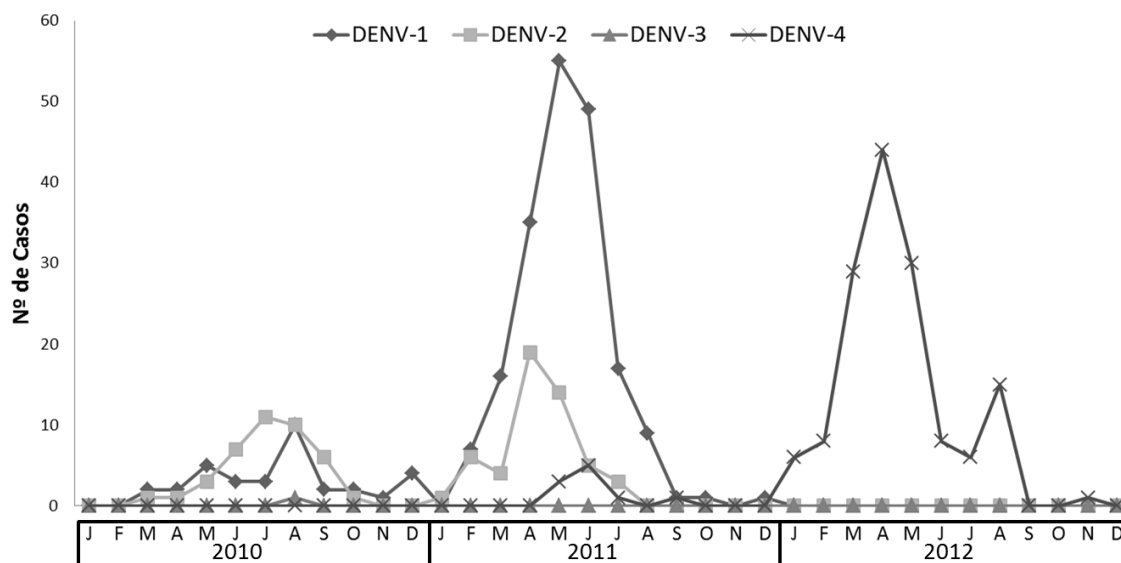


Figura 5.2 Distribuição de Sorotipos detectados por mês, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2012.

5.2 Distribuição geográfica dos casos de Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

Em 2010, a presença do vírus da Dengue foi evidenciada em 17 dos 167 municípios do Rio Grande do Norte. Todas as quatro mesorregiões do Estado obtiveram pelo menos um município com caso confirmado da doença. O maior número de casos ocorreu nos municípios de Natal, Parnamirim, Pau dos Ferros, Guamaré, Jardim do Seridó e Santana dos Matos. A cocirculação do DENV-1 e DENV-2 ocorreu apenas nos municípios de Natal, Guamaré e Caicó, já em Parnamirim ocorreu a cocirculação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Figura 5.3).

No ano seguinte, ocorreu uma maior distribuição dos vírus Dengue no Estado, passando a atingir 25 municípios. Natal continuou sendo o município mais afetado, seguido de Parnamirim, Santa Cruz e Santo Antônio. No município de Santa Cruz, foi confirmado o primeiro caso de Dengue pelo Sorotipo 4 no Estado, sendo posteriormente detectado em Natal, ainda no mesmo ano (Figura 5.4).

No ano de 2012 foi verificada enorme dispersão do DENV-4 no Estado, sendo confirmado em 32 municípios, além de ser o único sorotipo com circulação detectada no referido ano. Mais uma vez, Natal obteve o maior número de casos, seguido de Parnamirim, Taipu, João Câmara, Guamaré, Santo Antônio e Jardim do Seridó (Figura 5.5).

No período acumulado entre os anos de 2010 a 2012, podemos verificar que 50 municípios tiveram confirmação para o vírus da Dengue e que 73,85% dos casos confirmados ocorreram em apenas 7 municípios do Estado, são eles: Natal, Parnamirim, Santo Antônio, João Câmara, Guararé, Jardim do Seridó e Caicó. Cabe ainda destacar que Natal, a capital do Estado, representou 53,97% dos casos confirmados de 2010 a 2012, além de ter registrado a cocirculação do DENV-1, DENV-2 e DENV-4, demonstrando papel fundamental na manutenção e dispersão da Dengue no Rio Grande do Norte (Tabela 5.3).

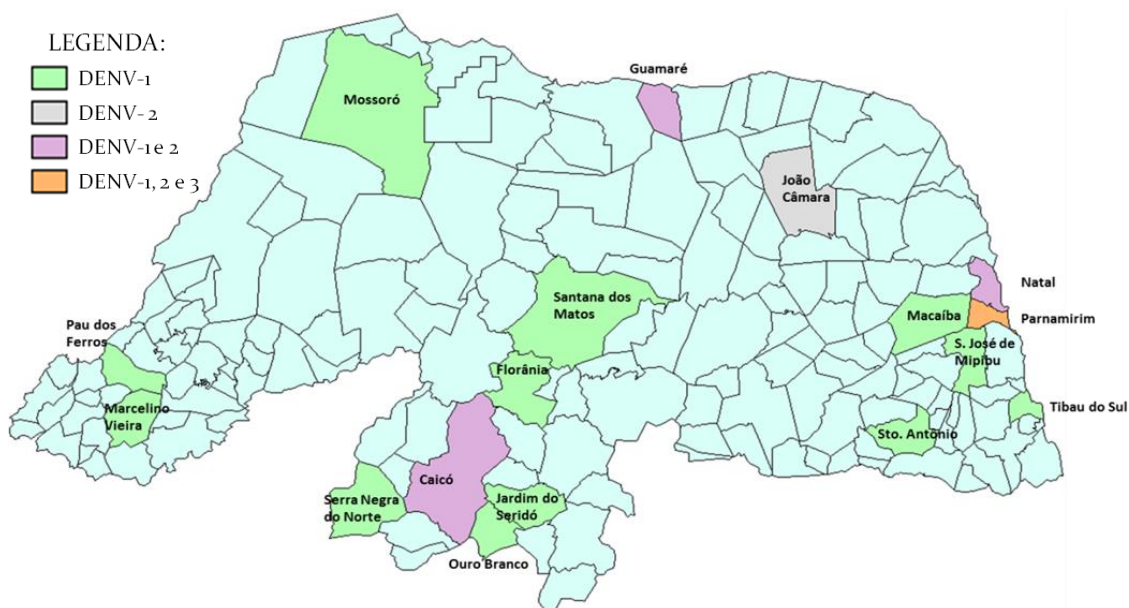


Figura 5.3 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2010.

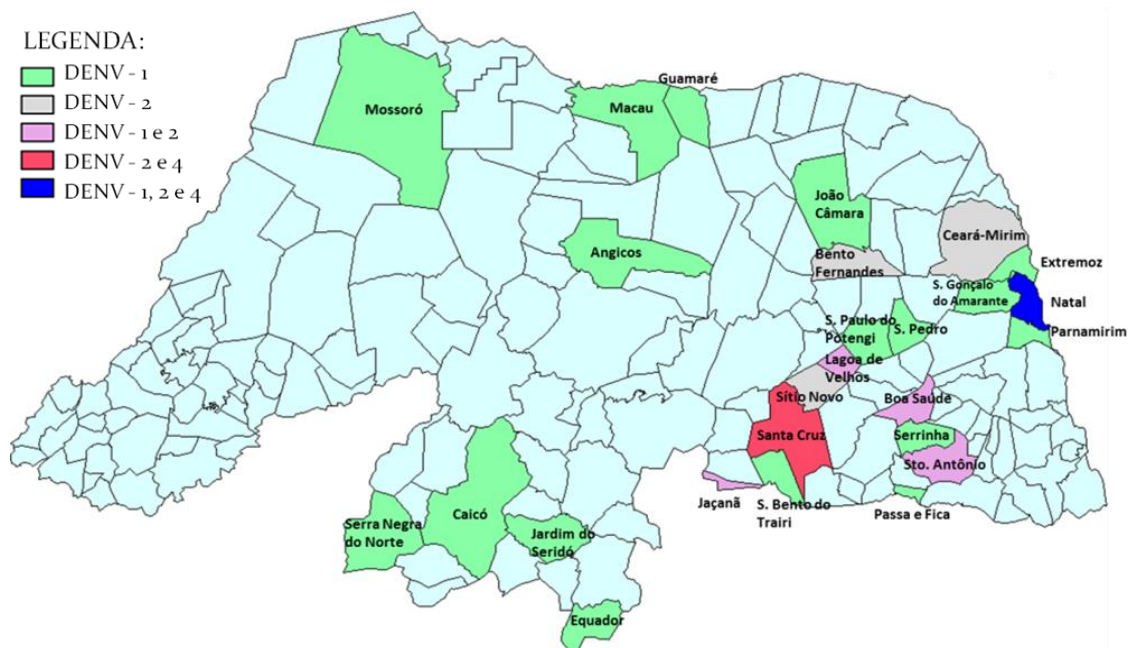


Figura 5.4 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2011.

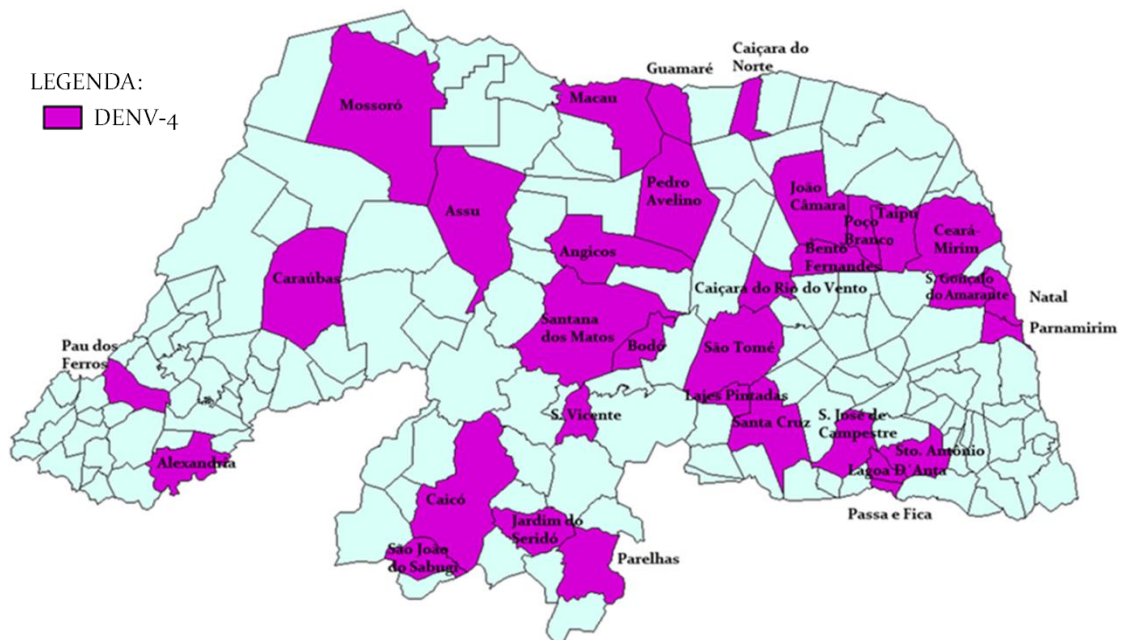


Figura 5.5 Mapa do Rio Grande do Norte, demonstrando a circulação de sorotipos por município, em 2012.

Tabela 5.3 Descrição por município de número de casos positivos, percentual de positividade e sorotipos circulantes, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2012.

