



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DO SOROTIPO 1 DE VÍRUS DENGUE
ISOLADOS NO CEARÁ NO ANO DE 2011

FORTALEZA-CE

2013

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DO SOROTIPO 1 DE VÍRUS DENGUE ISOLADOS
NO CEARÁ NO ANO DE 2011

Dissertação apresentada ao curso de curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto

FORTALEZA-CE

2013

MORGANA MARIA DE OLIVEIRA BARBOZA

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DO SOROTIPO 1 DE VÍRUS DENGUE ISOLADOS
NO CEARÁ NO ANO DE 2011

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Justa Pires Neto
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Danielle Malta Lima
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo
Laboratório de Saúde Pública do Estado do Ceará –LACEN/CE

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará

À Deus, pelo amor que recebemos, pela paz que nos concede, pela luz que ilumina nossos caminhos e pelo conforto quando necessário.

Ao meu orientador, Dr. Roberto da Justa Pires Neto, pela confiança, amizade e dedicação.

A minha linda Zuk (in memoriam), eterna no meu coração, por compartilhar comigo a sua linda presença.

A minha família, essencial em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Patologia, na pessoa da Profa. Dra. Margarida de Lima Pompeu e do Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas, pelo compromisso com as atividades relacionadas ao curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de estudos.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará, especialmente a Dra. Fernanda Montenegro, Ms. Anne Caroline, as técnicas de laboratório Aline e Adriana, Dr. Napoleão Monte, Dr. Danúbio Andrade e Dr. Ricardo pelo apoio logístico, técnico e científico, mas também pela amizade e companheirismo.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Dr. Ricardo Balbino, pela oportunidade de aprofundar o conhecimento nas atuais ferramentas utilizadas em bioinformática e ao Ms. Marcus Batista por dedicar seu tempo em preciosas discussões a respeito deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Roberto da Justa Pires Neto, por ser um profissional incrível, que apesar de tantos compromissos sempre dedicou alguns minutos do seu dia para discutirmos sobre nosso trabalho. Que sempre visualizou com positividade cada resultado em meio a tantos desencontros, nunca desanimando.

À Prof. Dra. Danielle Malta, que apoiou este projeto desde o início e à Prof. Dra. Jânia Teixeira que, por trabalhar com lisura, permitiu a aquisição de parte dos insumos, essenciais para a realização dos experimentos.

Aos membros da banca, por contribuírem com a qualidade deste trabalho.

Aos professores dos cursos de Pós-Graduação em Patologia e Microbiologia Médica por todo o aprendizado.

Aos meus amigos e pesquisadores do Laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará pelo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos da universidade que tornam os dias mais leves.

À minha família linda que torce, reza e vibra comigo. Por toda a força que eles me dão, por terem sido pacientes nos momentos em que precisei me recolher e por serem grandes incentivadores de todo o trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Provai e Vede como o Senhor é bom, feliz de
quem no seu amor confia!

(Sl 34:9)

RESUMO

O vírus da dengue (VDEN) é responsável pela principal arbovirose da atualidade. As manifestações clínicas da dengue variam amplamente e uma das hipóteses que tentam explicar a gravidade da doença se concentra em variações genéticas nos vírus. Os VDEN são classificados em quatro sorotipos antígenicamente distintos e desde a década de 80 são observadas variações dentro dos sorotipos, posteriormente subdivididos em genótipos. No Brasil, apenas um genótipo de VDEN-1 circula no país. Sua introdução no Estado do Ceará, em 1986, provocou diversas epidemias. Após um silêncio epidemiológico, este sorotipo volta a circular no Estado e, em 2011, é responsável por uma das maiores epidemias registradas, coincidindo com o aumento do número de casos graves de dengue e mudanças no padrão epidemiológico da doença. É neste cenário que realizamos a caracterização molecular de isolados de VDEN-1 no Estado do Ceará no ano de 2011. Foi extraído o RNA do vírus de trinta e três (33) amostras de soro de pacientes sabidamente positivos para dengue, confirmados por isolamento viral seguido por imunofluorescência. *Primers* delimitando a região de junção E/NS1 foram utilizados para amplificação por RT-PCR em única etapa. O sequenciamento foi realizado no ABI Prism 3130 (Biosystems). As sequências geradas foram analisadas e editadas nos programas Gap4, Trev e MEGA v.5. Para o alinhamento múltiplo que incluía outras sequências de VDEN-1 isolados no Brasil e no mundo foi usado o programa Muscle. Na análise filogenética utilizamos os métodos de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (MV), Máxima Parsimônia (MP) e Inferência Bayesiana, após definição do modelo evolutivo utilizando o programa JModeltest. O resultado da análise da região de junção E/NS1 de 17 sequências de VDEN-1 isolados em 2011 mostrou diversas mutações no terceiro códon, com 3 substituições sinônimas e uma não-sinônima (The:Ala). A árvore gerada pelo método Bayesiano mostrou três linhagens distintas de VDEN-1 no Ceará.

Palavras-chave: Vírus da Dengue-1, E/NS1, Caracterização Molecular.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is responsible for leading arboviral today. The clinical features of dengue fever vary widely and one of the hypotheses that attempt to explain the severity of the disease focuses on genetic variation in viruses. The DENV are classified into four antigenically distinct serotypes and since the 80's is observed variation within serotypes, further subdivided into genotypes. In Brazil, only one genotype DENV-1 circulating in the country. Its introduction in the state of Ceara, in 1986, caused several epidemics. After an epidemiological silence, this serotype return at state and, in 2011, is responsible for one of the biggest epidemics recorded, coinciding with the increase in the number of severe cases of dengue and changes in the epidemiological pattern of the disease. It is in this scenario that we perform molecular characterization of isolates of DENV-1 in the state of Ceara in 2011. RNA was extracted from virus of thirty-three (33) serum samples from patients known to be positive for dengue, confirmed by virus isolation followed by immunofluorescence. Primers delimiting the E/NS1 junction region were used for amplification by RT-PCR in a single step. Sequencing was performed on the ABI Prism 3130 (Biosystems). The sequences generated were analyzed and edited in programs Gap4, Trev and MEGA v.5. For the multiple alignment that included other sequences DENV-1 isolates in Brazil and the world was using the program Muscle. In phylogenetic analysis methods used Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML), Maximum Parsimony (MP) and Bayesian Inference, after defining the evolutionary model using the program JModeltest. The result of the analysis of E/NS1 junction region of 17 DENV-1 sequences isolated in 2011 showed several mutations in the third codon with three synonymous and one non-synonymous (The:Ala) replacements. The tree generated by the Bayesian method showed three distinct lineages of DENV-1 in Ceara.

Keywords: Dengue Virus-1, E/NS1, Molecular Characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Áreas de risco para transmissão da dengue (em azul). Em vermelho, relato de casos de dengue em 2012.....	18
Figura 2.	Distribuição do mosquito <i>Ae. aegypti</i> nas Américas antes do programa de controle de vetores (A), durante (B) e após seu desmanche (C).....	19
Figura 3.	Incidência dos casos confirmados de dengue no Ceará, por faixa etária, 2010 a 2013.....	21
Figura 4.	Percentual de isolamento de VDEN por sorotipo no Ceará de 2001 a 2012.....	23
Figura 5.	Casos confirmados de DCC no Ceará, 2001-2013.....	23
Figura 6.	Proposta para a classificação de casos de dengue.....	25
Figura 7.	Representação esquemática do ciclo de transmissão da dengue.....	29
Figura 8.	Representação esquemática do vírus da dengue nas fases A: imatura (vermelho) e B: madura (verde).....	30
Figura 9.	Representação esquemática do genoma do vírus da dengue.....	31
Figura 10.	Representação esquemática da replicação do VDEN.....	33
Figura 11.	Efeito citopático de VDEN em células C6/36 iniciado nos dias 4-5 de infecção. A: Vesículas contendo partículas virais. B: Virions e nucleocapsídeo no RE.....	34
Figura 12.	A e B. Plataforma magnética MiniMAG®. C. Agitador térmico compacto (BioMérieux, Durham, NC).....	41
Figura 13.	A: Preparo do mix para RT-PCR. Extraído de Qiagen One-Step hand Book. B: Termociclador utilizado para a reação de RT-PCR e seqüenciamento.....	42
Figura 14.	Eletroforese. A: Resultado da RT-PCR das amostras D26-D33 para a região E/NS1 e amostra D03 para a região C/prM. B: Resultado da RT-PCR das amostras D21-D25 para a região E/NS1 e amostras D09, D21 e D22 para a região C/prM.....	46
Figura 15.	Visualização da sequência D28 E/NS1 <i>forward</i> no programa TREV 1.9.....	46
Figura 16.	Identificação de motivos TGTGTG em isolados recentes de VDEN-1 utilizando o programa MEGA v5.0.....	48

Figura 17.	Análise filogenética da região de junção E/NS1 gerada pelo método de Inferência Bayesiana utilizando como modelo evolutivo o TIM2EF+G escolhido pelo programa JModeltest v3.0.....	50
Figura 18.	Análise filogenética da região de junção E/NS1 construído pelo método de Máxima Verossimilhança no programa PhyML v3.0. usando como modelo o TIM2EF+I+G escolhido pelo programa JModeltest v.3.0. VDEN-2 foi utilizado como <i>outgroup</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição dos genótipos de VDEN-1 de acordo com análise da região de junção E/NS1.....	35
Tabela 2.	Características das Amostras.....	39
Tabela 3.	Descrição dos <i>primers</i> utilizados.....	42
Tabela 4.	Sequências depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética.....	44
Tabela 5.	Número de acesso no GenBanK das sequências geradas neste estudo...	47
Tabela 6.	Substituições de Sinônimas e Não Sinônimas de Aminoácidos das Cepas de VDEN-1 isoladas no Ceará em 2011.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
cDNA	DNA complementar
DC	Dengue clássica
DCC	Dengue com Complicações
D.C.	Depois de Cristo
DENV	<i>Dengue vírus</i> – Vírus da Dengue
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>f</i>	<i>forward</i> – sentido positivo do ácido nucléico
FC	Fixação do complemento
FHD	Febre hemorrágica da dengue
Ig	Imunoglobulina
IH	Inibição da hemaglutinina
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MP	Máxima parsimônia
MV	Máxima verossimilhança
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
Nm	nanômetro
NS	<i>Nonstructural</i> – Não estrutural
ORF	<i>Open reading frame</i> – fase aberta de leitura

<i>r</i>	<i>reverse</i> – sentido negativo do ácido nucléico
RNA	<i>Ribonucleic Nucleotide Acid</i> – Ácido Ribonucléico
RNC	Região não codificante
RPM	Rotação por minuto
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativo – Tempo real
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SSC	Síndrome do choque da dengue
ssRNA	<i>Single stranded ribonucleic nucleotide acid</i> – RNA de fita simples
T.B.E.	Tris - ácido bórico - EDTA
TN	Teste de neutralização
Tris-Cl	Tris (hidroximetil) aminometano
VDEN	Vírus da Dengue
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1.Histórico.....	16
1.2. Epidemiologia.....	17
1.2.1. Dengue nas Américas.....	18
1.2.2. Dengue no Brasil.....	20
1.2.2. Dengue no Ceará.....	21
1.3. Doença.....	24
1.4.Patogênese.....	26
1.5. Transmissão da dengue.....	27
1.6.Agente Etiológico.....	29
1.6.1. Classificação.....	29
1.6.2.Morfologia.....	29
1.7. Genoma.....	30
1.7.1. Proteínas Estruturais.....	31
1.7.2. Proteínas Não-Estruturais.....	32
1.8. Replicação.....	32
1.9. Variação Genômica em Vírus da Dengue.....	34
2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO.....	37
3. OBJETIVO GERAL.....	38
3.1. Objetivos Específicos.....	38
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Tipo de Estudo.....	39
4.2.População e Local do Estudo.....	39
4.3.Aspectos Éticos.....	39
4.4. Seleção das Amostras.....	39
4.5. Extração do RNA Viral.....	40
4.6. Transcrição Reversa e Amplificação do cDNA.....	41
4.7. Sequenciamento.....	42
48. Purificação.....	43

4.9. Análise das Sequências.....	43
4.10. Escolha do Modelo Evolutivo e Análise Filogenética.....	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Características Nucleotídicas e Aminoacídicas da Região E/NS1 de VDEN-1.....	47
5.2. Análise Filogenética.....	49
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Os primeiros relatos de dengue datam de 265-420 D.C. em enciclopédia chinesa publicada durante a dinastia Chin. Nas Antilhas Francesas, em 1635, e no Panamá, em 1699, foram relatados surtos de uma doença compatível com dengue, contudo, não há consenso quanto ao agente etiológico que provocou a doença, sendo as ocorrências da Filadélfia, em 1778, e da ilha de Java, em 1779, consideradas as mais bem documentadas antes do isolamento viral. Somente no final do século XVIII foram descritas as primeiras epidemias de dengue, ocorrendo quase simultaneamente em países da Ásia, África e América do Norte. No século seguinte, ainda eram comuns relatos de epidemias de dengue na América, Caribe, Ásia, Austrália e Pacífico (NOBUCHI, 1979; GUBLER, 1997; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

O termo dengue originou-se do suali '*Ki denga pepo*' que significa 'cãibram súbita causada por mau espírito' e foi incorporado a literatura médica em 1869 baseado na epidemia ocorrida entre 1827-1828 no Caribe, cuja manifestação clínica envolvia exantema associado a artralgia (HALSTEAD, 1980).

A transmissão da dengue foi inicialmente observada pelos chineses que associaram vetores artrópodes que utilizam água em algum momento do seu desenvolvimento biológico com a doença (GUBLER, 1998). Todavia, a demonstração científica deu-se pela primeira vez por Graham, em 1902, sendo suportado posteriormente por estudos de Ashburn e Craig, em 1907. A identificação do mosquito *Aedes aegypti*, Lineu, 1762, como o principal vetor da doença ocorreu em 1906 por Bancroft sendo confirmado por Cleland e colaboradores em 1918. Estudos posteriores identificaram outros mosquitos do subgênero *Stegomyia*, como *Aedes albopictus*, Skuse, 1894, *Aedes scutellaris*, Walker, 1859 e *Aedes polynesiensis*, Marks, 1952, como possíveis vetores na transmissão da doença (ROSEN *et al*, 1954; MARTINS *et al*, 2006; MARTINS *et al*, 2010; MARTINS V.E.P. *et al*, 2012).

Ashburn e Craig ainda identificaram o agente etiológico da dengue como um organismo infeccioso filtrável encontrado no sangue de voluntários. Posteriormente, os pesquisadores Siler e Simmons determinaram o período de incubação do vírus em mosquitos (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Durante a segunda guerra mundial pesquisadores americanos, japoneses e australianos iniciaram pesquisa básica para melhor compreensão da dengue. Assim, em 1943 Kimura e Hotta isolaram pela primeira vez o vírus causador da doença (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em 1952, Sabin detectou dois sorotipos diferentes do vírus da dengue (VDEN) por teste de inibição da hemaglutinação. A cepa protótipo para VDEN-1 foi isolada no Havaí e apresentava semelhança antigênica com os vírus isolados em Calcutá e Nova Guiné. Outros vírus isolados em Nova Guiné, que não pertenciam ao mesmo grupo antigênico daqueles isolados anteriormente, foram classificados como VDEN-2, cujo protótipo é a cepa nova Guiné C (GUBLER, 1997). Durante a epidemia nas Filipinas, registrando os primeiros casos de febre hemorrágica da dengue (FHD), uma forma grave de dengue, outros dois sorotipos foram identificados e classificados como VDEN-3 e VDEN-4, tendo como protótipo as cepas H87 e H241, respectivamente (GUBLER, 1998).

As perturbações ecológicas trazidas com a segunda guerra mundial criaram um ambiente propício para a transmissão de arboviroses e outras doenças transmitidas por artrópodes, desta forma, houve aumento da transmissão da doença. A co-circulação de diferentes sorotipos virais culminou na emergência de epidemias de FHD nas décadas de 50 e 60 no sudeste da Ásia (GUBLER, 1997, GUBLER 1998).

A pandemia de dengue foi iniciada no sudeste asiático e intensificou-se nos últimos anos envolvendo áreas tropicais da Ásia, Oceania, África e Américas. Desde 1980 a dengue tem emergido como a mais importante arbovirose que acomete humanos, e com a crescente expansão do vetor e dos diferentes sorotipos virais aumentando o número de casos de FHD em muitos outros países, a doença é considerada um importante problema de saúde pública global (GUBLER, 1995; GUBLER 1998).

1.2. Epidemiologia

A dengue é uma doença muito antiga que tem sido relatada historicamente de forma epidêmica. A partir de 1980 um aumento dramático de epidemias de dengue é registrado em áreas tropicais e subtropicais seguindo a expansão do vetor, do vírus, o aumento da densidade populacional e o desenvolvimento de áreas hiperendêmicas, onde co-circulam os quatro sorotipos virais. Nestas áreas há um aumento no número de casos de FHD (GUBLER, 1997; GUBLER, 1998) (figura 1).

No início do século XXI a dengue está entre as mais importantes doenças emergentes em países em desenvolvimento nos trópicos (GUBLER, 2002). Atualmente, cerca de metade da população mundial está em risco de contrair a doença e cerca de 50-100 milhões de pessoas são infectadas por ano (WHO, 2012).



Figura 1. Áreas de risco para transmissão da dengue (em azul). Em vermelho, relato de casos importados de dengue em 2012. Fonte: *Center of Disease Control*.

Formas graves de dengue foram relatadas pela primeira vez no sudeste da Ásia no final da II Guerra Mundial, em Manila, nas Filipinas. Na década de 70 a doença tinha se espalhado pelo sudeste da Ásia afetando o Pacífico e se tornou a principal causa de hospitalização e morte de crianças na região (GUBLER, 1998; 2002).

À introdução de novos sorotipos virais seguem-se grandes epidemias com altas taxas de incidência e numerosos casos registrados. Epidemias explosivas de dengue ocorreram com a entrada de novos sorotipos entre os anos de 1980-1990 na Ásia e Américas. Hoje a doença é endêmica em mais de 124 países da África, Américas, Mediterrâneo oriental, sudeste da Ásia e Pacífico ocidental (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; WHO, 2012; DOS SANTOS *et al*, 2011).

1.2.1. Dengue nas Américas

Com a interrupção do programa de erradicação da febre amarela nas Américas na década de 70, houve a reintrodução do vetor re-infestando os países em que tinha sido erradicado. A expansão do mosquito foi acompanhada pela dispersão de VDEN (GUBLER, 1998) (figura 2).

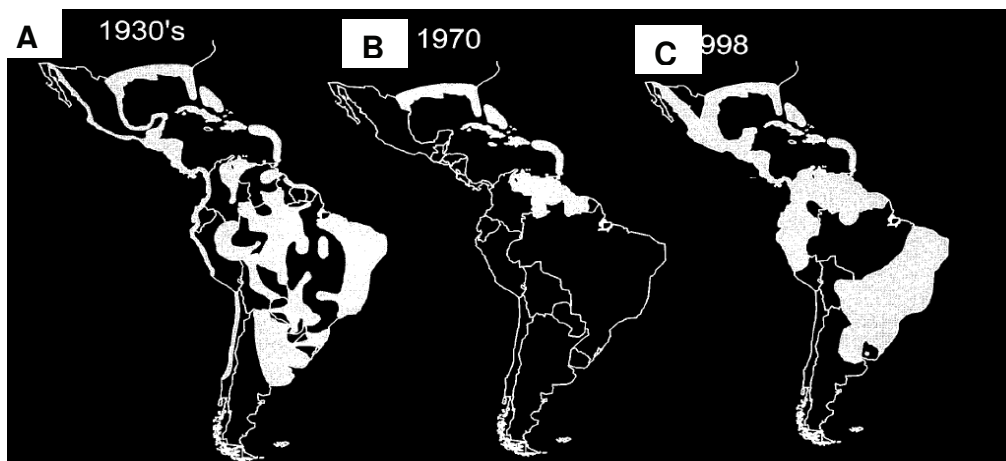


Figura 2. Distribuição do mosquito *A. aegypti* nas Américas antes do programa de controle de vetores (A), durante (B) e após seu desmanche (C). Fonte: Modificado a partir de Gubler, 1998.

Entre 1977 e 1978 epidemias causadas pelo VDEN-1 ocorreram na Jamaica, Cuba, Porto Rico e Venezuela. É provável que este sorotipo tenha circulado nas Américas na década de 40 e sua re-introdução, em 1977, foi acompanhada de ampla dispersão deste sorotipo em ilhas do Caribe e nas Américas Central e do Sul. No leste do Caribe, em 1981, o VDEN-4 foi responsável por epidemias naquela região e sua dispersão foi semelhante ao VDEN-1 (Gubler, 1997). Deste então, novas variantes de VDEN foram introduzidas nas Américas. No mesmo ano, a primeira epidemia de FHD nas Américas, ocorrida em Cuba, foi registrada após a introdução de VDEN-2 proveniente do sudeste da Ásia (GUBLER, 1997; GÓMEZ-DANTÉS, WILLOQUET, 2009).

A segunda maior epidemia de FHD nas Américas ocorreu entre 1989-1990 na Venezuela. Foram isolados VDEN-1, VDEN-2 e VDEN-4 dos pacientes. O mesmo genótipo (asiático) de VDEN-2 isolado em Cuba em 1981 foi identificado na Venezuela (GUBLER, 1997; GUZMÁN, KOURÍ, GONZÁLEZ, 1999).

Em Nicarágua e no Panamá cepas de VDEN-3 causaram grandes epidemias no ano de 1994. Estes isolados apresentavam semelhanças genéticas com cepas isoladas de pacientes com FHD no Sri Lanka e na Índia, evidenciando a dinâmica da transmissão da dengue (GUBLER, 1997).

Em 2010 foram registrados mais de 1,6 milhões de casos de dengue nas Américas, destes, 49.000 são de casos graves (WHO, 2012).

1.2.2. Dengue no Brasil

No Brasil há referência de dengue desde 1846, mas os primeiros relatos científicos datam de 1916 em São Paulo e posteriormente em 1923 no Rio de Janeiro sem, contudo, haver confirmação laboratorial (BRASIL, 2005; BARRETO, TEIXEIRA, 2008).

A primeira confirmação de epidemia de dengue no Brasil se deu em 1981 na cidade de Boa Vista-RO com o isolamento de VDEN-1 e VDEN-4, porém, apenas em 1986 com a entrada do VDEN-1 no estado do Rio de Janeiro a doença tornou-se um importante problema de saúde pública, disseminando-se para outros estados da Federação (BRASIL, 2005; CÂMARA *et al*, 2007; TEIXEIRA *et al*, 2009).

Em 1990, também pelo Rio de Janeiro, o VDEN-2 foi introduzido no país e os primeiros casos de FHD foram descritos (TEIXEIRA *et al*, 2009). Os grandes centros urbanos do sudeste e nordeste registraram várias epidemias entre os anos de 1990 e 2000 (BRASIL, 2005).

O VDEN-3 foi inicialmente isolado no estado do Rio de Janeiro em 2000 e sua ampla e rápida dispersão ocorreu em 2002. A co-circulação de mais de um sorotipo em uma dada região, de acordo com a hipótese da infecção sequencial de Halstead (1980), representa um fator de risco importante para a ocorrência de FHD através do fenômeno de imunoamplificação, que será posteriormente abordada. De fato, a dispersão do VDEN-3 naquele ano foi acompanhada de um aumento dramático no número de casos de DC (dengue clássica) e FHD e o número de óbitos por dengue supera o número de óbitos por malária no Brasil desde então (FIGUEIREDO *et al*, 2008; TEIXEIRA *et al*, 2009, BRASIL, 2010).

Em 2004, co-circulavam os sorotipos VDEN-1, VDEN-2 e VDEN-3 em 23 dos 27 estados da federação. E, em 2008, o VDEN-4 foi re-introduzido no país pelo estado do Amazonas, sendo registrado em seguida pelos estados do Pará, Piauí, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo até o primeiro semestre de 2011 (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010).

No Brasil, epidemias de DC e FHD são bem caracterizadas por apresentar maior incidência na população adulta (SIQUEIRA *et al*, 2005; TEIXEIRA *et al*, 2009), no entanto, a partir de 2008 a epidemiologia da dengue no Brasil sofreu modificações que se tornaram mais evidentes com a epidemia explosiva no Rio de Janeiro que ocorreu naquele mesmo ano, apresentando maior incidência em crianças menores de 15 anos. Apesar da pouca visibilidade, essa mudança na faixa etária tem sido registrada desde 2007 em pacientes hospitalizados com FHD em todo o país (TEIXEIRA *et al*, 2009).