Municípios	2010			2011			2012			2010-2012		
	Positivos	%	Sorotipos	Positivos	%	Sorotipos	Positivos	%	Sorotipos	Positivos	%	Sorotipos
Natal	40	53,33%	6 DENV-1, 34 DENV-2	191	75,49%	152 DENV-1, 37 DENV-2, 2 DENV-4	27	18,00%	27 DENV-4	258	53,97%	158 DENV-1, 71 DENV-2, 29 DENV-4
Parnamirim	5	6,67%	2 DENV-1, 2 DENV-2 e 1 DENV-3	9	3,56%	7 DENV-1, 2 DENV-2	17	11,33%	17 DENV-4	31	6,49%	9 DENV-1, 4 DENV-2 e 1 DENV-3 e 17 DENV-4
Guamaré	4	5,33%	1 DENV-1, 3 DENV-2	2	0,79%	2 DENV-1	8	5,33%	8 DENV-4	14	2,93%	3 DENV-1, 3 DENV-2, 8 DENV-4
Santo Antônio	1	1,33%	1 DENV-1	6	2,37%	1 DENV-1, 5 DENV-2	7	4,67%	7 DENV-4	14	2,93%	2 DENV-1, 5 DENV-2 e 7 DENV-4
Jardim do Seridó	4	5,33%	4 DENV-1	1	0,40%	1 DENV-1	7	4,67%	7 DENV-4	12	2,51%	5 DENV-1, 7 DENV-4
João Câmara	1	1,33%	1 DENV-2	2	0,79%	1 DENV-1, 1 DENV-2	9	6,00%	9 DENV-4	12	2,51%	1 DENV-1, 1 DENV-2, 9 DENV-4
Taipu							12	8,00%	12 DENV-4	12	2,51%	12 DENV-4
Caicó	2	2,67%	1 DENV-1, 1 DENV-2	2	0,79%	2 DENV-1	6	4,00%	6 DENV-4	10	2,09%	3 DENV-1, 1 DENV-2 e 6 DENV-4
Santa Cruz				9	3,56%	1 DENV-2, 8 DENV-4	1	0,67%	1 DENV-4	10	2,09%	1 DENV-2, 9 DENV-4
Mossoró	1	1,33%	1 DENV-1	4	1,58%	4 DENV-1	4	2,67%	4 DENV-4	9	1,88%	5 DENV-1, 4 DENV-4
Angicos				1	0,40%	1 DENV-1	7	4,67%	7 DENV-4	8	1,67%	1 DENV-1, 3 DENV-4
Passa e Fica				1	0,40%	1 DENV-1	6	4,00%	6 DENV-4	7	1,46%	1 DENV-1 e 6 DENV-4
Pau dos Ferros	5	6,67%	5 DENV-1				1	0,67%	1 DENV-4	6	1,26%	5 DENV-1 e 1 DENV-4
Caçara do Norte							5	3,33%	5 DENV-4	5	1,05%	5 DENV-4
Equador				5	1,98%	5 DENV-1				5	1,05%	5 DENV-1
Lagoa de Velhos				4	1,58%	3 DENV-1, 1 DENV-2				4	0,84%	3 DENV-1, 1 DENV-2
Pedro Avelino							4	2,67%	4 DENV-4	4	0,84%	4 DENV-4
Santana do Matos	3	4,00%	3 DENV-1				1	0,67%	1 DENV-4	4	0,84%	3 DENV-1 e 1 DENV-4
Alexandria							3	2,00%	3 DENV-4	3	0,63%	3 DENV-4
Caçara do Rio Do Vento							3	2,00%	3 DENV-4	3	0,63%	3 DENV-4
Ceará-Mirim				1	0,40%	1 DENV-2	2	1,33%	2 DENV-4	3	0,63%	1 DENV-2, 2 DENV-4
Lagoa D'Anta							3	2,00%	3 DENV-4	3	0,63%	3 DENV-4
Macau				1	0,40%	1 DENV-1	2	1,33%	2 DENV-4	3	0,63%	1 DENV-1 e 2 DENV-4
Assu							2	1,33%	2 DENV-4	2	0,42%	2 DENV-4
Bento Fernandes				1	0,40%	1 DENV-2	1	0,67%	1 DENV-4	2	0,42%	1 DENV-2, 1 DENV-4
Boa Saúde				2	0,79%	1 DENV-1, 1 DENV-2				2	0,42%	1 DENV-1, 1 DENV-2
Macaíba	2	2,67%	2 DENV-1							2	0,42%	2 DENV-1
Ouro Branco	2	2,67%	2 DENV-1							2	0,42%	2 DENV-1
Parelhas							2	1,33%	2 DENV-4	2	0,42%	2 DENV-4
São Gonçalo do Amarante				1	0,40%	1 DENV-1	1	0,67%	1 DENV-4	2	0,42%	1 DENV-1 e 1 DENV-4
São Paulo do Potengi				2	0,79%	2 DENV-1				2	0,42%	2 DENV-1
São Pedro				2	0,79%	2 DENV-1				2	0,42%	2 DENV-1
São Vicente							2	1,33%	2 DENV-4	2	0,42%	2 DENV-4
Serra Negra do Norte	1	1,33%	1 DENV-1	1	0,40%	1 DENV-1				2	0,42%	2 DENV-1
Bodó							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
Caraúbas							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
Extremoz				1	0,40%	1 DENV-1				1	0,21%	1 DENV-1
Florânia	1	1,33%	1 DENV-1							1	0,21%	1 DENV-1
Jaçanã				1	0,40%	1 DENV-1				1	0,21%	1 DENV-1
Lajes Pintadas							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
Marcelino Vieira	1	1,33%	1 DENV-1							1	0,21%	1 DENV-1
Poço Branco							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
São Bento do Trairi				1	0,40%	1 DENV-1				1	0,21%	1 DENV-1
São João do Sabugi							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
São José de Campestre							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
São José de Mipibu	1	1,33%	1 DENV-1							1	0,21%	1 DENV-1
São Tomé							1	0,67%	1 DENV-4	1	0,21%	1 DENV-4
Serrinha				1	0,40%	1 DENV-1				1	0,21%	1 DENV-1
Sítio Novo				1	0,40%	1 DENV-2				1	0,21%	1 DENV-2
Tibau do Sul	1	1,33%	1 DENV-1							1	0,21%	1 DENV-1
Total	75	100,00%	34 DENV-1, 40 DENV-2, 1 DENV-3	253	100,00%	191 DENV-1, 52 DENV-2, 10 DENV-4	150	100,00%	150 DENV-4	478	100,00%	225 DENV-1, 92 DENV-2, 1 DENV-3, 160 DENV-4

5.3 Distribuição temporal dos casos de Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

Considerando os três anos estudados, os meses com maior incidência foram Abril e Maio, representando 21,12% (101/478) e 23,01% (110/478) dos casos confirmados, respectivamente, diferindo significativamente dos outros meses (X^2 : 61,13; gl= 11; $p < 0,001$) (Figura 5.6). No ano de 2010 pode-se verificar um aumento no número de casos desde o início do ano estendendo-se a Agosto, onde ocorre um pico, havendo uma queda drástica em Setembro. Em 2011 verificamos um aumento no número de casos até o mês de Maio, caindo gradativamente nos meses seguintes. Já em 2012, o pico ocorre no mês de Abril e também decai gradativamente nos meses seguintes (Tabela 5.4) (Figura 5.7).

Tabela 5.4 Distribuição mensal dos casos estudados por isolamento viral e RT-PCR durante o período 2010 -2012, no Estado do Rio Grande do Norte.

<i>Mês</i>	<i>Isolamento viral</i>			<i>RT-PCR</i>		
	<i>Ano</i>					
	<i>Positivo/Total testados (Sorotipo)</i>					
	<i>2010</i>	<i>2011</i>	<i>2012</i>	<i>2010</i>	<i>2011</i>	<i>2012</i>
Janeiro	0/2	1/8(1)	5/30(4)	0/1	0/0	5/27(4)
Fevereiro	0/0	13/53(1;2)	8/56(4)	0/0	0/0	5/56(4)
Março	3/13(1;2)	20/91(1;2)	27/90(4)	0/10	0/2	4/63(4)
Abril	3/13(1;2)	53/152(1;2)	35/170(4)	0/8	1/3(2)	21/82(4)
Maio	4/23(1;2)	64/148(1;2;4)	27/117(4)	4/20(1;2)	35/57(1;2;4)	11/38(4)
Junho	4/30(1;2)	53/106(1;2;4)	7/43(4)	6/21(1;2)	28/70(1;2;4)	2/15(4)
Julho	3/33(2)	14/44(1;2;4)	5/28(4)	11/65(1;2)	19/43(1;2;4)	2/11(4)
Agosto	4/23(1)	8/30(1)	14/38(4)	17/42(1;2;3)	4/30(1)	4/7(4)
Setembro	2/11(2)	1/11(1)	0/5	6/35(1;2)	2/11(1;4)	0/0
Outubro	0/7	1/2(1)	0/3	3/37(1;2)	1/2(1)	0/0
Novembro	1/8(2)	0/4	1/4(4)	0/23	0/4	0/0
Dezembro	3/9(1)	1/7(1)	0/1	1/5(1)	1/7(1)	0/2
Não inf.	0/4	0/5	2/14(4)	0/2	0/1	1/4(4)
Total	27/176	229/658	131/599	48/269	91/230	55/305

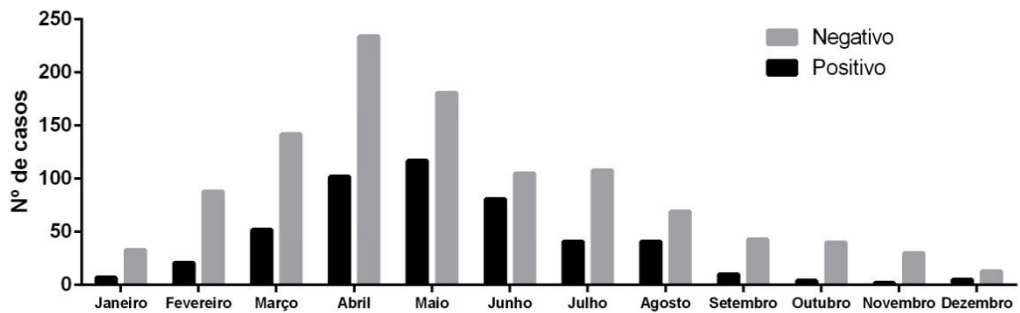


Figura 5.6 Distribuição mensal acumulada dos casos estudados por isolamento viral e/ou RT-PCR, durante o período 2010 - 2012, no Estado do Rio Grande do Norte.

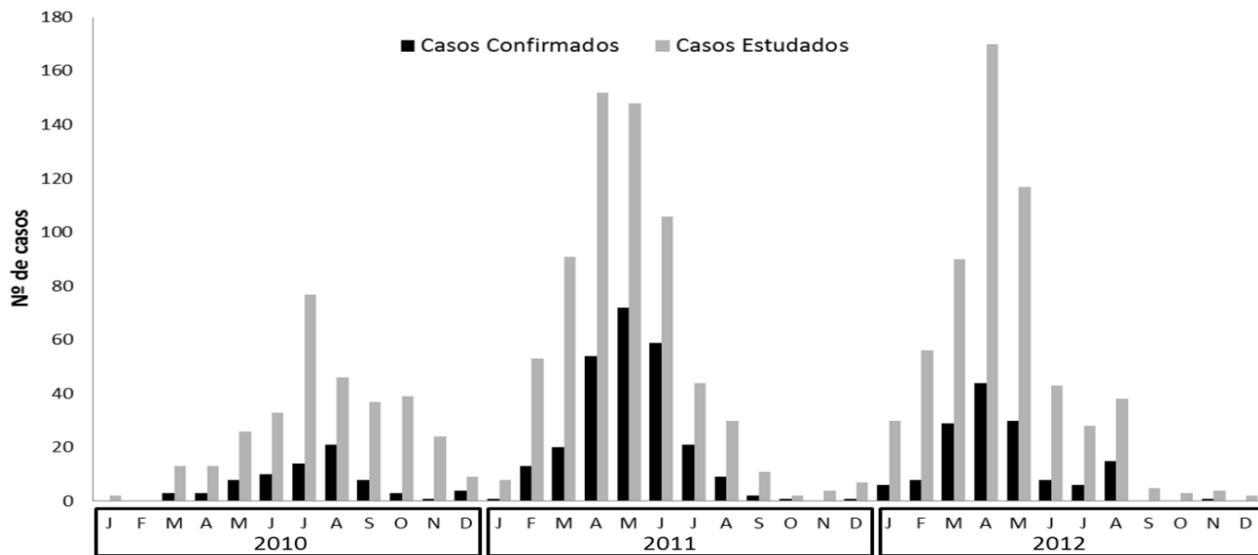


Figura 5.7 Distribuição mensal de casos estudados e confirmados para Dengue, nos anos 2010-2012

5.4 Dados demográficos dos casos estudados

5.4.1 Faixa Etária

No período acumulado de 2010 a 2012, a faixa etária com maior número de casos confirmados foi a de 0-10 anos com 38,08% (182/478), sendo a faixa de 11-20 anos a segunda mais afetada com 23,85% (114/478) dos casos (Tabela 5.5), porém, não houve diferença significativa entre as faixas etárias ao analisarmos o período acumulado de três anos ($X^2=8,539$; $gl=6$; $p= 0,2012$) (Figura 5.8). Em 2010, a faixa etária de 0-10 anos representou 42,67% (32/75) dos casos positivos, mas apesar do número elevado de casos confirmados nesta faixa etária, a diferença não foi significativa quando comparada aos outros estratos ($X^2=3,387$; $gl=6$; $p= 0,7589$) (Figura 5.9). No ano de 2011, a maioria dos casos também se concentrou na faixa etária de 0-10 anos, com 54,15% (137/253) dos casos positivos para o referido ano, mas como em 2010, a diferença entre as proporções não foi significativa ($X^2=7,317$; $gl=6$; $p= 0,2926$) (Figura 5.10). Entretanto, quando analisamos apenas o ano de 2012 podemos ver diferenças quanto à faixa etária predominante. A faixa etária de 11 a 30 anos obteve 51,33% (77/150) dos casos positivos, demonstrando uma diferença significativa na distribuição de casos confirmados por faixa etária ($X^2=27,83$; $gl=6$; $p=0,0001$) (Figura 5.11), cabe a ressalva de que nesse ano só houve a circulação do DENV-4 no Estado.

Tabela 5.5 Distribuição de casos positivos para Dengue, por faixa-etária, nos anos 2010-2012.

Ano	2010		2011		2012		2010 – 2012	
	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%
0 – 10	32	42,67%	137	54,15%	13	8,67%	182	38,08%
11 – 20	13	17,33%	57	22,53%	44	29,33%	114	23,85%
21 – 30	10	13,33%	18	7,11%	33	22,00%	61	12,76%
31 – 40	8	10,67%	18	7,11%	18	12,00%	44	9,21%
41 – 50	5	6,67%	8	3,16%	18	12,00%	31	6,49%
51 – 60	4	5,33%	6	2,37%	17	11,33%	27	5,65%
> 60	3	4,00%	8	3,16%	6	4,00%	17	3,56%
Não informado	0	0,00%	1	0,40%	1	0,67%	2	0,42%
Total	75	100,00%	253	100,00%	150	100,00%	478	100,00%

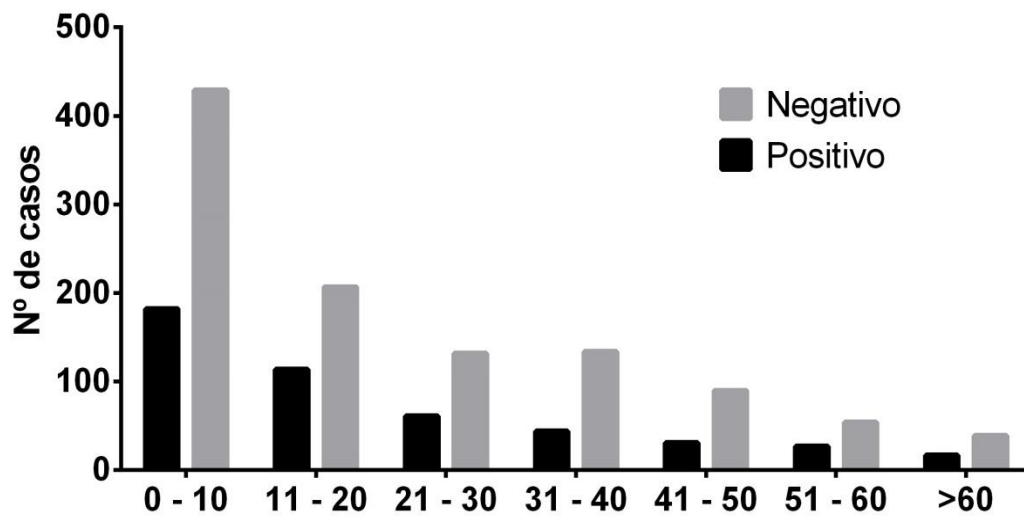


Figura 5.8 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, no período acumulado de 2010-2012.

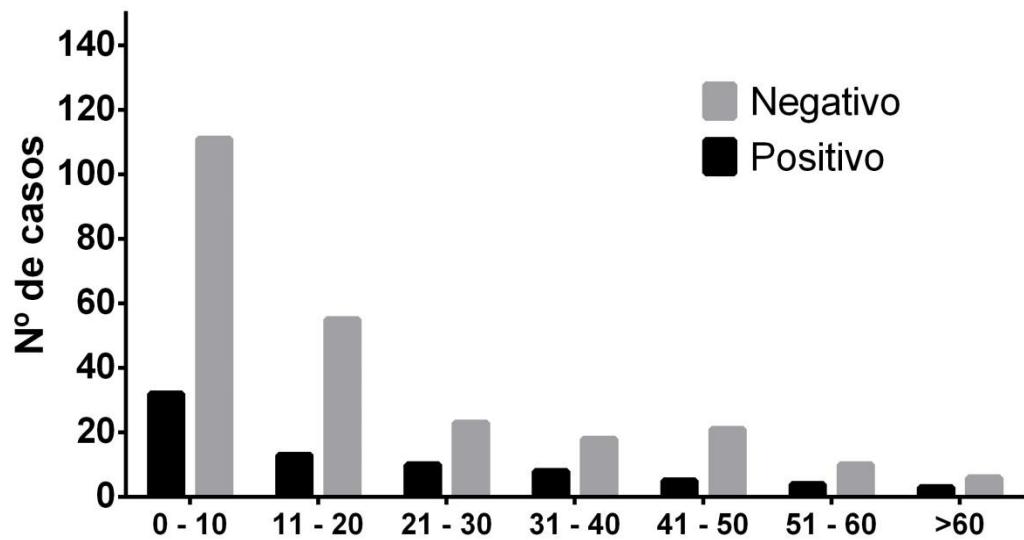


Figura 5.9 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2010.

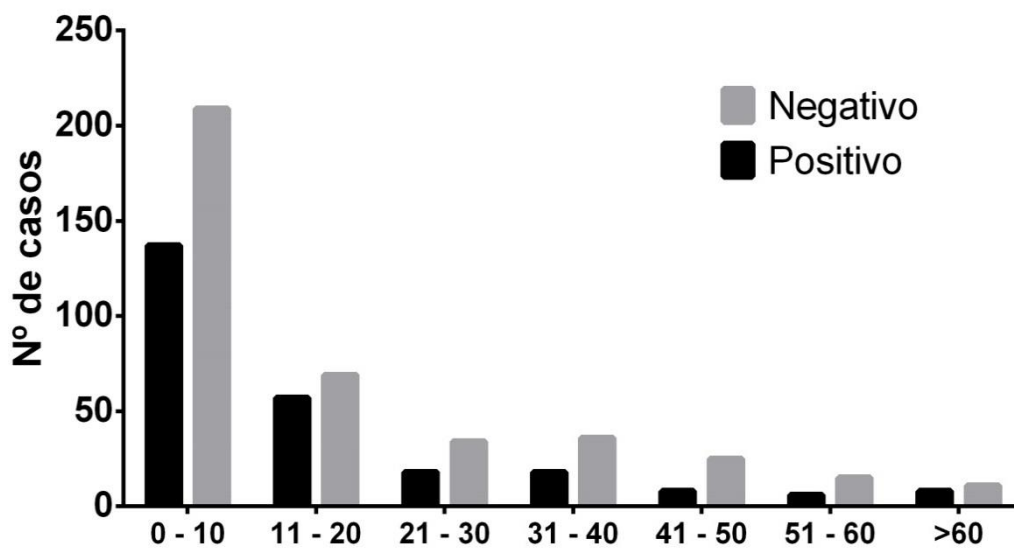


Figura 5.10 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2011.

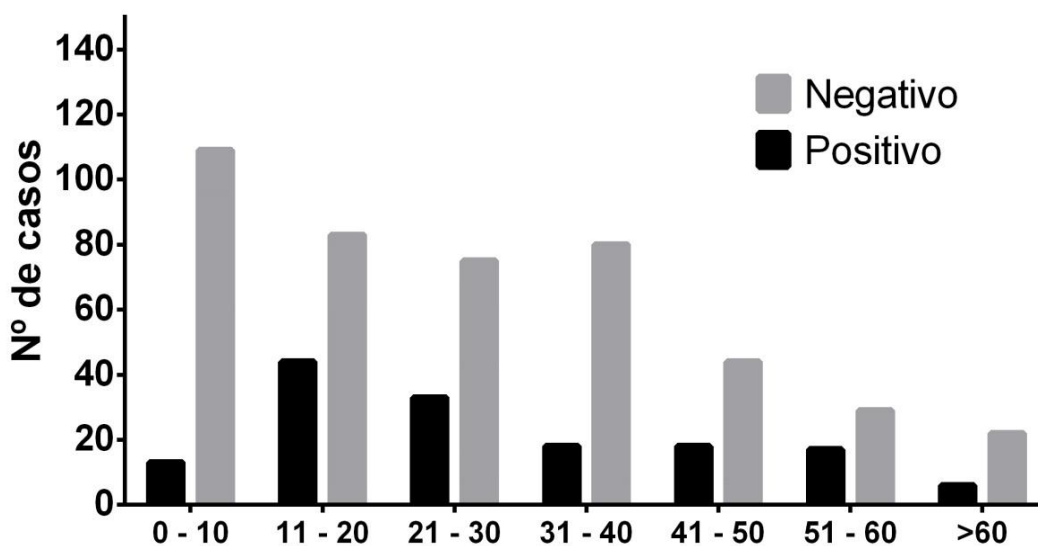


Figura 5.11 Casos estudados para dengue, relacionados à faixa etária, em 2012.

Ao analisarmos a média de idade por sorotipo, também verificamos um aumento significativo da média de idade em relação ao sorotipo ($F= 34,79$; $p<0,0001$). A média de idade das pessoas infectadas pelo DENV-4 foi significativamente maior quando comparadas as médias de idade das pessoas infectadas por DENV-1 e DENV-2, enquanto os mesmos não obtiveram diferença significativa entre si. O sorotipo 1 obteve média de idade 15,8(DP: 16,95), DENV-2 média de 16,92 anos (DP: 16,98) e DENV-4 obteve média de 29,87 anos (DP: 17,01) (Figura 5.12).

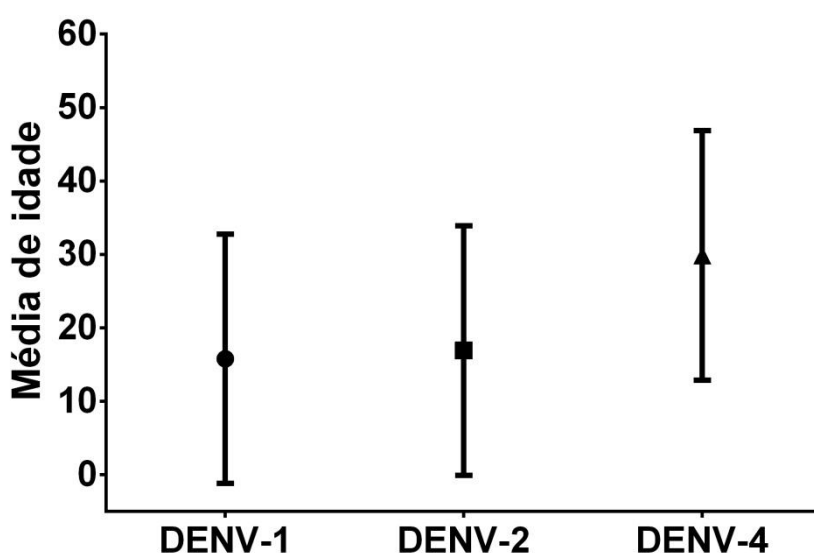


Figura 5.12 Média de idade dos casos positivos por sorotipo, 2010-2012.