Com desmanche do programa de controle de vetores em 1970, o intenso processo de ocupação urbana e fluxo de viagens internacionais, além do clima tropical do Brasil que favorece a proliferação de *A. aegypti*, a doença expandiu-se no país. No início do século XXI, o Brasil ocupa a primeira posição no ranking internacional de notificações de casos de dengue com mais de 3 milhões de notificações entre 2000-2005 representando, sozinho, 61% de todos os casos contabilizados pela WHO (TEIXEIRA *et al*, 2009).

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificações (SINAN), entre 2011 e janeiro-abril de 2012, apontam maior concentração de casos notificados de dengue nos estados do Rio de Janeiro e Ceará, respectivamente (BRASIL, 2012).

1.2.3. Dengue no Ceará

A região nordeste é assolada por epidemias de dengue desde a introdução do vírus no país. De acordo com a literatura, o Ceará é o segundo estado a apresentar os maiores índices de casos de dengue registrados no Brasil (CUNHA *et al.*, 1998; CAVALCANTI *et al.*, 2010).

Foram identificados seis picos epidêmicos nos anos de 1987, 1994, 2001, 2008, 2011 e 2012 (VASCONCELOS *et al*, 1998; CEARÁ, 2013). Em 1986, o VDEN-1 foi introduzido no Estado e até 1993 foram registrados 53.593 casos de DC, apesar das autoridades de saúde do Estado estimarem cerca de 1 milhão de indivíduos afetados pela virose (VASCONCELOS *et al.*, 1998). A introdução do VDEN-2 em 1994 foi responsável por uma das maiores epidemias de dengue no Estado com 47.889 casos notificados e 14 mortes. Até 2001, co-circularam VDEN-1 e VDEN-2, ano em que se registrou nova epidemia com predominância de VDEN-2 no primeiro semestre e VDEN-1 no segundo semestre (ARAÚJO *et al*, 1996; SOUZA *et al.*, 1995; ARAÚJO, 2006b).

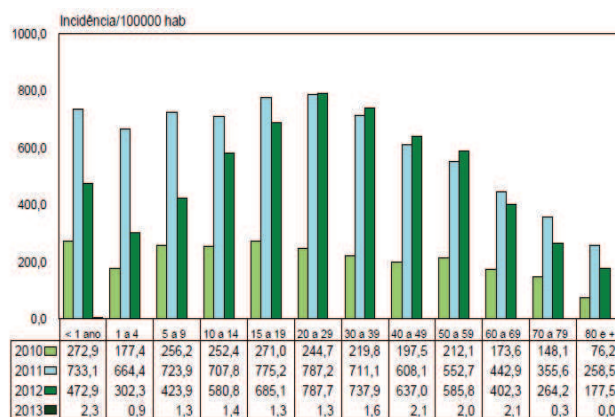


Figura 3. Incidência dos casos confirmados de dengue no Ceará, por faixa etária, 2010 a 2013*

Fonte: CEARÁ, 2013. *Dados de 2013 sujeitos à revisão.

Em março de 2002 o Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará-LACEN/CE isolou o VDEN-3, caracterizando o Estado do Ceará como região de alta endemicidade. No ano seguinte, um estudo clínico e epidemiológico de casos de FHD no Ceará destacou a diminuição da faixa etária de pacientes com dengue (CAVALCANTI *et al*, 2010) sendo posteriormente corroborado com os estudos de Cavalcanti *et al* (2011) e Pires-Neto *et al* (aguardando publicação [2013])¹. Este quadro se mantém no Estado do Ceará como mostra a figura 3, embora a situação no país evidencie nova mudança de faixa etária, com mediana de 42 anos (BRASIL, 2010; CEARÁ, 2013).

O VDEN-3 predominou até o ano de 2006, quando em 2007 o VDEN-2 voltou a circular no Estado com alta taxa de isolamento até 2009. No ano seguinte, foi registrada a maior epidemia de FHD e dengue com complicação (DCC) e, em análise filogenética de isolados de VDEN-2 no ano de 2008, foram identificadas linhagens diferentes do genótipo circulante (ARAÚJO, 2011; CAVALCANTI *et al*, 2011; CEARÁ, 2013).

Com a circulação dos três sorotipos e o aumento de municípios infestados por *A. aegypti* desde 2001, aumentou o risco de casos graves no Ceará sendo notificado no ano de 2008 quatrocentos e quarenta e oito (448) casos de FHD, o maior número de casos graves registrado no Estado (VASCONCELOS *et al.*, 1998; ARAÚJO *et al.*, 2006; CEARÁ, 2013).

É comum a circulação de mais de um sorotipo de VDEN em área endêmicas (ACOSTA *et al*, 2006), embora oscilações na prevalência de cada sorotipo sejam observadas. Normalmente um sorotipo predomina por um período de 2-4 anos, quando declina e emerge sorotipo diferente para substituí-lo (WHITEHORN, SIMMONS, 2011). Esse padrão tem sido observado no Ceará, embora a circulação simultânea de mais de um sorotipo também ocorra, como indica a figura 4.

Em 2010, o VDEN 1, cuja entrada no Ceará se deu em 1986, após um silêncio epidemiológico re-circula no Estado com taxa de isolamento de mais de 98%, registrando 63 casos de FHD com letalidade de 11,1% (CEARÁ, 2013).

Este sorotipo manteve-se predominante também durante o ano de 2011 com os maiores registros de DC (56.174) na história epidemiológica da dengue no Ceará. Foram confirmados 174 casos de FHD e 457 casos de DCC, com letalidade de 7,5 e 10,7, respectivamente, representando um importante aumento no número de casos graves de

¹PIRES-NETO, R. J. P.; S.L. B. SÁ; PINHO, S.C.; PUCCI, F.H.; TEÓFILO, C.R.; EVANGELISTA, P.D.; THÉ, C.S.; BEZERRA, D.E.G.; LIMA, J.C.S.; PONTES, H.J.; DAHER, E.F. COELHO, I.C.B. Dengue infection in children and adolescents: Clinical profile in a reference hospital in Northeast Brazil. Estudo aprovado, aguardando publicação.

dengue. Oitenta e nove (89) casos de DC para cada caso de FHD foram registrados naquele ano, onde também se registra o maior número de óbitos por DCC (figura 5) (CEARÁ, 2013).

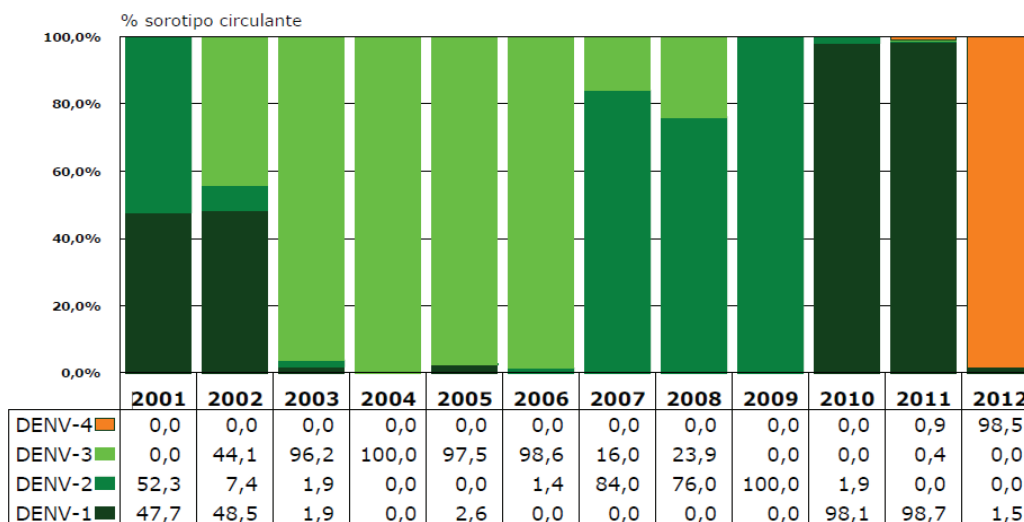


Figura 4. Percentual de isolamento de VDEN por sorotipo no Ceará de 2001 a 2012.
Fonte: CEARÁ, 2013.

Nos últimos dez anos são registrados casos de dengue todos os meses no estado do Ceará. O perfil de sorotipos circulantes tem variado consideravelmente e nos anos de 2010 e 2011, com predominância do VDEN-1. A re-circulação de VDEN-1 e a entrada de VDEN-4 representam um aumento do risco de aparecimento de casos de FHD e DCC em nosso meio (CEARÁ, 2013).

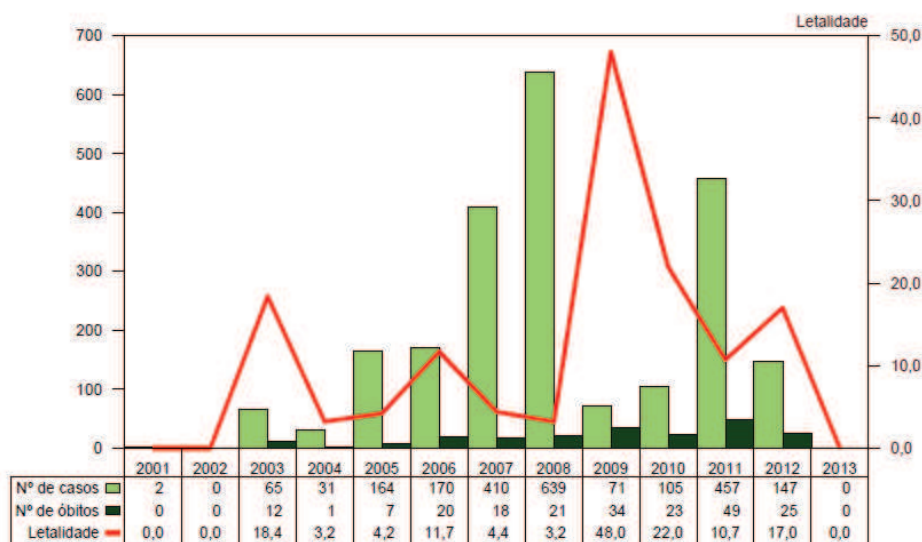


Figura 5. Casos confirmados de DCC no Ceará, 2001-2013* Fonte: CEARÁ, 2013. *Dados de 2013 sujeitos a alterações.

1.3. Doença

A dengue é uma doença febril aguda causada por quaisquer dos quatro sorotipos do VDEN. A infecção pode produzir um amplo espectro de apresentações clínicas variando desde infecções inaparentes até DC e febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD) (GUBLER, 1998; ROSS, 2010; WRIGHT, PRITT, 2012).

Os quatro sorotipos podem causar apresentação clínica similar, mais ou menos graves, dependendo de fatores relacionados ao vírus, estado imunológico, idade e componente genético do hospedeiro (GUBLER, 1998; TASSANEETRITHEP *et al*, 2003; MARTINS S.T. *et al*, 2012).

A infecção por um sorotipo confere proteção imunológica prolongada contra o sorotipo infectante e proteção parcial e temporária (3-6 meses) contra os demais sorotipos (MURREL, WU, BUTHER, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a dengue sintomática é classificada em febre indiferenciada, DC e FHD.

A DC é caracterizada por febre alta de início abrupto, comumente acompanhada de cefaléia, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, náusea, vômito, linfadenopatia e/ou exantema maculopapular que podem durar de 2-7 dias. É comum a prostração prolongada. Também podem estar presentes manifestações hemorrágicas como petéquias e púrpuras, além de sangramentos nas gengivas, epistaxe e sangramentos gastrointestinais (GULBER, 1998; ROSS, 2010; WHITEHORN, SIMMONS, 2001; MARTINS S.T. *et al*, 2012).

Na FHD, os sintomas iniciais são similares àqueles apresentados na DC, no entanto, por volta do 3-7 dia do início dos sintomas, coincidindo com a defervescência, há maior propensão para extravasamento vascular e hemorragias (WHITEHORN, SIMMONS, 2011) que associados a febre e trombocitopenia ($<100.000\text{mm}^3$) caracterizam a FHD. O extravasamento do plasma é o maior achado na FHD. Estudos indicam que o desconforto abdominal, um importante sinal de alerta para dengue grave, está relacionado a derrames cavitários (VPP 90%) (WHO, 1997; GUBLER, 1998; ROSS, 2010; WHITETHORN, SIMMONS, 2011; BRASIL, 2011; MARTINS S.T. *et al*, 2012). As crianças são mais acometidas com a FHD, indicando a fragilidade capilar e a baixa reserva compensatória neste grupo etário, onde a dor abdominal é um achado comum (WHITEHORNS, SIMMONS, 2011; PIRES-NETO *et al*, 2013¹). A perda crítica de plasma em pacientes com FHD caracteriza a

síndrome do choque da dengue (SCD) quando então aparecem sinais de insuficiência circulatória, pele fria, congestionada e pulso rápido e fraco (WHO, 1997; 2009).

A FHD é classificada em quatro grupos de acordo com a severidade da doença. Somando-se as manifestações descritas para DC e considerando os eventos em cadeia, o Grau I é caracterizado por hemorragia induzida (prova do laço); Grau II: hemorragias espontâneas leves; Grau III: colapso circulatório; Grau IV: choque profundo com ausência de pressão arterial (WHO, 1997; 2009).

Formas graves de dengue não consideradas na classificação da OMS de 1997 têm levado ao questionamento da definição de caso de DC e FHD/SCD. Assim, um estudo multicêntrico foi conduzido com a finalidade de propor nova classificação para a dengue (SRIKIATKHACHORN *et al*, 2011). Em 2009, a OMS considerou pertinente as propostas da nova classificação para dengue sem, contudo, abandonar a antiga classificação (WHO, 2009) (figura 6).

No Brasil, baseando-se na epidemiologia local e nos resultados de pesquisa sentinela realizada a pedido do Ministério da Saúde, todo caso de dengue grave que não se enquadra nos critérios da OMS de 1997 de FHD e cuja classificação como DC é insatisfatória é classificada por DCC (BRASIL, 2011). Os sinais indicativos de DCC são alterações no sistema nervoso central, insuficiência hepática, disfunção cardiorrespiratória, derrames cavitários, hemorragias digestivas, leucopenia, plaquetopenia e evoluções para óbito em casos suspeitos de dengue que não encerram os critérios de classificação de FHD (BRASIL, 2011).

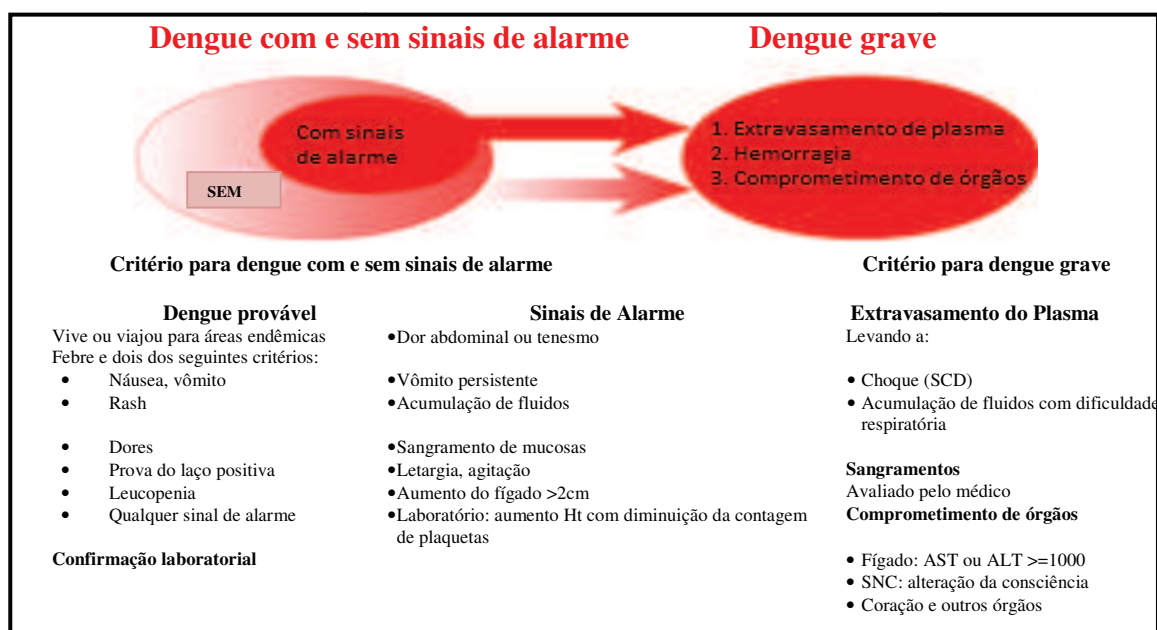


Figura 6. Proposta para a classificação de casos de dengue. Fonte: Modificado a partir de WHO, 2009.

1.4. Patogênese

A dengue é uma doença imunomediada em que a resposta do hospedeiro pode agravar a infecção e ainda causar danos ao hospedeiro. Formas mais graves de dengue são observadas durante o *clearance* viral (MURRELL; WU; BUTHER, 2011; WHITEHORN, SIMMONS, 2011).

Estudos de coorte realizados na Ásia e América Latina encontraram um maior percentual de FHD em infecções sequenciais (WHITEHORN, SIMMONS, 2011). A explicação para este fenômeno seria a presença de anticorpos não neutralizantes produzidos durante a infecção primária que amplificariam a replicação viral pela adição do receptor Fc (FcR) no processo de adsorção. Esta hipótese ficou conhecida por imunoamplificação dependente de anticorpo, do inglês *antibody-dependent enhancement* (ADE), que também está relacionada ao risco que crianças menores que 1 ano de idade têm em desenvolver FHD pela aquisição de imunoglobulinas G (IgG) pela via transplacentária (HALSTEAD, 1970; 1977; LEI *et al*, 2001).

Ao longo dos anos, foi adicionada à hipótese de Halstead (1970) outros aspectos da resposta imunológica que estariam contribuindo com a gravidade da doença. As interações entre as células apresentadoras de antígeno (célula dendrítica, macrófago) e linfócitos T desencadeando a resposta adaptativa e a consequente permanência de células T de memórias que reconhecem epítomos conservados e não conservados estariam envolvidas no extravasamento do plasma característico da FHD. A teoria do Pecado Antigênico Original, do inglês *Original Antigenic Sin*, foi observada na Tailândia, mostrando que em infecções graves de dengue as células T possuem baixa afinidade para o sorotipo infectante e alta afinidade para o sorotipo de infecções passadas (MCBRID, BIELEFELDT-OHMANN, 2000; MONGKOLSAPAYA *et al*, 2003; MARTINS S.T. *et al*, 2012).

A consequência da ativação de células T é a cascata de citocinas, especialmente citocinas pró-inflamatórias (MCBRIDE, BIELEFELDT-OHMANN, 2000). O efeito sinérgico de citocinas no endotélio contribui para o desenvolvimento do extravasamento do plasma (WHITEHORN, SIMMONS, 2011).

Outros fatores como a ativação do sistema complemento (SC) e mimetismo molecular também são sugeridos para a patogênese da dengue. A redução dos níveis dos componentes do SC é descrito para pacientes com formas graves de dengue. A proteína NS1

secretada da célula infectada pode ativar o SC e aumentar a infecção. Pesquisadores têm sugerido que a ativação do SC na superfície do endotélio contribui para o extravasamento vascular (AVIRUTNAN *et al*, 2006; 2010).

Com o desenvolvimento de auto-anticorpos na dengue foi proposto a teoria do mimetismo molecular, sendo sustentada pela similaridade entre uma sequência de 20 aminoácidos da proteína E com o plasminogênio humano (MARKOFF *et al*, 1991). Reações cruzadas entre fatores de coagulação e integrinas com a proteína NS1 também foram encontradas (FALCONAR, 1997). Em Belém-PA, 40% dos pacientes com dengue tinham anticorpos anti-nucleares (BICHARA, 2009). Manifestações auto-imunes relacionados à infecção por VDEN sugerem um papel desencadeador de auto-imunidade ao vírus (JARDIM *et al*, 2012).

A FHD também é encontrada em pacientes com infecções primárias por dengue. Assim, novas hipóteses foram apresentadas a fim de explicar a patogênese da FHD. Rosen (1977) explica que a evolução genética dos vírus dentro de cada um dos sorotipos, resultante de passagens sucessivas em hospedeiros humanos e em mosquitos, culmina no aparecimento de cepas mais virulentas, que infectam um número maior de células gerando mais virions e causando mais inflamação, além de evadir o sistema imunológico.

Diante de tantas variáveis, a hipótese de Kourí (1987) relaciona características do hospedeiro e do vírus associados a epidemiologia que levariam ao aparecimento de formas graves de dengue.

A ausência de um bom modelo animal que reproduza a doença tem sido obstáculo para a compreensão clara da patogênese da dengue (WHITEHORN, SIMMONS, 2011) embora camundongos BALB/c tenham sido recentemente indicados para o estudo experimental de DC e FHD (BARRETO-VIEIRA *et al*, 2012)

O grande número de publicações sobre as variáveis que estariam envolvidas na patogênese da dengue tem levado a contestação das atuais hipóteses propostas para a FHD (HALSTEAD, 2012).

1.5. Transmissão da dengue

O VDEN é o segundo maior patógeno que causa doença transmita por artrópodes aos homens e a dengue é a principal arbovirose da atualidade. O vírus é mantido na natureza em um ciclo de transmissão homem-mosquito-homem (GUBLER, 1998, ROSS, 2010).

O homem é infectado pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* durante o repasto sanguíneo. Representantes deste gênero estão amplamente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo a espécie *A. aegypti* o vetor mais competente na transmissão da dengue uma vez que a espécie é antropofílica, possui hábitos urbanos e utiliza preferencialmente reservatórios artificiais de água para a postura de seus ovos. As fêmeas de *A. aegypti* ainda apresentam um comportamento agitado e descontínuo durante a alimentação contribuindo para ampliar o risco de transmissão da doença num curto espaço de tempo (GUBLER, 1997; GUBLER, 1998; BARRETO; TEIXEIRA, 2008; WHO, 2009).

Após a picada no homem, o vírus passa por um período de incubação intrínseca que dura cerca de 4-10 dias quando então pode surgir febre e sintomas inespecíficos. Durante o período virêmico o vírus circula no sangue periférico. Nesta fase, o vírus pode ser transmitido a outro *A. aegypti* (GUBLER, 1998, WHO, 2009). No interior do mosquito, os vírus se replicam no intestino e posteriormente são liberados na hemocele alcançando outros tecidos. Após multiplicação nas glândulas salivares o vírus pode ser transmitido ao homem durante novo repasto sanguíneo. A transmissão transovariana da dengue tem sido demonstrada, mas sua participação na manutenção da doença não está esclarecida, porém pode indicar um possível mecanismo de manutenção do VDEN na natureza durante os períodos interepidêmicos. O período de incubação extrínseca no mosquito dura de 8-12 dias. A infecção é do tipo persistente e produtiva e perdura por toda a vida, cerca de 3 meses (GUBLER, 1998; HALSTEAD, 2008; WHO, 2009; MARTINS, V.E.P. *et al*, 2012) (figura 7).

A manutenção do ciclo de transmissão do VDEN depende do desenvolvimento de altos títulos virais no hospedeiro vertebrado assegurando sua transmissão ao mosquito. Essa relação vírus/vetor é um fator importante para a seleção e propagação de cepas urbanas mais patogênicas (MCBRIDE, BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

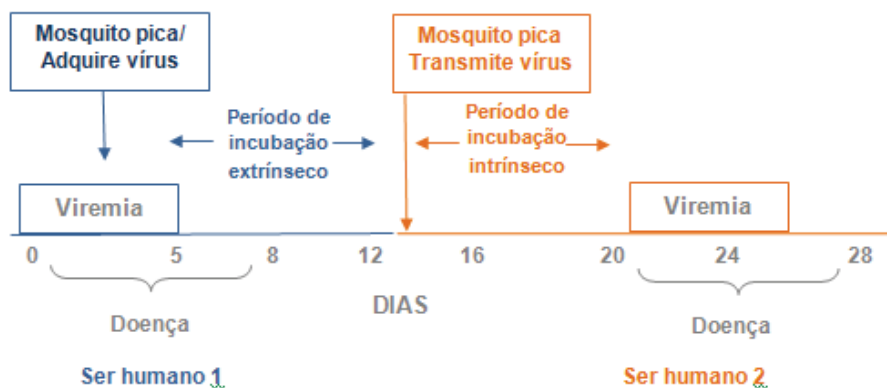


Figura 7. Representação esquemática do ciclo de transmissão da dengue.
Fonte: Modificado a partir de *Center of Disease Control*.