5.4.2 Gênero

Em relação ao gênero, no período de 2010 a 2012, a maior incidência foi observada no sexo feminino, representando 52% (249/478) dos casos positivos, enquanto o sexo masculino obteve 48% (229/478) dos casos, mas a diferença não foi significativa (OR: 0,9871; IC: 0,7962-1,224; $X^2= 0,01404$; $gl=1$; $p=0,9057$) (Figura 5.13). Apenas em 2011 o sexo masculino obteve um maior número de casos, representando 51% (128/253) dos casos positivos (Tabela 5.6). A média de idade de mulheres afetadas pela Dengue foi significativamente maior ($t=2,414$; $gl=474$;

p=0,0345) que a média de idade de homens afetados, sendo respectivamente 22,69 (DP: 18,85) e 18,69 (DP: 17,17) (Figura 5.14).

Tabela 5.6: Demonstrativo do número de casos positivos por gênero, no período 2010-2012.

Ano	2010		2011		2012		2010 - 2012	
Gênero	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%	Positivos	%
Feminino	39	52%	125	49%	85	57%	249	52%
Masculino	36	48%	128	51%	65	43%	229	48%
Total	75	100%	253	100%	150	100%	478	100%

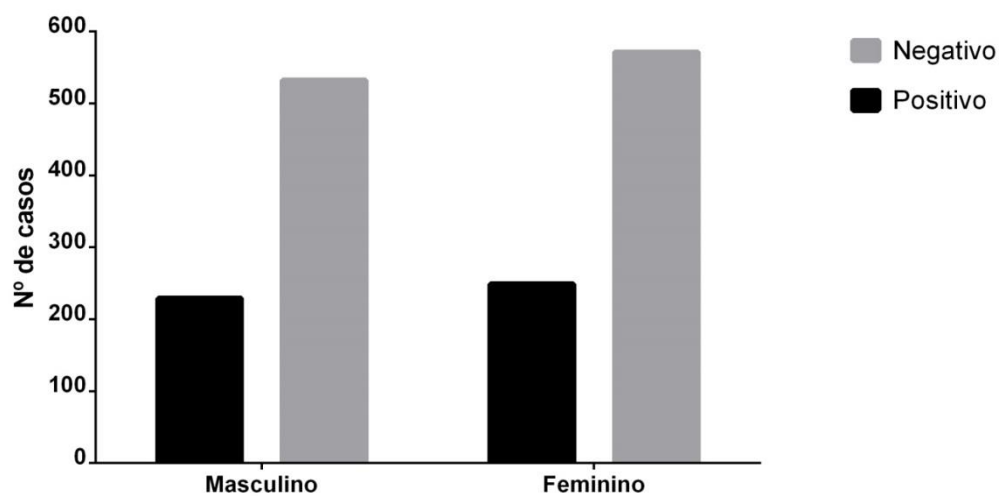


Figura 5.13 Número de casos estudados para dengue, relacionados ao gênero, no período acumulado de 2010-2012.

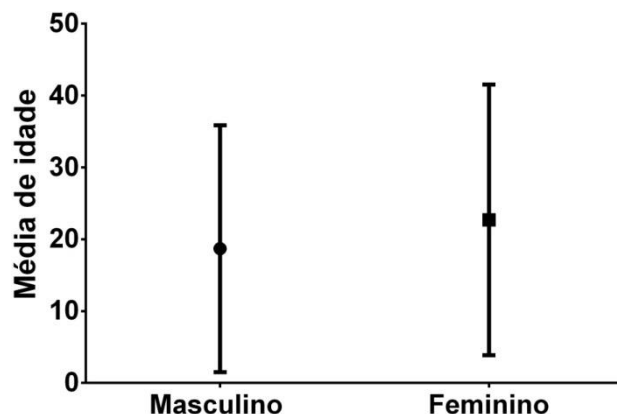


Figura 5.14 Média de idade dos casos confirmados para dengue, relacionados ao gênero, no período acumulado de 2010-2012.

5.5 Caracterização genética dos sorotipos isolados no Rio Grande do Norte, 2010-2012

Foram selecionadas 2 amostras representativas de cada sorotipo isolado no RN, (Tabela 5.7), no período estudado, para o sequenciamento da região do gene que codifica a proteína E (1485 pb). O RNA do único DENV-3 identificado nesse estudo não pôde ser recuperado para o sequenciamento do gene do envelope.

Tabela 5.7 Relação de amostras selecionadas para o presente estudo, com seus respectivos números de identificação do LADIC, sorotipos, origem e ano de coleta.

Nº IDENT.	SOROTIPO	ORIGEM	ANO
81	DENV-1	Caicó	2010
129	DENV-1	Guamaré	2011
45	DENV-2	Natal	2011
169	DENV-2	Caicó	2010
05	DENV-4	Guamaré	2012
380	DENV-4	Santa Cruz	2011

A análise filogenética das sequências de DENV-1 revelou a circulação do genótipo V (Figura 5.15). Para DENV-2, o genótipo Sudeste Asiático/Americano foi

evidenciado (Figura 5.16). Em relação ao DENV-4, foi confirmado o genótipo II (Figura 5.17)

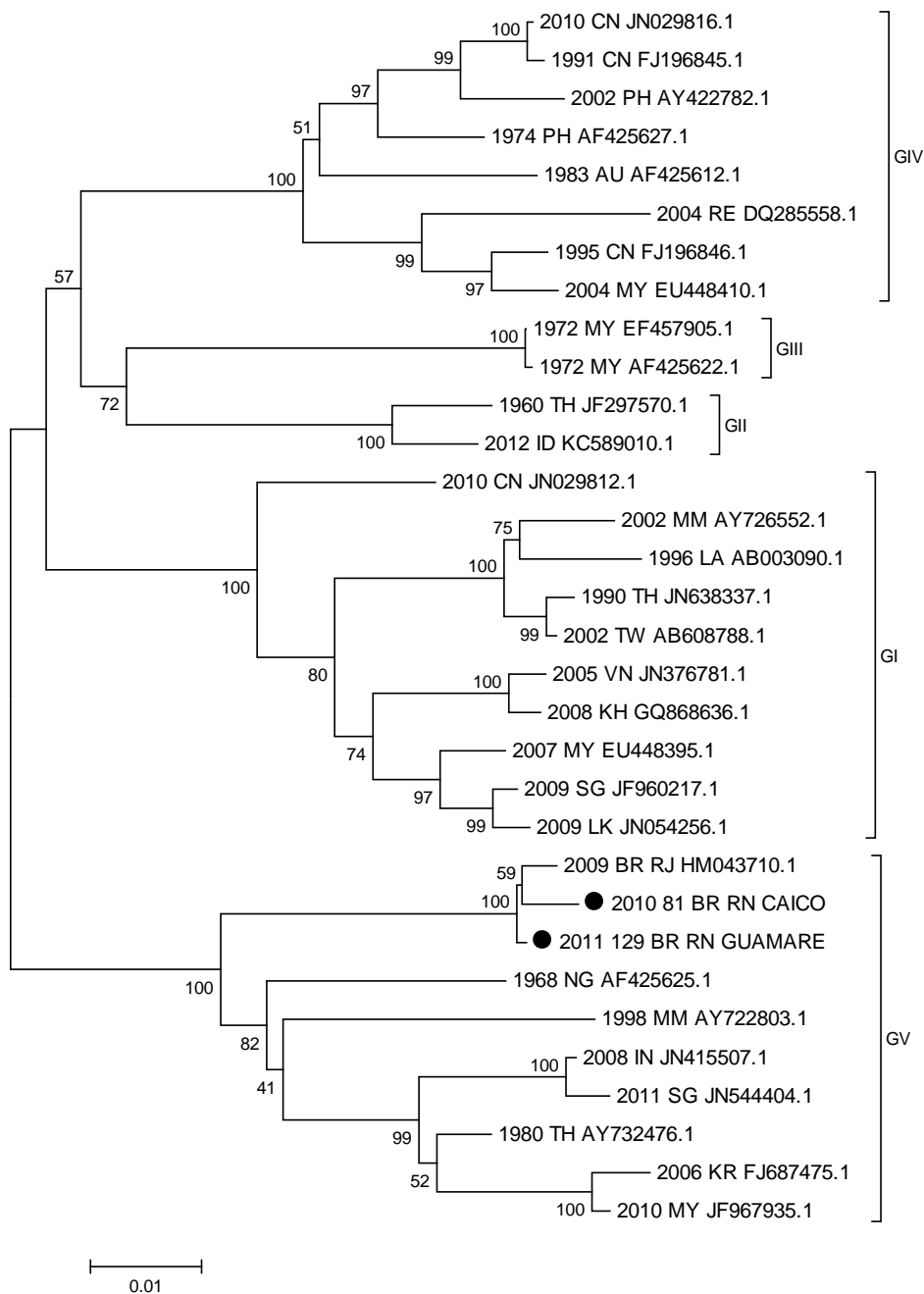


Figura 5.15 Análise filogenética das amostras de DENV-1. As sequencias dos diferentes genótipos estão seleccionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos *branchpoints*.

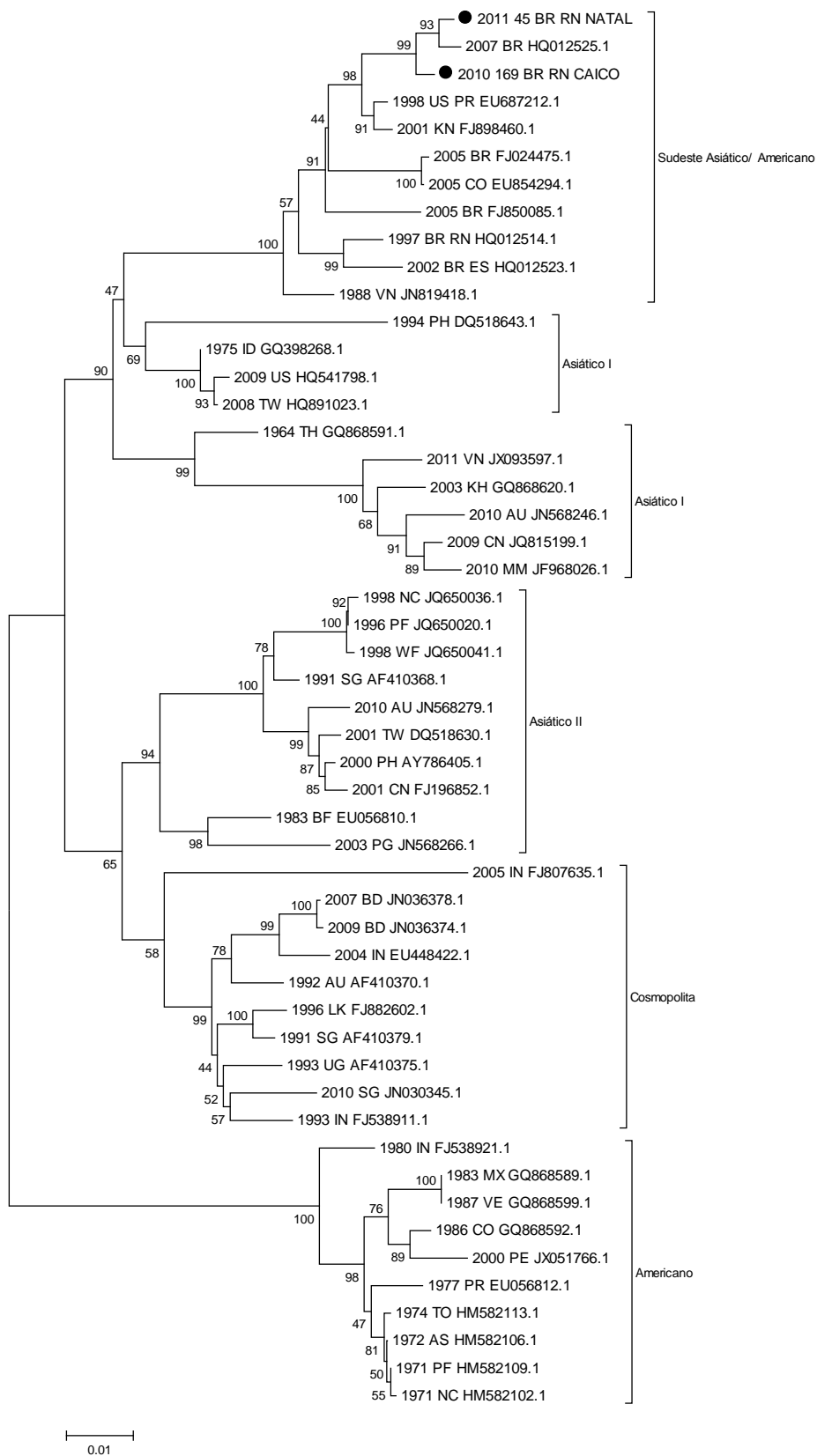


Figura 5.16 Análise filogenética das amostras de DENV-2. As sequencias dos diferentes genótipos estão selecionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos *branchpoints*.