1.2. Agente etiológico

1.2.1. Classificação

São reconhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos de vírus da dengue (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 e VDEN-4) baseados em teste de neutralização por redução em placa e testes de reação cruzada (RUSSELL, NISALAK, 1967; CALISHER, 1989).

Os VDEN pertencem ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* que inclui, além deste, os gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* além de dois grupos que aguardam classificação formal dentro da família (GUBLER, 1998; TOMLISON *et al*, 2009).

O gênero *Flavivirus* agrupa mais de 70 vírus, muitos dos quais são transmitidos por artrópodes, assim como ocorre com a dengue (LINDENBACH, THIEL, RICE, 2007).

1.2.2. Morfologia

Os VDEN são partículas esféricas com cerca de 40 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, de aproximadamente 30 nm, é constituído de 240 monômeros da proteína estrutural C (C) e RNA genômico. Este nucleocapsídeo eletrodense é envolto por envelope lipídico derivado do hospedeiro contendo duas proteínas estruturais ancoradas, proteína do envelope (E) e proteína da membrana (M), sendo a glicoproteína E o principal determinante antigênico do vírus (GUBLER, 1998; TOMLINSON *et al*, 2009; ROSS, 2010) (figura 8).

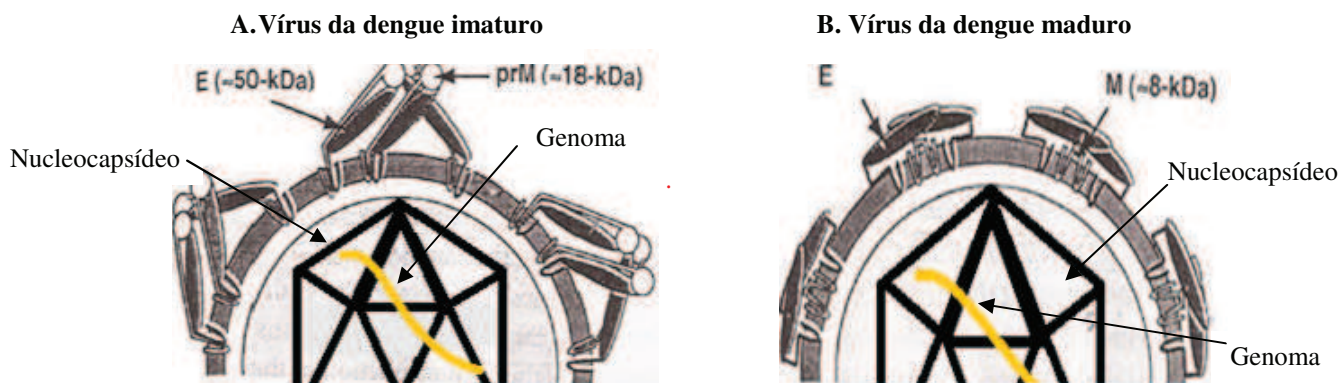


Figura 8. Estrutura do vírus da dengue nas formas imatura (A) e madura (B).

Fonte: Modificado de Lindenbach; Thiel; Rice, 2007.

1.3. Genoma

O VDENV possui um genoma infeccioso, constituído de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples (ssRNA) e polaridade positiva de aproximadamente 11 Kilobases (Kb). Uma única matriz de leitura, do inglês *open reading frame* (ORF), codifica a poliproteína viral que posteriormente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. A ORF é flanqueada por regiões não codificantes (RNC) nas extremidades 5', com aproximadamente 100 nucleotídeos (nt), que apresenta um *cap* tipo I ($m^7GpppAmpN_2$) e 3', com cerca de 400 a 500 nt e cauda poli adenilada ausente (WENGLER, WENGLER, GROSS, 1978; GUZMÁN, KOURÍ, 2004; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; TOMLINSON *et al*, 2009; ROSS, 2010).

A RNC 5' está envolvida na tradução do genoma e possui um papel importante na replicação devido a uma região de complementaridade com a fita de RNA de sentido negativo servindo como um sítio de iniciação para síntese da fita de RNA positiva (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A RNC 3' aumenta a eficiência nos processos de tradução e replicação viral. Os primeiros 50-400 nt dessa região exibem baixa taxa de conservação sendo chamada de região variável e são dispensáveis para os eventos de replicação de VDENV-1, enquanto uma estrutura em haste, do inglês *stem-loop*, e sequências terminais de ciclização conservadas são críticas para a tradução e replicação viral de VDENV-2. A RNC 3' interage com as proteínas NS3 e NS5 que possuem grande relevância funcional (TAJIMA *et al*, 2006; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Os genes que codificam para as proteínas estruturais C, prM e E estão localizados no extremo 5' do genoma ocupando um terço da ORF e os genes que codificam as proteínas

não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 se localizam próximo ao extremo 3' (figura 9).

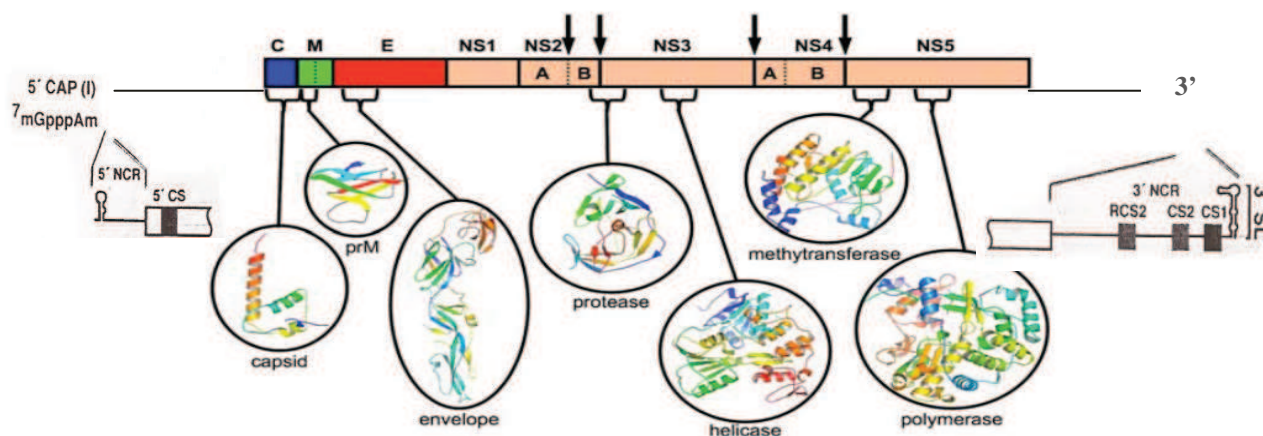


Figura 9. Representação esquemática do genoma do vírus da dengue.
Fonte: Modificado a partir de TOMLINSON *et al*, 2009.

1.3.1. Proteínas Estruturais

As proteínas estruturais do vírus da dengue são responsáveis pela formação do capsídeo (C) e montagem da partícula viral (prM/M e E) (ROSS, 2010).

A proteína C possui peso molecular de aproximadamente 13 kilodaltons (kDa). É a primeira a ser traduzida e quando associada ao RNA viral, formam o nucleocapsídeo. Sua composição básica parece neutralizar a carga negativa do RNA genômico ao qual está associado (CHANG, 1997).

A proteína M é característica de vírus maduros, sendo formada a partir da clivagem da proteína prM com cerca de 18-19kDa. Sua principal função é evitar que a proteína E se funda com as membranas internas antes da liberação do vírus na célula hospedeira. A maturação do vírus é um evento terminal que ocorre durante a passagem pela via secretória da célula eucariótica, reorganizando a superfície da partícula viral e expondo o domínio de ligação da proteína E aumentando sua infectividade (HENCHAL E PUTNAK, 1990; GUIRAKHOO, BOLIN, ROEHRIG, 1992).

A proteína E possui peso molecular aproximado de 53 kDa. É o principal determinante antigênico do vírus da dengue e a principal proteína de superfície. Possui três domínios distintos: I- constitui a região central N-terminal, II- região de dimerização e peptídeo de fusão e III- região do receptor de ligação à célula hospedeira, além da região de haste e âncora que se insere na membrana do retículo endoplasmático (RE) e ancora a

proteína E até encapsotamento viral. Participa de importantes eventos no ciclo biológico do vírus, mediando interações com receptores específicos precedendo a fusão, além de ser o maior alvo para a neutralização por anticorpos (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

1.3.2. Proteínas Não-Estruturais

As proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas no processo de replicação e regulação da transcrição do genoma viral (ROSS, 2010).

O gene que codifica a proteína NS1 está localizado no sítio replicativo do vírus, sugerindo sua participação na replicação viral. A proteína NS1 possui cerca de 46 kDa e é amplamente encontrada no interior e na superfície da célula hospedeira, provocando forte resposta humoral contra as células infectadas através da lise mediada pelo sistema complemento (MACKENZIE, JONE, YOUNG, 1996; LINDENBACH, RICE, 2003). Formas solúveis da proteína NS1 também são encontradas, com picos durante a fase aguda da doença, sendo importante para o diagnóstico rápido de dengue (MACDONALD *et al*, 2005). Mutações em um motivo peptídico na região N-terminal da proteína NS1 estão relacionadas a liberação desta proteína à membrana do RE (YOUN *et al*, 2010).

As proteínas NS3 (69 kDa) e NS5 (103 kDa) participam no processamento da poliproteína e replicação viral, respectivamente. A primeira tem função de helicase e protease que utiliza como co-fator a proteína NS2B (14 kDa). A proteína NS5 codifica uma metiltransferase e tem função de RNA polimerase RNA dependente, além de estar envolvida na transcrição e secreção de IL-8 (FALGOUT *et al*, 1991; MEDIN, FITZGERALD, ROTHMAN, 2005; ROSS, 2010).

As proteínas NS2A (22 kDa), NS4A (16 kDa) e NS4B (27 kDa) além de participar da replicação, sustentado pela proximidade ao sítio replicativo, têm função antagonista ao interferon (IFN) (MACKENZIE *et al*, 1998; MUNOZ-JORDAN *et al*, 2003; ROSS, 2010).

1.4. Replicação

A replicação do vírus da dengue tem início com a adsorção do vírus na membrana plasmática de células permissivas através da ligação da proteína E com receptores presentes na superfície da célula hospedeira. Há ampla variedade de receptores descritos para o vírus da

dengue e outros Flavivirus. Dentre estes, célula dendríticas (DC) que expressam lectinas do tipo C (DC-specific intracellular adhesion molecule (ICAM) 3-grabbing nonintegrin: DC-SIGN), glicosaminoglicanos sulfatados, integrinas, CD14, GRP78, lamininas e receptores Fc quando os vírus estão opsonizados (TASSANEETRITHEP *et al*, 2003; MUNOZ-JORDAN *et al*, 2003; THEPPARIT, SMITH, 2004)

A internalização do vírus por vesículas endossômicas ácidas promove modificações irreversíveis na proteína E desenvolvendo a partícula viral e liberando o nucleocapsídeo no citoplasma que em seguida é desencapsidado liberando o genoma viral. A tradução das proteínas virais ocorre no retículo endoplasmático (RE) e a replicação do genoma na região perinuclear (TOMLINSON *et al*, 2009; ROSS, 2010).

O complexo replicativo composto por proteínas NS se liga a RNC 3' do genoma viral e iniciam a síntese de uma fita de RNA de sentido negativo formando um RNA duplex. A partir do ssRNA de sentido negativo são sintetizadas fitas de ssRNA positivas. Nos estágios iniciais da infecção, as taxas de síntese de fitas positivas e negativas são similares, mas esta relação torna-se assimétrica favorecendo a síntese de ssRNA de senso positivo (MCBRID, BIELFELDT-OHMANN, 2000) (figura 10).