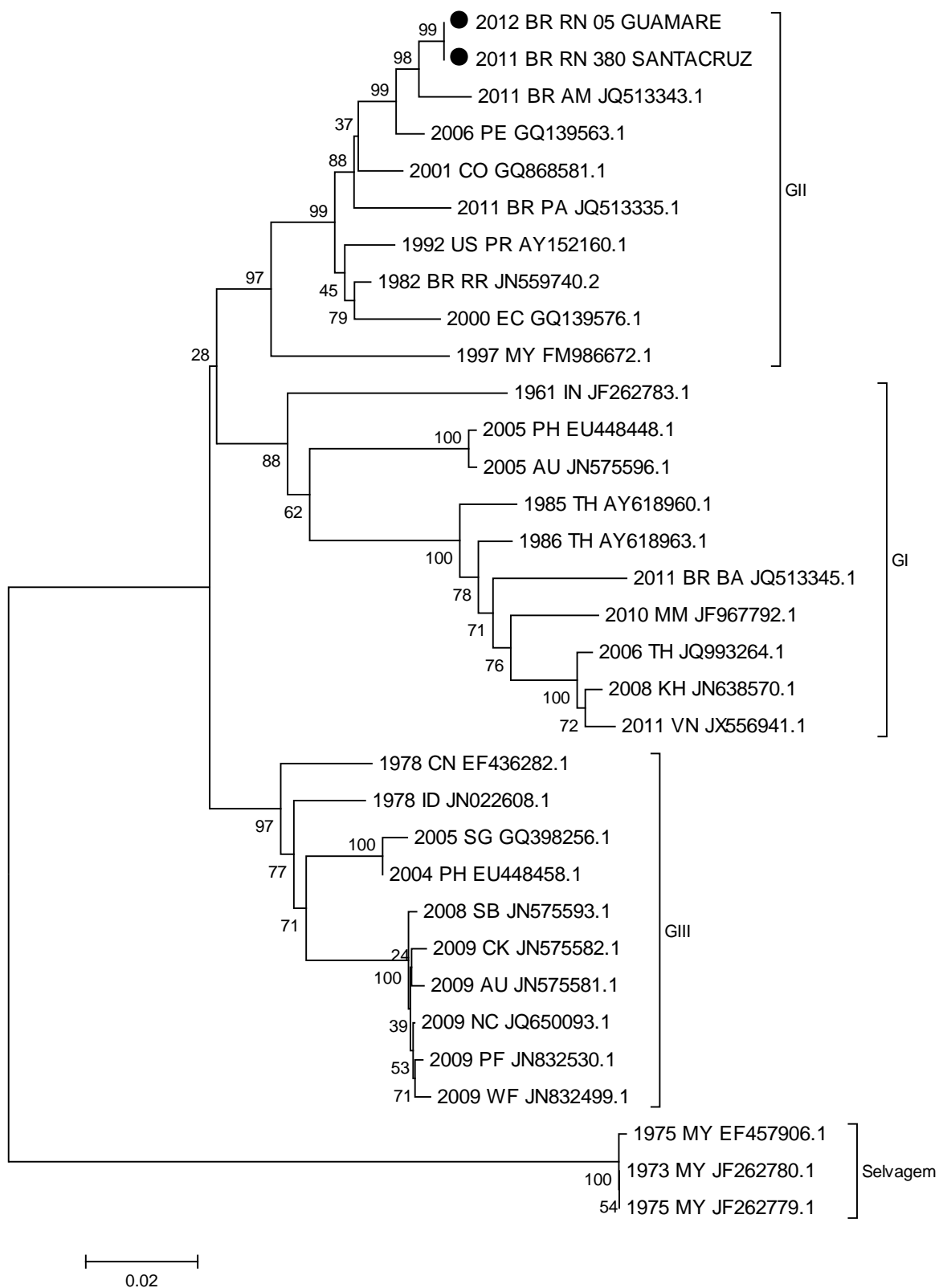


Figura 5.17 Análise filogenética das amostras de DENV-4. As sequencias dos diferentes genótipos estão selecionadas por colchetes. As amostras do RN estão em destaque. Os valores de bootstrap estão indicados nos *branchpoints*.

6. DISCUSSÃO

O Rio Grande do Norte tem registrado casos de dengue desde outubro de 1994, quando os primeiros casos autóctones foram notificados no município de Assú, após um carnaval fora de época da região. Desde então, o Estado têm demonstrado um perfil endêmico para a doença, com anos epidêmicos cada vez mais frequentes e intensos, decorrentes de vários aspectos, tais como: emergência ou reemergência de sorotipos, cocirculação de sorotipos, aumento ou diminuição de susceptíveis, fatores sanitários e ambientais (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2010).

Até o período estudado por este trabalho, as mais graves epidemias do Estado haviam ocorrido em 2001, onde 37.485 casos foram notificados e ocorreram 10 óbitos, sendo a cocirculação do DENV-1 e DENV-2, responsável por tal epidemia. No ano de 2002, onde ocorreu a introdução do DENV-3 e foram notificados 21.824 casos, sendo 107 de FHD. E em 2008, quando houve 28.531 casos de Dengue notificados, com 344 casos de FHD e 11 óbitos, na ocasião, o DENV-2 foi o mais incidente, após reemergência no país (Barbosa et al. 2012; Ministério da Saúde 2012). Estas epidemias refletem o impacto da introdução, emergência e reemergência de sorotipos e a importância de um sistema de vigilância virológica eficiente.

Apesar da importância desta enfermidade no Rio Grande do Norte, até o final do ano de 2009, não havia um sistema de vigilância virológica para Dengue estabelecido no próprio estado. Haja vista o informe epidemiológico, referente a 2009, do Ministério da Saúde (2010), onde é informado que apenas duas amostras suspeitas de dengue foram encaminhadas para isolamento viral, sendo ambas negativas. Em 2010, o isolamento viral foi finalmente implantado no Laboratório Central Doutor Almino Fernandes, concomitantemente à consolidação da implantação do diagnóstico molecular por RT-PCR, estabelecida em nosso Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer na Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Desta forma, podemos destacar este projeto como a implantação e consolidação de um sistema de vigilância virológica através de métodos moleculares

específicos, realizado no próprio Estado, o qual visa à melhoria no diagnóstico laboratorial para Dengue e suporte na prevenção de surtos e epidemias.

Quanto ao histórico de estudos sobre Dengue no Rio Grande do Norte, existem poucas referências, sendo de Cunha et al. (1999), o único e último trabalho científico, de dados primários. Barbosa et al. (2012) publicaram mais recentemente um artigo científico, tratando de um estudo de dados secundários do SINAN e de planilhas paralelas do dengue, relativo ao período de 2000 a 2009. Além da carência de trabalhos no Estado, dados insuficientes divulgados pelo MS e pela Secretaria da Saúde Pública do RN (Ministério da Saúde 2012, 2013; Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2010), aliada à limitada informação dos Boletins Epidemiológicos da Subcoordenadoria de Vigilância Epidemiológica, os quais não possuem atualização desde setembro de 2010 (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2013), demonstram a dificuldade na obtenção de dados precisos acerca desta enfermidade no RN e manifestam a necessidade da realização de estudos adicionais, no intuito de descrever e analisar a atual situação da Dengue nesta Unidade Federativa.

6.1 Monitoramento dos sorotipos dos vírus Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

Em nosso estudo, a utilização da metodologia de isolamento viral demonstrou um percentual de confirmação de casos de 27% (387/1433) no triênio estudado. Porém pôde-se perceber que ocorreu variação entre os anos estudados, obtendo 15,3% (27/176), 34,8% (229/658) e 21,9% (131/599), em 2010, 2011 e 2012, respectivamente.

A justificativa para esta variação, provavelmente está relacionada ao fato de 2010 ter sido um ano interepidêmico, enquanto os outros dois anos foram epidêmicos, considerados de alta incidência de dengue e relacionando apenas 2011 e 2012, corresponderam a 28,6% (360/1257) de confirmação. Outros percentuais de isolamento de vírus como 4,2% (Cunha et al. 1999), 6,4% (Macedo et al. 2013), 15,9% (De Simone et al. 2004), 18,5% (Rigau-Perez 2000), 20,8% (Vasconcelos et al. 1993), 22,8% (Féres 2004), 30,7% (Da Silva 2013), foram descritos em anos epidêmicos e a grande maioria corrobora os nossos achados.

Miagostovich et al. (1993) descreveram um alto percentual de isolamento (41,2%) na epidemia causada pela introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro. Uma alta taxa de isolamento não foi repetida pela epidemia causada pela introdução do DENV-4 no Rio Grande do Norte (21,87%), em 2012, apesar de também ter ocorrido em contexto epidemiológico de suscetibilidade imunológica de praticamente toda a população do Estado. Portanto, outros fatores devem ser averiguados, dentre eles: viremia, tempo de coleta, condições de envio ao laboratório e imunidade da população.

Um importante benefício do isolamento viral, é que os vírus, de poucas passagens em cultura de células, podem ser utilizados em caracterizações genéticas (De Simone et al. 2004), como a que foi realizada neste projeto.

O diagnóstico molecular por RT-PCR convencional demonstrou positividade em 24,13% (194/804) dos casos testados no triênio. No ano interepidêmico de 2010, a detecção foi de 17,84% (48/269), em 2011 foi de 39,6% (91/230) e em 2012 foi de 18% (55/305). Apenas no ano de 2012, o percentual de confirmação do RT-PCR foi menor que o de isolamento viral, o que demonstra sua importância na vigilância virológica e na casuística deste estudo, haja vista a detecção de 72 casos por esta metodologia, onde o isolamento viral havia sido negativo (Tabela 5.1). Quando consideramos apenas o período epidêmico de 2011 a 2012, o percentual é de 27,3% (146/535), estando um pouco abaixo de alguns trabalhos, mas em consonância com outros, realizados em períodos de epidemia, onde são observados índices de 20,7% (De Simone et al. 2004), 27% (Cunha et al. 1999), 29,3% (Féres 2004), 29,6% (De Paula et al. 2002), 30,6% (Macedo et al. 2013), 31,3% (Bastos et al. 2012), 32,4% (Miagostovich et al. 1993), 34,2% (Sudiro et al. 1997), 50,1% (Da Silva 2013).

Podemos perceber que a detecção por RT-PCR, em 2012 no RN, foi quem causou a maior discrepância nos dados, ficando até mesmo abaixo do percentual do isolamento viral para o mesmo ano. Fato bastante peculiar, devido à conhecida sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares frente às técnicas de isolamento viral. Cabe salientar, que em 2012, só obtivemos a detecção da circulação viral do DENV-4, portanto o protocolo de RT-PCR pode estar necessitando de revisão e adequação de *primers* para o referido sorotipo, visando à otimização da técnica e uma maior sensibilidade às cepas circulantes no Estado.

Entretanto, a utilização do diagnóstico molecular por RT-PCR já foi demonstrado, por trabalhos de Miagostovich et al. (1997; 1993) e De Paula & Fonseca (2002), como uma importante ferramenta na vigilância virológica, confirmando casos onde o isolamento viral não foi viável e devido a sua sensibilidade e rapidez, permitindo o diagnóstico específico em menos de 2 dias.

Nossos resultados demonstraram a cocirculação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (caso isolado) em 2010. Em 2011, ocorreu a cocirculação dos sorotipos 1, 2 e 4, destacando a importante introdução do DENV-4 no Estado, em Maio de 2011, após a ocorrência de festividades religiosas no município de Santa Cruz, já sendo detectado em Natal, no mesmo mês. Já em 2012, confirmamos apenas o DENV-4.

Cunha et al. (1999) e Barbosa et al.(2012), demonstram que este padrão de cocirculação dos sorotipos 1 e 2 já ocorreu em epidemias passadas, como em 1997 e nos anos 2000 e 2007, culminando nas grandes epidemias de 2001 e 2008. Este cenário, em consonância com a teoria da infecção sequencial (Halstead 1988), coloca o RN como um local bastante propício aos casos graves de dengue. Além disto, Wikramaratna et al. (2010) demonstraram através de modelos matemáticos, que a possibilidade de infecções terciárias e quaternárias aumentam a força de infecção e tendem a diminuir, significativamente, a idade da primeira infecção pelo vírus da dengue.

Apesar de qualquer um dos 4 sorotipos de dengue causarem DHF em infecções secundárias (Guzman et al. 2013), estudos na Tailândia e em Cuba demonstram que existem sequências de infecção mais propícias ao desenvolvimento de casos graves (Guzman et al. 2012). Anantapreecha et al.(2005), demonstraram que o DENV-1 causa casos graves em infecções primárias, enquanto o DENV-2 é mais propício a causar DHF em infecções secundárias. Já Gibbons et al. (2007) também sugerem que a infecção secundária por DENV-2 é mais associada à casos graves e adiciona que a sequência DENV-1/DENV-2 é sujeita a um maior risco que as demais. No Brasil, De Carvalho Bittencourt et al. (2012) observaram que os casos graves possuem associação com o DENV-2 e infecções secundárias.

No Brasil, a descrição da cocirculação dos quatro sorotipos da dengue simultaneamente, em Manaus (Bastos et al. 2012) e no Estado do Rio de Janeiro (Da Silva 2013), demonstra uma tendência de hiperendemicidade da dengue nos

Estados do país, como demonstramos ter ocorrido em 2011, onde houve circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 no RN. Bastos et al. (2012) também relatam a presença de coinfeções por sorotipos diferentes, assim como em trabalhos de Gubler et al.(1985), dos Santos et al. (2003), e Araújo et al. (2006). No entanto, ainda não há dados suficientes para afirmar a importância destas coinfeções, apenas sabemos que isso já pode estar acontecendo no Rio Grande do Norte e merece ser alvo de maiores estudos.

A introdução do sorotipo 4 no Estado do RN tem enorme importância epidemiológica, pois após a introdução de um novo sorotipo, o número de casos tem um grande aumento (Cordeiro et al. 2008).

Tratando-se do DENV-4, temos um cenário epidemiológico onde praticamente toda a população estava susceptível, devido a não circulação deste sorotipo no país, desde o trabalho descrito por Osanai et al. (1983) e que ressurgiu, em 2010, naquele mesmo Estado.

Nosso trabalho demonstrou a substituição de predominância de sorotipos ao longo dos três anos de estudo (Figura 5.2), algo normal durante sucessivas epidemias, devido ao número crescente de pessoas que se tornam imunes ao antigo sorotipo (Cordeiro et al. 2007).

Em 2012, além de ter ocorrido a substituição do sorotipo predominante, do DENV-1 para o DENV-4, pudemos também observar apenas a circulação do sorotipo 4 e a sua distribuição por praticamente todo o Estado (Figura 5.5). Ademais, foi registrada incidência de 821,93 casos por 100.000 habitantes, sendo uma altíssima incidência, até mesmo quando comparada a epidemia de 2011, quando tivemos incidência de 731,24 (Ministério da Saúde 2012), estes aspectos sugerem um grande poder de infecção e disseminação do DENV-4.

Nogueira et al. (2001) relataram a introdução do DENV-3 no estado do Rio de Janeiro e três anos depois, Nogueira et al. (2005), demonstraram a importância epidemiológica que a introdução deste novo sorotipo causou, como aumento no número de casos de FHD/SCD, resultando na maior epidemia registrada até então no Brasil, em 2002. Desta forma, são necessários estudos posteriores, os quais esclareçam o impacto da introdução do DENV-4, no Rio Grande do Norte, não apenas em números de casos, mas também em relação à gravidade deles.

6.2 Distribuição geográfica dos casos de Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

Em relação à distribuição espacial dos casos e sorotipos no Rio Grande do Norte, podemos perceber através da Figura 5.3, Figura 5.4 e Figura 5.5, que a região metropolitana possui a circulação de todos os sorotipos registrados para o Estado. Contudo, verificamos que o vírus circulou em todas as zonas climáticas do RN, estando de acordo com outros trabalhos também realizados na região do nordeste brasileiro (Cordeiro et al. 2008; Melo et al. 2010).

A alta circulação viral e grande número de casos na região metropolitana, provavelmente é resultado da alta urbanização e densidade populacional, além do intenso fluxo de pessoas e maior acesso aos serviços médicos, o qual resulta no maior registro de casos, como também já apresentado por De Simone et al.(2004) e Da Silva (2013), no Rio de Janeiro, Cordeiro et al. (2007), em Pernambuco e Melo (2010), na Bahia. Vale salientar que a capital do Estado, Natal, representou 53,97% dos casos confirmados em todo o período estudado, correspondendo a mais da metade dos casos confirmados para todo o Estado. Aspecto já atestado por Cunha et al. (1999), na epidemia de 1997, quando Natal foi o município mais afetado, com 56,6% dos casos relatados.

Recente estudo, feito por Barcellos & Lowe (2013), demonstra que ondas de difusão de dengue provêm das áreas metropolitanas para cidades de médio e pequeno porte, causando surtos em suas áreas de influência. O trabalho ainda conclui que cidades grandes e de clima quente são responsáveis pela sustentação e disseminação dos DENV.

A concentração de 73,85% dos casos confirmados em apenas 7 municípios, concorda em parte com os 20 municípios considerados prioritários pela Secretaria de Estado de Saúde pública do RN, para monitoramento estratégico (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte 2010), e sugere a adição de Guamaré e Santo Antônio à referida lista.

6.3 Distribuição temporal dos casos de Dengue no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

O período anual com a maior incidência de dengue no Estado foram os meses de Abril e Maio, representando 21,12% (101/478) e 23,01% (110/478) dos casos confirmados, (X^2 : 61,13; gl= 11; $p < 0,001$). Câmara et al. (2007), demonstraram que, na região Nordeste, a maior concentração de notificações ocorrem realmente no segundo trimestre e que a significativa incidência sazonal da dengue nos meses quentes está relacionada ao ciclo reprodutivo do *Ae. aegypti*.

Outros trabalhos no Nordeste do Brasil, como o de Gonçalves Neto & Rebêlo (2004), em São Luís, comprova a ocorrência da maioria dos casos na estação chuvosa, concentrados entre Março e Junho, havendo correlação positiva com a precipitação pluviométrica e umidade relativa. Cordeiro et al.(2007), em Pernambuco, evidenciam um maior número de casos no primeiro semestre, com picos em Abril e Maio. No Estado da Paraíba, observou-se uma curva de incidência da dengue, com picos oscilando entre os meses de março a maio (Souza et al. 2007). Na cidade de Teresina, Monteiro et al.(2009) constatam uma maior incidência no primeiro semestre de cada ano, coincidindo com o período de maior índice pluviométrico e de infestação predial. Alves et al. (2011), no município de Aracaju, também expõem uma maior incidência entre os meses de Janeiro a Junho.

Na região Sudeste, Gomes et al. (2012), em trabalho realizado na cidade do Rio de Janeiro, verificaram que a maioria dos casos estão concentrados no primeiro semestre do ano, principalmente em Março, Abril e Maio, semelhante ao que também ocorre na região Nordeste. Viana & Ignotti (2013), em uma revisão de trabalhos científicos, concluem que a variação meteorológica está fortemente relacionada à incidência de dengue, sendo as variações sazonais da temperatura e de índices pluviométricos influentes na dinâmica vetorial e da doença.

No Rio Grande do Norte existem heterogeneidades climáticas, as quais dependem da localização geográfica de cada município (Rio Grande do Norte 2013). Contudo, em todos os municípios, os maiores índices pluviométricos ocorrem no primeiro semestre do ano, e em sua maioria iniciam-se no final do primeiro trimestre, podendo se prolongar por todo o segundo trimestre (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte 2013). Aspectos que corroboram os

resultados demonstrados neste e no outro trabalho realizado no Rio Grande do Norte, por Barbosa et al. (2012), indicando a importância de um maior efetivo de ações voltadas ao controle e prevenção da dengue, nestes períodos cruciais do ano.

6.4 Dados demográficos dos casos estudados

A faixa etária de 0-10 anos obteve o maior número de casos, no período acumulado de 2010-2012, sendo responsável por 38,08% dos casos confirmados. Na epidemia ocorrida em 2007, Teixeira et al.(2008) já haviam demonstrado que pela primeira vez, no Brasil, a maioria dos casos de FHD ocorreram em crianças abaixo dos 15 anos e, em Pernambuco, Cordeiro et al.(2007), também perceberam uma tendência no aumento da incidência de casos em menores de 15 anos, ao longo do período estudado de 1995 a 2006. No Ceará, Cavalcanti et al. (2011) atestaram a mudança no padrão de idade afetada pela Dengue, com a maior incidência sendo deslocada para a faixa de 0-10 anos, no ano de 2008.

Estes resultados são consequência da obtenção de imunidade por parte dos indivíduos adultos devido à hiperendemicidade do dengue, o que resulta na maior infecção em crianças não imunes. Um estudo sorológico realizado na cidade do Recife verificou a presença simultânea de anticorpos para os DENV-1, 2 e 3 em 11% das crianças avaliadas, demonstrando uma intensa cocirculação dos DENV em idade precoce (Castanha et al. 2013). A velocidade deste deslocamento na faixa etária é proporcional ao número de sorotipos circulantes e à magnitude da força de infecção dos vírus dengue (Rodriguez-Barraquer et al. 2011; Wikramaratna et al. 2010).

Com a introdução do sorotipo 4, o nosso trabalho atestou uma nova mudança no padrão de incidência por idade no Rio Grande do Norte. A faixa etária de 11 a 30 anos obteve 51,33% (77/150) dos casos positivos ($X^2=27,83$; $gl=6$; $p=0,0001$) (Figura 5.11). O DENV-4 foi o responsável pelo aumento na média de idade da população afetada (Figura 5.12; $p<0,0001$), quando comparado aos outros sorotipos. Resultado já esperado, devido à introdução deste sorotipo, o qual nunca havia sido registrado no RN. Estabeleceu-se um cenário epidemiológico onde praticamente toda a população é susceptível a infecção.

Em relação ao gênero, este trabalho verificou a maior incidência no sexo feminino, representando 52% dos casos confirmados, apesar de não ter havido diferença significativa, nossos achados estão de acordo com trabalhos realizados em Belém, por Travassos Rosa et al. (2000), em Recife, por Cordeiro et al.(2007), em Aracaju, por Alves et al. (2011) e em Vitória, por Cardoso et al. (2011).