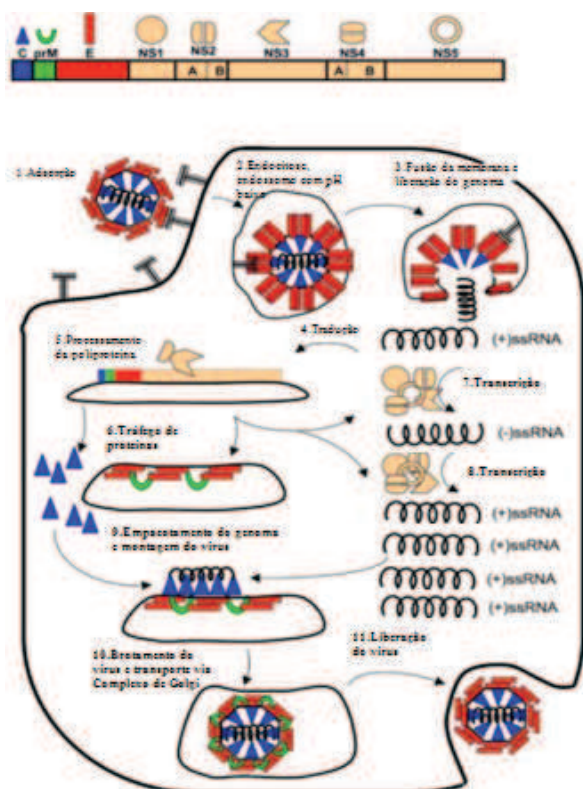


Figura 10. Representação esquemática da replicação do VDEN. Fonte: Modificado a partir de Lindenbach; Thiel; Rice, 2007; Tomlinson *et al*, 2009.

Em análise ultra-estrutural de células infectadas pelo VDEN, é observado grande número de partículas virais e nucleocapsídeo no RE e formação de vesículas resultantes da montagem da partícula viral (figura 11). Os efeitos citopáticos são influenciados pelo sorotipo infectante (DA SILVA *et al*, 2012).

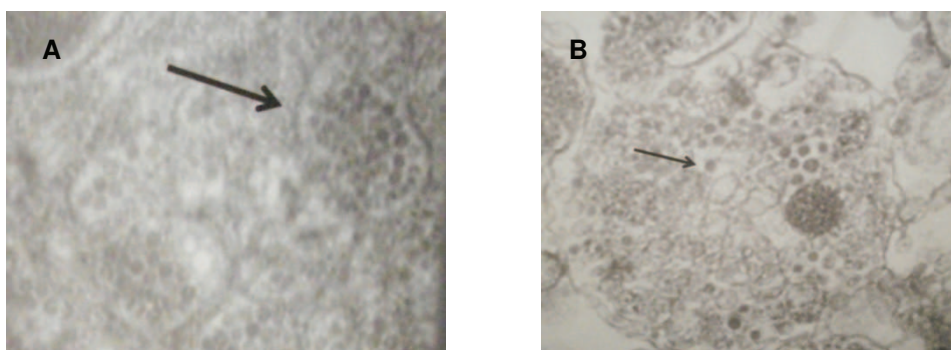


Figura 11. Efeito citopático de VDEN em células C6/36 iniciado nos dias 4-5 de infecção. A: Vesículas contendo partículas virais. B: Virions e nucleocapsídeo no RE. Fonte: SILVA *et al*, 2012.

1.5. Variação Genômica dos VDEN

Desde a década de 60 é observado variação intratípica nos VDEN (MCCOULD *et al* 1971). Vírus com genoma constituído de RNA são mais propensos a mutações como resultado da falta de correção da polimerase e, portanto, exibem maior diversidade genética refletindo a capacidade adaptativa destes vírus às alterações ambientais (ELENA; SANJUÁN, 2005). Nos VDEN, a divisão em quatro tipos sorologicamente distintos ilustra a diversidade genética deste grupo, embora as taxas de substituição destes sejam menores dentre os Flavivirus (ZANOTTO *et al*, 1996; ISHAL *et al*, 2001).

É estimada uma taxa mutacional média por sítio e por ano de $4,55 \times 10^{-4}$ para VDEN-1. As taxas evolutivas nos quatros sorotipos dos VDEN são relativamente menores que aquelas apresentadas por outros vírus de RNA transmitidos por outros meios, o que pode representar uma restrição imposta pela replicação em hospedeiros tão distintos (TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003)

Com o avanço da biologia molecular, foram identificados variantes genéticas dentro dos quatros sorotipos dos VDEN que, teoricamente, podem causar formas clínicas mais graves da doença uma vez que o acúmulo de mutações pode alterar funções biológicas nos vírus (RICO-HESSE, 1990; LANCIOTTI *et al*, 1994; 1997; HOLMES, BRUNCH, 2000).

Na década de 80, cinco genótipos de VDEN-2 foram identificados utilizando a técnica de *fingerprint*. Posteriormente, o sequenciamento parcial da região de junção dos genes E/NS1 determinou cinco genótipos tanto para VDEN-1 (Tabela 1) quanto para VDEN-2 (Rico-Hesse, 1990), sendo corroborado por Gonçalves *et al* (2002) em análise da sequência completa do gene E. Rico-Hesse (1990) conceituou genótipo como um grupo de VDEN que tenham não mais que 6% de divergência nucleotídica dentro da região escolhida, e a região de junção E/NS1 mostrou ser a mais adequada para análises filogenéticas por apresentar taxa de mutação aleatória uniforme e substituições nucleotídicas no terceiro códon ocasionando principalmente mutações silenciosas.

Tabela 1. Descrição dos genótipos de VDEN-1 de acordo com análise da região de junção E/NS1.

Genótipo	Distribuição Geográfica
I	América, África, Sudeste da Ásia
II	Sri Lanka
III	Japão
IV	Sudeste da Ásia, Sul do Pacífico, Austrália e México
V	Taiwan e Tailândia

A partir de Rico-Hesse, 1990.

A ampla distribuição do genótipo I de VDEN-1 sugere que em passado recente um progenitor foi disseminado e estabelecido em inúmeros nichos, provavelmente no início dos anos 60 com o advento de viagens aéreas. Após este evento inicial, múltiplas linhagens do genótipo I foram formadas por divergência evolutiva como revelado pela diferença de aminoácidos entre esses isolados (RICO-HESSE, 1990).

Eventos de recombinação no gene codificador da proteína E em VDEN-1 foram descritos em 1999 e 2001, sugerindo um *hot spot* para este gene. Esta característica já tinha sido observada por Rico-Hesse, em 1990, quando descreveu variações não uniformes na sequência completa do gene E e *hot spots* que parecem ocorrer em áreas que codificam epítomos para o VDEN (RICO-HESSE, 1990; HOLMES *et al*, 1999; TOLOU *et al*, 2001).

Em 1994 e 1997, Lanciotti *et al* (1994; 1997) descreveram quatro genótipos para VDEN-3 e dois para VDEN-4, respectivamente. Em 2008, foi descrito novo genótipo para dengue-3 (KING *et al*, 2008).

O sequenciamento parcial do genoma permite identificar relações epidemiológicas e evolutivas nos VDEN e passou a ser amplamente utilizado em estudos de epidemiologia molecular. As vantagens em utilizar o sequenciamento em vez da técnica de *fingerprint* é a

identificação pontual das diferenças genômicas, além de identificar mutações silenciosas (RICO-HESSE, 1990; DUBEL *et al*, 1993; GUZMÁN *et al*, 1995; CHUNGUE *et al*, 1995; MIAGOSTOVICH *et al*, 2003; PIRES-NETO *et al*, 2005).

À medida que os métodos de sequenciamento e análises evolutivas se tornam mais robustos e com a expansão dos bancos de dados, a classificação de genótipos dentro dos sorotipos é reorganizada (RICO-HESSE, 2003). Atualmente, novos genótipos são propostos para VDEN-3 e VDEN-4, enquanto VDEN-2 tem redução de cinco para quatro genótipos (WANG *et al*, 2000; RICO-HESSE, 2003; KING *et al*, 2008; ARAÚJO *et al*, 2009).

A probabilidade de mutações intra-sorotipos aumenta com a intensa replicação viral durante epidemias de dengue em regiões de alta densidade vetorial (WEAVER; VASILAKIS, 1009). A elevada divergência genética que vem sendo observada dentro dos sorotipos é acompanhada de virulência diferencial das cepas, o que pode indicar que no futuro podemos estar expostos a vírus com maiores propriedades patogênicas (HOLMES; BURCH, 2000). A análise genética de VDEN provê monitoração da transmissão da doença, identifica áreas de maior diversidade viral e fluxo gênico podendo associá-los a padrões clínicos (FOSTER *et al*, 2003).

O principal mecanismo para a divergência encontrada em VDEN são as mutações pontuais e seleção de grupos (clados/linhagens) (COLOGNA *et al*, 2005). Diversas mutações silenciosas e substituições conservativas são comumente encontradas em análise genética de VDEN, enquanto substituições não-sinônimas normalmente estão envolvidas em eventos de substituição de clados (ZHANG *et al*, 2005). Populações de VDEN são altamente diversificadas e existem poucas evidências de evolução adaptativa (Bennet *et al*, 2006). A seleção positiva das características parece ser um evento relativamente raro que ocorre dentro dos sorotipos de VDEN e a pressão de seleção dominante que atua sobre estes vírus é a seleção negativa ou purificadora (ÁÑEZ, 2007).

2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

O Ceará é reconhecido como o segundo estado mais atingido por epidemias de dengue desde a introdução do vírus no país, apresentando vários picos epidêmicos ao longo dos anos bem como o aumento da incidência de casos graves. O perfil epidemiológico também vem sofrendo mudanças, com acometimento crescente de crianças e adolescentes. Os motivos para esta mudança de padrão epidemiológico da dengue no Ceará não são bem compreendidos e não se limitam apenas a circulação de mais de um sorotipo. Em 2010 foi notificada a recirculação de VDEN-1, registrando uma epidemia importante no ano de 2011. É possível que mudanças evolutivas no genoma dos vírus circulantes possam estar associadas a estas mudanças epidemiológicas. Assim, faz-se necessário um estudo específico das características genéticas dos vírus dengue-1 isolados no Ceará durante a epidemia de 2011, para uma melhor compreensão quanto a virulência da cepa e a possível origem evolutiva, que possam colaborar com a tomada de decisão por parte dos órgãos competentes.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar em nível molecular VDEN-1 isolados no Ceará durante a epidemia de 2011.

3.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a variabilidade genética na região de junção E/NS1 de VDEN-1 através da técnica de sequenciamento.
- 2) Comparar as sequências nucleotídicas obtidas entre si, com protótipos existentes no Brasil e no mundo e com outras obtidas a partir de vírus isolados em epidemias prévias.
- 3) Realizar análise filogenética de cepas de VDEN-1 isoladas no Ceará em 2011 com cepas envolvidas em outras epidemias no Estado, no Brasil e no Mundo.
- 4) Verificar se há relação entre a mudança de padrão epidemiológico da dengue no Ceará e as cepas de VDEN-1 isoladas em 2011.

4. METODOLOGIA

4.1. Tipo de Estudo

Este estudo é do tipo transversal, investigativo descritivo, desenvolvido com amostras obtidas por um período de 12 meses, de janeiro a dezembro de 2011.

4.2. População e Local do Estudo

Este trabalho utilizou dados secundários de pacientes com suspeita de dengue atendidos em diferentes hospitais no Estado do Ceará, obtidos a partir de material previamente coletado para fins diagnóstico pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), sendo desenvolvido no Setor de Virologia do LACEN-CE.

4.3. Aspectos Éticos

Este estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE-UFC) em 07 de novembro de 2011 através do Ofício nº 357/11 (Anexo A).

4.4. Seleção das Amostras

Foram selecionadas, por conveniência, amostras de soro coletadas durante a epidemia de dengue de 2011 no Ceará. Um total de trinta e três (33) amostras de pacientes positivos para dengue, demonstrado por isolamento viral seguido da identificação do vírus por ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anticorpos monoclonais direcionados aos quatro sorotipos do vírus da dengue, foram selecionados para o estudo.

As amostras foram caracterizadas quanto ao gênero, idade e município de origem do paciente conforme dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Características das Amostras.

Número da Amostra	Código da Amostra	Sexo	Idade	Procedência
D01	MAR1/CE/BR_2011	Masculino	31	Maracanaú
D02	MAR2/CE/BR_2011	Feminino	35	Maracanaú
D03	FOR1/CE/BR_2011	Masculino	23	Fortaleza
D04	LIM1/CE/BR_2011	Feminino	30	Limoeiro do Norte
D05	FOR2/CE/BR_2011	Feminino	42	Fortaleza
D06	CAN1/CE/BR_2011	Feminino	12	Canindé
D07	MAR3/CE/BR_2011	Feminino	23	Maracanaú

D08	MAR4/CE/BR_2011	Feminino	24	Maracanaú
D09	BAR1/CE/BR_2011	Masculino	54	Barreira
D10	BAR2/CE/BR_2011	Masculino	13	Barreira
D11	BAR3/CE/BR_2011	Feminino	10	Barreira
D12	ITA1/CE/BR_2011	Masculino	25	Itapipoca
D13	PAJ1/CE/BR_2011	Feminino	-	Pacajus
D14	ITA2/CE/BR_2011	Feminino	09	Itapipoca
D15	ITA3/CE/BR_2011	Feminino	25	Itapipoca
D16	ITA4/CE/BR_2011	Feminino	18	Itapipoca
D17	FOR3/CE/BR_2011	Masculino	*	Fortaleza
D18	ITA5/CE/BR_2011	Feminino	08	Itapipoca
D19	BAR4/CE/BR_2011	Feminino	31	Barreira
D20	MAR5/CE/BR_2011	Masculino	25	Maracanaú
D21	ICO1/CE/BR_2011	Masculino	66	Icó
D22	BAR5/CE/BR_2011	Masculino	19	Barreira
D23	FOR4/CE/BR_2011	Feminino	*	Fortaleza
D24	FOR5/CE/BR_2011	Feminino	*	Fortaleza
D25	FOR6/CE/BR_2011	Masculino	-	Fortaleza
D26	FOR7/CE/BR_2011	Feminino	28	Fortaleza
D27	MAR6/CE/BR_2011	Feminino	49	Maracanaú
D28	MAR7/CE/BR_2011	Masculino	09	Maracanaú
D29	FOR8/CE/BR_2011	Feminino	11	Fortaleza
D30	FOR9/CE/BR_2011	Masculino	30	Fortaleza
D31	MAR8/CE/BR_2011	Feminino	35	Maracanaú
D32	MAR9/CE/BR_2011	Masculino	29	Maracanaú
D33	MAR10/CE/BR_2011	Masculino	48	Maracanaú

*Criança de idade desconhecida.

-Paciente de idade desconhecida

4.5. Extração do RNA viral

Foi realizada extração magnética do RNA viral a partir de amostras de soro positivas para dengue estocadas a -80°C , utilizando o Kit NucliSense® miniMAG® (BioMérieux, Durham, NC), seguindo as recomendações do fabricante.

De acordo com a técnica, 300 μl de soro foram adicionados a tubos contendo tampão de lise, exceto para as amostras D15 (250 μl), D17 (100 μl), D22 (240 μl), D25 (240 μl) e D30 (180 μl) cujo volume disponível era limitado. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). Foi adicionado à amostra lisada 50 μl da suspensão de sílica seguida de breve agitação em vortex logo após sua adição, posteriormente, os tubos foram incubados por 10 minutos em TA. Após o período de incubação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 1.500 g por 2 minutos e o sobrenadante foi desprezado por aspiração.

As etapas de lavagem foram realizadas com o auxílio da plataforma magnética miniMAG® (figura 12). Ao sedimento de sílica foram adicionados 400 μl do tampão de lavagem 1 e transferidos para tubos com capacidade para 1,5 ml próprios para uso na plataforma magnética, realizando movimentos de rotação por 30 segundos no modo STEP 1.

O sobrenadante foi removido por aspiração. No total, foram realizadas cinco lavagens, utilizando os tampões de lavagem 1 e 2 (500 µl) por duas vezes e o tampão de lavagem 3 (500 µl) apenas uma vez com rotação de 15 segundos. Ao final desta etapa, após aspiração do sobrenadante, foi adicionado 50 µl do tampão de eluição. Em seguida, os micro-tubos foram agitados por 5 minutos a 60°C/1.400 RPM em agitador térmico compacto da Eppendorf para eluir o RNA da sílica. Posteriormente, com a utilização de plataforma magnética, foram transferidos 50 µl do sobrenadante para *eppendorfs* com capacidade para 1 ml. O RNA extraído foi armazenado em freezer a -80°C até sua utilização.

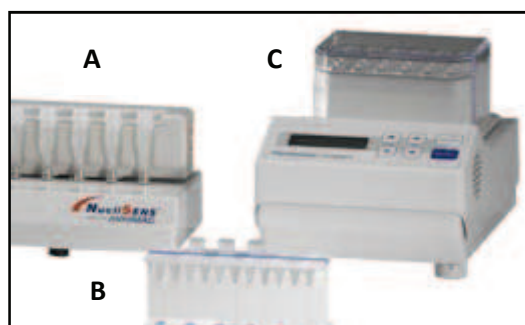


Figura 12. A e B: Plataforma magnética MiniMAG®; C: Agitador térmico compacto (BioMérieux, Durham, NC). Extraído de <http://www.biomerieux-usa.com>.

4.6. Transcrição Reversa e Amplificação do cDNA

A transcrição do RNA viral em cDNA e a amplificação da região de interesse (E/NS1) foram realizadas em única etapa com a utilização do *kit* One Step RT-PCR (QIAGEN®). Os *primers* utilizados estão discriminados na tabela 3.

O preparo do mix foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, foram misturados em *eppendorf* livre de RNase e DNase com capacidade para 2 ml, 10 µl de tampão 1 X (Tris-Cl 20 Mm, KCl 100 Mm, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ 2.5 mM e DTT, pH 8.7); 2 µl de dNTP (400 µm cada); 1.5 µl de cada *primer* (10 µm); 0.4 µl de inibidor de RNase; 2 µl do mix de enzimas contendo as transcriptases reversas Omniscript®, Sensiscript®, a DNA polimerase HotStarTaq, além de detergentes (Nonidet® P-40 e Tween® 20) e desnaturantes (DTT 1 mM); 5 µl de RNA viral e 27.6 µl de água livre de RNase. A reação final teve volume de 50 µl (figura 13A).

Com o uso do termociclador PT-100™ (MJ Research, Inc) (figura 13B) a transcrição reversa foi realizada a 50°C/30 min. A inativação das enzimas de transcrição reversa e ativação da DNA polimerase foram dadas a 95°C/15 min, desnaturando a molécula de cDNA recém-formada. Foram estabelecidos 35 ciclos para desnaturação (94°C),

anelamento dos *primers* (55°C) e extensão do cDNA (72°). A extensão final se deu a 72°C/10 min (PIRES-NETO, 2001).

Tabela 3. Descrição dos *primers* utilizados neste estudo.

Primers	Sequência	Região	Referência
<i>f D1</i>	5'-ATGGCCATCCTGGGAGACACTGCATGGGA-3'	E/NS1	Rico-Hesse, 1990
<i>r D1</i>	5'-TGGCTGATCGAATTCCACACACACC-3'	E/NS1	Rico-Hesse, 1990

Após a amplificação foram gerados fragmentos de 408 nt correspondentes à região de junção E/NS1. Os *amplicons* gerados na reação de RT-PCR foram homogeneizados com 2 µl de azul de bromofenol e separados em gel de agarose a 2% em tampão T.B.E. 1x corado com 5 µl de brometo de edítio a uma voltagem de 103 por 1 hora. As bandas foram visualizadas sob luz ultra-violeta em transluminador.

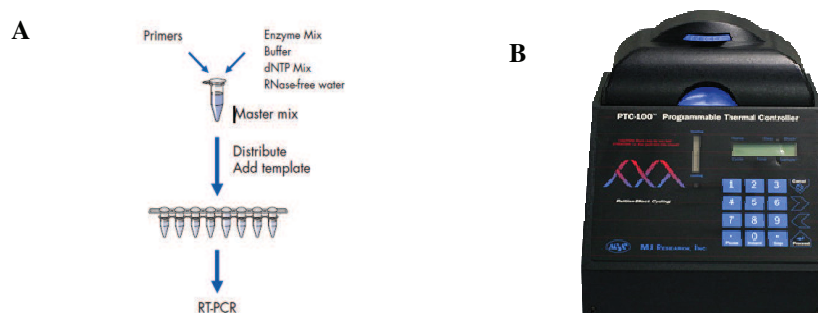


Figura 13. A: Preparo do mix para RT-PCR. Extraído de Qiagen One-Step hand Book. B: Termociclador utilizado para a reação de RT-PCR e sequenciamento.

4.7. Sequenciamento

Para o sequenciamento foi utilizado o kit de sequenciamento BidDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) que segue o princípio do método de Sanger *et al* (1977) com interrupção da polimerização da fita de DNA pela adição de didesoxinucleotídeo (ddNTP).

Seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante, foram utilizados 2 µl do tampão de sequenciamento; 2 µl de BigBye® Ready Reaction Mix contendo a polimerase, dNTP e ddNTP; 4 µl de *primer* (5 µM); 1 µl de água ultra pura e 1 µl do produto da reação de RT-PCR (amostra), totalizando 10 µl. A reação de sequenciamento foi inicializada a 96°C/1 min (desnaturação) seguida de 35 ciclos de desnaturação (96°C/15 seg), anelamento do *primer*

(50°C/15 seg) e extensão (60°C/4 min). Para cada amostra foram sequenciadas as fitas *forward* e *reverse*.

4.8. Purificação

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram purificadas com o kit BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, foram adicionados às amostras 45 µl de SAM™ solution, estabilizante da amostra, e 10 µl de BigDye® XTerminator™ solution, responsável pela captura de nucleotídeos não incorporados e sais livres na reação. A mistura foi agitada por 30 min para a captura e imobilização de substâncias não incorporadas à fita de DNA e posteriormente centrifugada a 2.500g/2 min para precipitação da fração insolúvel ligada ao XTerminator™ no fundo do *ependorf*. Em seguida, foram retirados 20 µl do sobrenadante contendo a sequência de DNA purificada e transferidos para placa de 96 poços que, após vedação, foi inserida no sequenciador automático ABI PRIMS 3130 (Applied Biosystems) para processamento.

4.9. Análise das Sequências

Para a visualização, análise e edição das sequências nucleotídicas foram utilizados os programas disponíveis no pacote de softwares STADEN 1.6 (PreGap4, Trev e Gap4) e o programa MEGA v.5.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados público GenBank (www.ncbi.com) utilizando o programa BLAST para verificar se os *primers* utilizados corresponderam às regiões de interesse.

Após verificar a autenticidade das regiões pesquisadas, as sequências foram alinhadas e editadas através dos programas Muscle (Edgar, 2004) e Clustal W (Thompson *et al*, 2004) incorporados no programa MEGA v.5.

Sequências de VDEN-1 do Brasil e do mundo foram selecionadas e utilizadas para a análise filogenética (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências depositadas no GenBank utilizadas para análise filogenética.

Origem	Ano Isolamento	Número de Acesso
Nauru	1974	M32904
Manila	1974	M32919
Burma	1976	M32920
Nigéria	1968	M32927
Jamaica	1977	M32921
Angola	1988	M32912
Tailândia	1986	JN638336
Tailândia	2001	FJ687433
México	1980	M32897
Colômbia	1985	M32910
Colômbia	2007	GQ868569
Venezuela	2006	HQ332181
Venezuela	2007	HQ332183
Venezuela	2007 (2)	HQ332179
Nicarágua	2009	JF937644
El Salvador	1993	JN819417
Ceará	1986	M32923
Nordeste do Brasil	2000	FJ850071
Nordeste do Brasil	2000 (2)	FJ850070
Nordeste do Brasil	2002	FJ850075
Nordeste do Brasil	2003	FJ850077
Nordeste do Brasil	2006	FJ850087
Pernambuco/BR	1997	AY159567
Bahia/BR	1997	AY159259
Pará/BR	1998	AY159265
Mato Grosso/BR	1996	AY159262
Rio de Janeiro/BR	1988	M32908
Rio de Janeiro/BR	1996	AY159270
Rio de Janeiro/BR	1999	AY159271
Rio de Janeiro/BR	2001	AY738795
São Paulo/BR	2001	AY306091
São Paulo/BR	2003	AF520798
SãoPaulo/BR	2008	GU131863
Minas Gerais/BR	1999	AY159260
Paraná/BR	1995	AY159268
Cuba (Dengue 2)	1981	AJ012546

4.10. Escolha do Modelo Evolutivo e Análise Filogenética

Para definir o modelo de substituição nucleotídica a ser utilizado na reconstrução da árvore filogenética utilizamos o Critério de Akaike (AIC) disponível no programa JModelTest (POSADE; CRANDALL, 1998). Para a construção da árvore filogenética foram utilizados os métodos de Neighbor-Joining [NJ] (SAITOU; NEI, 1987) e Máxima Parsimônia [MP] (Henning, 1966) disponíveis no programa MEGA v.5., método de Máxima Verossimilhança [MV] (FELSENSTEIN, 1981) disponível no programa PhyML v.3 (GUINDON; GASCUEL, 2003), e Inferência Bayesiana no programa MRBAYES v3.1. (RONQUIST; HUELSENBECK, 2009).