Também pôde ser verificado que a média de idade de mulheres afetadas pela dengue foi significativamente maior que a média de idade de homens afetados ($p=0,0345$), em concordância com o que também foi verificado por De Simone et al. (2004), no Rio de Janeiro.

Estes resultados podem ser explicados pelo comportamento social humano, onde mulheres utilizam mais os serviços de saúde e, desta forma, possuem mais notificações deste agravo e/ou devido à mulher passar mais tempo no intra e peridomicílio, estando mais exposta ao *Ae. aegypti* (Cardoso et al. 2011).

6.5 Caracterização genética dos sorotipos isolados no Rio Grande do Norte, 2010-2012.

A caracterização genética dos DENV presentes no Rio Grande do Norte confirmou a circulação do genótipo V, do DENV-1 (Figura 5.15). No Brasil, outros estudos corroboram este achado, sendo o único genótipo evidenciado como circulante no país até então (Bona et al. 2012; Carneiro et al. 2012; dos Santos et al. 2011; Drumond et al. 2012).

Trabalhos de Carneiro et al. (2012) e Drumond et al. (2012) sugerem que diferentes linhagens do DENV-1, genótipo V, têm sido introduzidas no Brasil, gerando um aumento na diversidade genética deste vírus e que surtos associados com a reemergência do DENV-1 ocorrem, desde 2009, provavelmente devido à substituição destas linhagens.

Quanto ao DENV-2, evidenciamos o genótipo Sudeste Asiático/Americano (Figura 5.16). Resultado que também está em consonância com o cenário brasileiro demonstrado por outros trabalhos (Bona et al. 2012; Cruz et al. 2010; Drumond et al. 2013; Faria et al. 2013; Oliveira et al. 2010).

Assim como para o DENV-1, já tivemos a descrição da circulação de diferentes linhagens para o DENV-2, no Brasil. As circulações destas linhagens geneticamente distintas podem estar influenciando na gravidade dos casos de

dengue, visto que, epidemias de grande porte foram evidenciadas após a introdução de novas linhagens virais (Drumond et al. 2013; Faria et al. 2013; Oliveira et al. 2010).

Para o DENV-4, foi atestada a circulação do genótipo II (Figura 5.17), em concordância com Nunes et al. (2012) e de Souza et al. (2011), os quais verificaram a circulação dos genótipos I e II deste sorotipo, no Brasil. A reemergência do sorotipo 4 representa grande preocupação e suscita a necessidade de estudos filogenéticos que possam detectar a introdução ou substituição de linhagens e que elucidem a dinâmica da evolução e da dispersão geográfica deste sorotipo/genótipo, não só no Rio Grande do Norte, como também no Brasil (de Souza et al. 2011; Nunes et al. 2012).

A identificação precisa da variante genética dos vírus da dengue é muito importante, principalmente num cenário hiperendêmico onde ocorre a circulação de vários sorotipos e genótipos do DENV, como no Rio Grande do Norte. A vigilância genotípica é crucial para a compreensão da dispersão, virulência e eventos de mutação, os quais podem resultar em vírus com propriedades patogênicas expandidas, alta transmissibilidade e virulência (Bona et al. 2012; Drumond et al. 2012).

Neste contexto, friso a importância da implantação do sequenciamento genômico do DENV no Estado do Rio Grande do Norte, o qual nos proverá novas ferramentas para estudo e nos levará a uma maior compreensão da dinâmica que rege esta enfermidade nesta unidade federativa.

7. PERSPECTIVAS

Esses resultados possibilitaram uma melhor compreensão da atividade desses vírus no Estado do Rio Grande do Norte, servindo de base para ações de controle e pesquisas relacionadas à patogênese da doença, caracterização genética, filogenia e evolução dos DENV no RN. Os avanços alcançados quanto à implantação e estruturação de método de vigilância virológica no Estado, além do sequenciamento genômico, reforçam a necessidade do contínuo monitoramento dos DENV no Estado do Rio Grande do Norte nos próximos anos.

A continuidade deste trabalho, com a utilização de estudos filogenéticos e evolutivos deve ser realizada para a verificação das linhagens circulantes no Estado e as implicações epidemiológicas que decorrem desta verificação. Espera-se também que novas metodologias sejam estruturadas em nosso laboratório (LADIC), como o PCR em tempo real, o teste de captura do antígeno NS1 e o isolamento viral em cultura de células, para que possamos avaliar outras variáveis que concernem à infecção pelo vírus dengue, tais como: viremia, *status* imunológico e testes de antivirais.

Parcerias bem estruturadas com Laboratórios de Referência, no Estado e no Brasil, serão mantidas para o aprimoramento da vigilância da Dengue no Rio Grande do Norte, com vistas à prevenção e controle de casos da doença.

8. CONCLUSÕES

1. A técnica de RT-PCR contribuiu com um maior percentual de positividade nos anos de 2010 e 2011. Em 2012, o isolamento viral teve maior percentual de detecção.
2. No período estudado de 2010-2012, ocorreu a circulação dos quatro sorotipos da Dengue. Com destaque para a introdução do DENV-4 no Estado, pelo município de Santa Cruz, em 2011.

3. Em 2010, ocorreu a cocirculação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Em 2011, a cocirculação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4. Em 2012, houve apenas a circulação do DENV-4.
4. Houve alternância de predominância dos sorotipos. Em 2010, o sorotipo predominante foi o DENV-2. Em 2011, o DENV-1 predominou e no ano seguinte, apenas o DENV-4 foi confirmado no Estado do RN.
5. A maior quantidade de casos de Dengue ocorreu no município de Natal, representando mais da metade dos casos confirmados, seguido de Parnamirim.
6. Os meses com maior incidência foram Abril e Maio, representando 21,12% e 23,01% dos casos confirmados, respectivamente.
7. A faixa etária com maior número de casos confirmados foi a de 0-10 anos, no período acumulado. Porém, em 2012, houve um maior número de casos nas faixas etárias de 11-30 anos, devido a introdução do sorotipo 4.
8. Em relação ao gênero, a maior incidência foi observada no sexo feminino, embora não fosse estatisticamente significativo. A média de idade das mulheres infectadas também foi maior.
9. A caracterização genética das cepas circulantes confirmou a circulação do genótipo V, genótipo Sudeste Asiático/Americano e genótipo II, respectivamente para DENV-1, DENV-2 e DENV-4.

9. REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S 2008. *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 576 pp.
- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M 2002. Enzyme-linked 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.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990. Basic Local Alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403-410.
- 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*, 40: 200-212.
- Alvarez DE, Filomatori CV, Gamarnik AV 2008. Functional analysis of dengue virus cyclization sequence located at the 5' and 3'UTRs. *Virology*, 375: 223-235.
- Alves JA, Santos JR, de Mendonca EN, Abud AC, Nunes Mda S, Fakhouri R, Inagaki AD, Marchioro M, Antonioli AR 2011. Epidemiological aspects of dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44: 670-673.
- Anantapreecha S, Chanama S, A An, Naemkhunthot S, Sa-Ngasang A, Sawanpanyalert P, Kurane I 2005. Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. *Epidemiol Infect*, 133: 503-507.
- Anderson CR, Downs WG, Hill AE 1956. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science*, 124: 224-225.
- Araújo FM, Nogueira RM, de Araujo JM, Ramalho IL, Roriz ML, de Melo ME, Coelho IC 2006. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101: 925-928.
- Araújo JMG 2009. *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, de Filippis AM, Schatzmayr HG, de Araujo ES, Britto C, Cardoso MA, Camacho LA, Nogueira RM 2009a. Quantification of dengue virus type 3 RNA in fatal and non-fatal cases in Brazil, 2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103: 952-954.

Araújo JMG, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Dos Santos FB, Cardoso MA, Britto C, Coelho JM, Nogueira RM 2009b. 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 haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*, 11: 1238-1255.

Barbosa IR, Araújo LF, Carlota FC, Araújo RS, Maciel IJ 2012. Epidemiologia do dengue no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, 2000 a 2009. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 21: 149-157.

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

Bastos MD, de Figueiredo RMP, Ramasawmy R, Itapirema E, Gimaque JBL, Santos LO, Figueiredo LTM, Mourao MPG 2012. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45: 393-394.

Bentsi-Enchill AD, Schmitz J, Edelman R, Durbin A, Roehrig JT, Smith PG, Hombach J, Farrar J 2013. Long-term safety assessment of live attenuated tetravalent dengue vaccines: Deliberations from a WHO technical consultation. *Vaccine*, 31: 2603-2609.

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.

Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James JA 2013. The Invasive mosquito species *Aedes Albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29: 460-468.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde 2002. *Programa Nacional de Controle da Dengue*. 1 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 32 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 2009. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 7 ed., Ministério da Saúde, Brasília, 816 pp.

Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*, 87: 584-593.

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.

Camara FP, Theophilo RL, Dos Santos GT, Pereira SR, Camara 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.

Castanha PM, Cordeiro MT, Martelli CM, Souza WV, Marques ET, Jr., Braga C 2013. Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. *Epidemiol Infect*, 141: 1080-1088.

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.

Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Dengue type 3 infection--Nicaragua and Panama, October-November 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 44: 21-24.

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

Chan M, Johansson MA. The incubation periods of Dengue viruses. PLoS One [serial on the Internet], 2012 3511440]; 7(11):[e50972 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226436>.

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.

Chuang YC, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Wu HL, Yeh TM 2011. Dengue virus-induced autoantibodies bind to plasminogen and enhance its activation. *J Immunol*, 187: 6483-6490.

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

Cordeiro MT, Freese E, Schatzmayr H, Nogueira RM 2008. *Vinte anos de evolução da dengue no Estado de Pernambuco*. 1 ed., Editora Universitária da UFPE, Recife, 225 pp.

Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RM, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40: 605-611.

Cruz ACR, Galler R, da Silva EV, Silva M, Carneiro AR, Travassos Da Rosa ES, Vasconcelos HB, de Sá ELR, Vasconcelos PFC 2010. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. *Rev Pan-Amaz Saúde*, 1: 25-34.

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.

Da Silva MH 2013. *Impacto da emergência/re-emergência dos diferentes sorotipos do vírus dengue no Estado do Rio de Janeiro*. MSc Dissertation, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 74 pp.

De Carvalho Bittencourt M, Martial J, Cabie A, Thomas L, Cesaire R 2012. Decreased peripheral dendritic cell numbers in dengue virus infection. *J Clin Immunol*, 32: 161-172.

de Figueiredo ML, Alfonso HL, Amarilla AA, Figueiredo LT, Aquino VH, Costa CA, Luz SL 2013. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Viol J*, 10: 60.

de Figueiredo ML, de CGA, Amarilla AA, de SLA, de SOA, de Araujo RF, do SMCJ, Durigon EL, Aquino VH, Figueiredo LT 2010. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. *Viol J*, 7: 152.

De Paula SO, Fonseca BAL 2002. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. *J Virol Methods*, 102: 113-117.

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 (RT-PCR) 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.

De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G, Miagostovich MP 2004. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98: 553-562.

de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambros BP, Tumoto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky Mdo C, Santos CL 2011. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e1439.

de Souza VA, Fernandes S, Araujo ES, Tateno AF, Oliveira OM, Oliveira RR, Pannuti CS 2004. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infections. *J Clin Microbiol*, 42: 1782-1784.

Deauvieau F, Sanchez V, Balas C, Kennel A, A DEM, Lang J, Guy B 2007. Innate immune responses in human dendritic cells upon infection by chimeric yellow-fever dengue vaccine serotypes 1-4. *Am J Trop Med Hyg*, 76: 144-154.

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. *Viol J*, 8: 387.

Drake JW, Holland JJ 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13910-13913.

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.

Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, de Moraes Bronzoni RV, Bosch I, Nogueira ML 2013. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One*, 8: e59422.

Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte [homepage on the Internet], Parnamirim: Governo do Estado do Rio Grande do Norte; 2013 [updated December 01, 2013; cited 2013 December 02]. Monitoramento Pluviométrico. Available from: <http://189.124.135.176/monitoramento/monitoramento.php>.

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.

Féres VC 2004. *Vigilância Laboratorial da infecção pelos vírus dengue em Goiânia, 2002-2003: caracterização molecular das amostras virais positivas*. MSc Dissertation, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

Féres VC, Martelli CM, Turchi MD, Junior JB, Nogueira RM, Rocha BA, Silva LF, de Jesus Silva MM, de Paula Cardoso Dda D 2006. Laboratory surveillance of dengue virus in Central Brazil, 1994-2003. *J Clin Virol*, 37: 179-183.

Figueiredo LT 2012. Dengue in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 45: 285.

Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*, 73: 6104-6110.

Gan VC, Lye DC, Thein TL, Dimatatac F, Tan AS, Leo YS 2013. Implications of discordance in world health organization 1997 and 2009 dengue classifications in adult dengue. *PLoS One*, 8: e60946.

Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, Jr., Srikiatkachorn A 2007. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am J Trop Med Hyg*, 77: 910-913.

Gollins SW, Porterfield JS 1986. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: effects of pH and ammonium chloride. *J Gen Virol*, 67 (Pt 9): 1941-1950.

Gomes AF, Nobre AA, Cruz OG 2012. Temporal analysis of the relationship between dengue and meteorological variables in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2009. *Cad Saude Publica*, 28: 2189-2197.

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

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

Gubler D, Kuno G, Markoff L 2007. Flaviviruses. In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*, 5 ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 1153-1252.

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

Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 10: 100-103.

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, Velez M, Oliver A 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 33: 158-165.

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.

Guy B, Saville M, Lang J 2010. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin*, 6.

Guzman MG, Alvarez A, Vazquez S, Alvarez M, Rosario D, Pelaez O, Cruz G, Rodriguez R, Pavon A, Gonzalez A, Morier L, Ruiz D, Kouri G, Halstead SB 2012. Epidemiological studies on dengue virus type 3 in Playa municipality, Havana, Cuba, 2001-2002. *Int J Infect Dis*, 16: e198-203.

Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*, 158: 1445-1459.

Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, Cabrera MV, Kouri G 1999. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis*, 3: 130-135.

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 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*, 27: 1-13.

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

Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, de los Reyes J, Acevedo F 1996. [Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas]. *Bol Oficina Sanit Panam*, 121: 102-110.

Hadinegoro SR 2012. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health*, 32 Suppl 1: 33-38.

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.

Halstead SB 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica*, 20: 407-415.

Halstead SB 2012. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health*, 32 Suppl 1: 5-9.

Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg*, 32: 154-156.

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

Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE 1982. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*, 31: 830-836.

Holmes EC, Twiddy SS 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 3: 19-28.

Hss AS, Koh MT, Tan KK, Chan LG, Zhou L, Bouckenooghe 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.

Igarashi A 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*, 40: 531-544.

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*, 40: 418-427.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage on the Internet], Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011 [updated November 29, 2013; cited 2013 October 23]. 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.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 43: 4977-4983.

Jones M, Davidson A, Hibbert L, Gruenwald P, Schlaak J, Ball S, Foster GR, Jacobs M 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J Virol*, 79: 5414-5420.

Khromykh AA, Varnavski AN, Sedlak PL, Westaway EG 2001. Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: evidence derived from the use of DNA-based 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.

- Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*, 67: 375-380.
- Kow CY, Koon LL, Yin PF 2001. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. *J Med Entomol*, 38: 475-479.
- 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.
- 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.
- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ 1991. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods*, 33: 101-113.
- Lambrechts L 2011. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*, 27: 111-114.
- 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 2003. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 61: 67-99.
- 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.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentim F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- 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, de Filippis AM, Limonta D, dos Santos FB 2011. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e1147.

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>.

Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS 2001. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol*, 63: 143-149.

Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS 2003. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*, 69: 82-90.

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.

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.

Macedo GA, de Araujo JM, Schatzmayr HG, Costa FA, de Filippis AM, Santos FB, Nogueira RM 2013. Virological surveillance for early warning of dengue epidemics in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 107: 141-146.

Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS 1991. Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis*, 164: 294-301.

Medronho RA 2008. Dengue no Brasil: desafios para o seu controle. *Cad Saude Publica*, 24: 948-949.

Melo MS, Barreto FR, Costa Mda C, Morato VC, Teixeira MG 2010. Progression of dengue virus circulation in the State of Bahia, Brazil, 1994-2000. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43: 139-144.

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.

Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG 1993. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 35: 149-154.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol*, 14: 183-189.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2010 [updated November 29, 2013; cited 2013 June 21]. Informe epidemiológico da Dengue - Semanas de 01 a 52 de 2009. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2011 [updated November 29, 2013; cited 2013 August 10]. Balanço Dengue - Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2012 [updated November 29, 2013; cited 2013 November 6]. Casos de Dengue, Brasil. Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1997 a 2011. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dengue_classica_90_11_10_02_12.pdf.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2013 [updated November 30, 2013; cited 2013 December 3]. Sistema de informação de agravos de notificação - Dengue. Available from: http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/dengue/bases/dengueb_rnet.def.

Ministério da Saúde [homepage on the Internet], Brasília: Governo Federal do Brasil; 2014 [updated January 5, 2014; cited 2014 January 23]. 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.

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.

Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot CC, Tesh RB, Weaver SC 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerg Infect Dis*, 10: 1790-1796.

Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus PT, McMichael A, Malasit P, Screaton G 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*, 9: 921-927.

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.

Narvaez F, Gutierrez G, Perez MA, Elizondo D, Nunez A, Balmaseda A, Harris E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of Dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis* [serial on the Internet], 2011 3210746]; 5(11):[e1397 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087348>.

Nawa M, Takasaki T, Yamada KI, Akatsuka T, Kurane I 2001. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods*, 92: 65-70.

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

Nogueira RM 2008. Diagnóstico laboratorial específico e diagnóstico imunológico da dengue. In LJ Souza, *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, 2 ed., Rubio, Rio de Janeiro, p. 97-108.

Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 925-926.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85: 253.

Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimaraes FR, de Araujo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G, Jr., Miagostovich MP 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis*, 11: 1376-1381.

Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG 1991. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86: 269.

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.

Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Jr., Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, Schatzmayr HG, Tanuri A, Ribeiro Nogueira RM 2010. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 16: 576-578.

Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL 1983. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 25: 53-54.

Pan American Health Organization 1997. The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. *Rev Panam Salud Publica*, 1: 68-72.

Pan american Health Organization 1998. Plan Continental de ampliación e intensificación del combate a *Aedes aegypti*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 3: 124-130.

Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect*, 11: 1177-1185.

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.

Pessanha JEM, Caiaffa CC, César CC, Proietti FA 2009. Avaliação do Plano Nacional de controle da dengue. *Cad Saude Publica*, 25: 1637-1641.

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.

Race MW, Fortune RA, Agostini C, Varma MG 1978. Isolation of dengue viruses in mosquito cell cultures under field conditions. *Lancet*, 1: 48-49.

Race MW, Williams MC, Agostini CF 1979. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73: 18-22.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229: 726-733.

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.

Rigau-Perez JG 2000. Bailey K. Ashford, more in his remembrance. *P R Health Sci J*, 19: 51-55.

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.

Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA 2011. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e935.

Romanos MTV 2008. Febre Amarela e Dengue. In NSO Santos, MTV Romanos, MD Wigg, *Introdução à virologia humana*, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 399-409.

Rosen L 1977. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 26: 337-343.

Ross TM 2010. Dengue virus. *Clin Lab Med*, 30: 149-160.

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

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, Jiwariyavej V, Dulyachai W, Pengsaa K, Wartel TA, Moureau A, Saville M, Bouckennooghe A, Viviani S, Tornieporth NG, Lang J 2012. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet*, 380: 1559-1567.

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.

Salazar MI, Richardson JH, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol*, 7: 9.

San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, Guzman MG 2010. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*, 82: 128-135.

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.

Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81: 245-246.

Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte [homepage on the Internet], Natal: Governo do Estado do Rio Grande do Norte; 2010 [updated November 19, 2013; cited 2013 July 13]. Boletim Epidemiológico Dengue - 2010. Available from: http://www.portal.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap/saude_destaque/enviados/boletim_dengue_2010.pdf.

Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte [homepage on the Internet], Natal: Governo do Estado do Rio Grande do Norte; 2013 [updated November 19, 2013; cited 2013 November 30]. Boletins epidemiológicos. Available from: <http://www.saude.rn.gov.br/Conteudo.asp?TRAN=ITEM&TARG=7549&ACT=&PAGE=0&PARM=&LBL=Boletins+Epidemiol%F3gicos>.

Silva Júnior JB, Pimenta Júnior FG 2008. Epidemiologia da Dengue. In LJ Souza, *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, 2 ed., Rubio, Rio de Janeiro, p. 12-35.

Sim S, Ramirez JL, Dimopoulos G 2012. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. *PLoS Pathog*, 8: e1002631.

Souza IC, Vianna RP, Moraes RM 2007. Modeling of dengue incidence in Paraíba State, Brazil, using distributed lag models. *Cad Saude Publica*, 23: 2623-2630.

Souza LJ, Zagne SMO, Siqueira EWS, Bastos DA, Gonçalves PA, Zagne LO 2008. Aspectos clínicos, manifestações típicas e atípicas e dengue na gravidez. In LJ Souza, *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*, 2 ed., Rubio, Rio de Janeiro, p. 45-65.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*, 71: 8475-8481.

Sudiro TM, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanaroj S, Rothman AL, Raengsakulrach B, Janus J, Kurane I, Ennis FA 1997. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *Am J Trop Med Hyg*, 56: 424-429.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28: 2731-2739.

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

Tauil PL 2002. [Critical aspects of dengue control in Brazil]. *Cad Saude Publica*, 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.

Technelysium Pty Ltd. [homepage on the Internet], South Brisbane [cited 2013 March 12]. Chromas Lite Version 2.1. Available from: www.technelysium.com.au/chromas_lite.html.

Teixeira MG, Costa MC, Coelho G, Barreto ML 2008. Recent shift in age pattern of dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14: 1663.

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.

Teles FR, Prazeres DM, Lima-Filho JL 2005. Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol*, 15: 287-302.

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.

Tesh RB 1979. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am J Trop Med Hyg*, 28: 1053-1059.

Travassos da Rosa AP, Vasconcelos PF, Travassos da Rosa ES, Rodrigues SG, Mondet B, Cruz AC, Sousa MR, Travassos da Rosa JF 2000. Dengue epidemic in Belem, Para, Brazil, 1996-97. *Emerg Infect Dis*, 6: 298-301.

Trent D, Shin J, Hombach J, Knezevic I, Minor P 2010. WHO Working Group on technical specifications for manufacture and evaluation of dengue vaccines, Geneva, Switzerland, 11-12 May 2009. *Vaccine*, 28: 8246-8255.

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.

Van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts BL, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM 2007. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*, 81: 12019-12028.

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.

Vasilakis N 2013. *The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia*. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, Bangkok, Thailand.

Vasilakis N, Shell EJ, Fokam EB, Mason PW, Hanley KA, Estes DM, Weaver SC 2007. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology*, 358: 402-412.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis B, Nimmanitya S, Suntayakorn S, Endy T, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*, 181: 2-9.

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.

Wikramaratna PS, Simmons CP, Gupta S, Recker M 2010. The effects of tertiary and quaternary infections on the epidemiology of dengue. *PLoS One*, 5: e12347.

Winkler G, Maxwell SE, Ruemmler C, Stollar V 1989. Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*, 171: 302-305.

Woke PA 1937. Comparative effects of the blood of different species of vertebrates on egg production of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*, 17: 729-745.

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.

World Health Organization. 1997. *Dengue haemorrhagic fever : diagnosis, treatment, prevention, and control*. 2nd ed., World Health Organization, Geneva, viii, 84 p. pp.

World Health Organization. 2012. *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020*. World Health Organization, Geneva, v + 35 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.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Bix DL, Hayes CG, Frankel SS 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*, 6: 816-820.

Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Kurane I 2002. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J Clin Virol*, 24: 203-209.

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