O modelo evolutivo foi selecionado pelo programa JModelTest e utilizado no método de MV e Inferência Bayesiana e para o método de MP utilizamos o parâmetro de busca heurístico *Close-Neighbor-Interchange*.

O enraizamento da árvore foi realizado com a adição de uma cepa de VDEN-2 isolada durante a epidemia de 1981 em Cuba, exceto para a análise Bayesiana. As árvores resultantes da análise de NJ, MP e MV foram calculadas 1000 vezes (*bootstrap*) e para a Inferência Bayesiana usamos 5.000.000 gerações na Cadeia de Markov de Monte Carlo e burnin de 1.250.000. A árvore gerada pelo método Bayesiano foi visualizada com o programa FigTree v1.4.

5. RESULTADOS

De trinta e três amostras de soro positivas para VDENV-1 no isolamento viral, dezenove foram positivas na RT-PCR e dezessete foram negativas (figura 14).

Duas amostras, D17 (FOR3/CE/BR_2011) e D30 (FOR9/CE/BR_2011), possuíam volumes disponíveis inferiores aquele recomendado pelo fabricante do kit de extração (200 µl), que se mostrou eficiente mesmo com volumes abaixo do limiar proposto.



Figura 14. Eletroforese: resultados da amplificação de 408 nt correspondentes a região E/NS1 (amostras escolhidas aleatoriamente). A: amostras D05-D14. B: amostras D26-D32.

PM: Peso molecular de 100Kb.

Foram satisfatoriamente sequenciadas 10/19 amostras positivas na RT-PCR e 7/17 amostras negativas pelo mesmo método (figura 15). As amostras D01 (MAR1/CE/BR_2011), D04 (LIM1/CE/BR_2011), D12 (ITA1/CE/BR_2011), D13 (PAJ1/CE/BR_2011), D16 (ITA4/CE/BR_2011), D20 (MAR5/CE/BR_2011) e D30 (FOR9/CE/BR_2011) cuja amplificação na RT-PCR não foi observada na eletroforese foram satisfatoriamente sequenciadas. Enquanto em nove amostras positivas na RT-PCR não foi possível identificar a sequência nucleotídica.

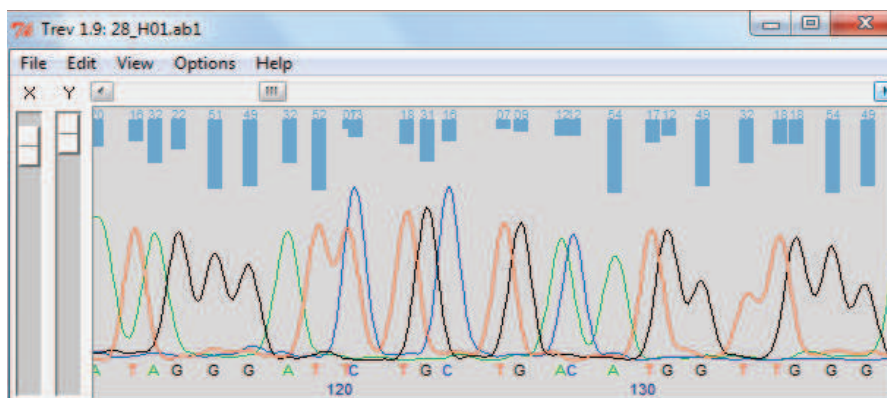


Figura 15. Visualização da sequência D28 E/NS1 *forward* no programa TREV 1.9

Foram obtidas dezessete (17) sequências com comprimento de 240 nt correspondentes a 111 nt 3' E e 129 nt 5' NS1 (região de junção E/NS1) com posição no genoma do nucleotídeo 2423 a 2549 da cepa de referência (VDEN-1 Nauru de 1974).

As sequências geradas foram depositadas no GenBank e podem ser localizadas a partir dos números de acesso indicados na Tabela 5.

Tabela 5. Número de acesso no GenBank das sequências geradas neste estudo.

Número da Amostra	Código da Amostra	Número de Acesso (GenBank)
D01	MAR1CEARABR_2011	KC733831
D04	LIM1CEARABR_2011	KC733832
D06	CAN1CEARABR_2011	KC733833
D12	ITA1CEARABR_2011	KC733834
D13	PAJ1CEARABR_2011	KC733835
D15	ITA3CEARABR_2011	KC733836
D16	ITA4CEARABR_2011	KC733837
D20	MAR5CEARABR_2011	KC733838
D21	ICO1CEARABR_2011	KC733839
D26	FOR7CEARABR_2011	KC733840
D27	MAR6CEARABR_2011	KC733841
D28	MAR7CEARABR_2011	KC733842
D29	FOR8CEARABR_2011	KC733843
D30	FOR9CEARABR_2011	KC733844
D31	MAR8CEARABR_2011	KC733845
D32	MAR9CEARABR_2011	KC733846
D33	MAR10CEARABR_2011	KC733847

5.1. Características Nucleotídica e Aminoacídica da região E/NS1 de VDEN-1

O sequenciamento de 240 nt da região de junção E/NS1 corresponde a 80 aminoácidos codificados entre a região C-terminal do gene E e N-terminal do gene NS1. Após a edição e montagem das sequências de VDEN-1 deste estudo, foi realizado o alinhamento múltiplo com dezenove cepas isoladas no Brasil para verificar a divergência e identidade genética de VDEN-1 do Ceará.

A identidade de isolados de VDEN-1 deste estudo quando comparadas entre si e com outras cepas do Brasil (Tabela 4) varia de 96,3% a 100%, com divergência nucleotídica de até 3,7%. As cepas LIM1/CE/BR_2011 (97,7%), CAN1/CE/BR_2011 (98,7%) e ITA4/CE//BR_2001 (98,7%) são as mais distantes da cepa isolada no Ceará em 1986 e apresentam menor identidade entre si (3,7%) quando comparadas a outras cepas do Brasil.

De 240 nucleotídeos analisados, 213 sítios foram conservados, 13 sítios apresentavam substituições parcimônia informativas e 27 sítios mostravam substituições pontuais. Motivos de TGTGTA/G foram observados na posição 121 (figura 16). A transição

do nucleotídeo A-G na posição 162 está presente em todas as cepas de VDEN-1 deste estudo, VDEN-1 isolados no nordeste do Brasil desde 2000 e de São Paulo desde 2003.

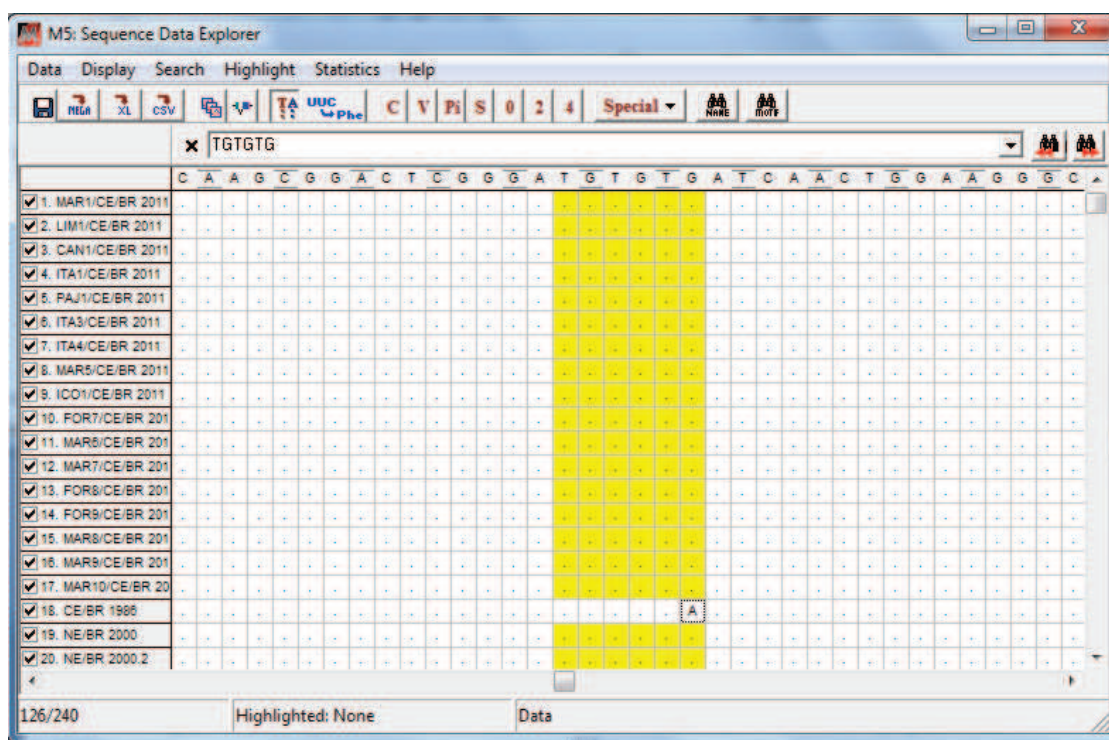


Figura 16. Identificação de motivos TGTGTG/G em isolados recentes de VDEN-1 utilizando o programa MEGA v5.0.

As substituições nucleotídicas foram mais frequentes no terceiro códon do conjunto de dados, resultando em numerosas mutações silenciosas. Destacamos a substituição A-G na posição 84 presente nas cepas CAN1/CE/BR_2011, ITA3/CE/BR_2011, ICO1/CE/BR_2011, FOR7/CE/BR_2011, MAR6/CE/BR_2011, MAR7/CE/BR_2011, FOR9/CE/BR_2011, MAR8/CE/BR_2011, MAR9/CE/BR_2011 e MAR10/CE/BR_2011 deste estudo. Sequências com substituições na segunda posição do códon sofreram mudanças de aminoácidos, sem, contudo, alterar o caráter bioquímico. A cepa ITA4/CE/BR_2011 apresentou mutação no primeiro códon, na posição 43 da região sequenciada, com alteração do caráter bioquímico do 15º aminoácido correspondente a região C-terminal da proteína E (The:Ala). A tabela 6 reúne todas as substituições sinônimas e não sinônimas encontradas nas cepas deste estudo.

A divergência de aminoácidos encontrada no conjunto de dados foi igual aquela apresentada para a divergência nucleotídica (0 a 3,7%).

Tabela 6. Substituições Sinônimas e Não Sinônimas de Aminoácidos das Cepas de VDEN-1 isoladas no Ceará em 2011.

Cepa	Códon	Substituição Sinônima	Substituição Não-Sinônima
LIM1/CE//BR_2011	2°	Ser:Asn	
CAN1/CE/BR_2011	2°	Val:Ala	
LIM1/CE/BR_2011	1° / 3°	Ser:The	
ITA4/CE/BR_2011	1°		The:Ala

5.2. Análise Filogenética

Para a análise filogenética, utilizamos 35 sequências de VDEN-1 disponíveis no GenBank representantes de países das Américas, África e Ásia cujos genótipos já foram identificados; E para o grupo externo, foi utilizado uma cepa de VDEN-2 isolada em Cuba em 1981.

As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de NJ, MP, MV e Inferência Bayesiana. De acordo com o programa JModeltest v.3.0, o modelo de substituição que melhor representa o conjunto de dados é o modelo evolutivo de Transição com duas substituições de igual frequência considerando os sítios invariáveis e a distribuição da variação dentro do conjunto de dados (TIM 2 EF + I + G). Esse modelo assume que a frequência nucleotídica das sequências analisadas é igual, com taxas de transição variáveis e duas taxas de transversão (POSADA, 2008). Para a Inferência Bayesiana, o modelo de substituição escolhido foi TIM 2 EF + G.

A árvore gerada pelo método de MP e MV exibiram topologias similares a árvore gerada método Bayesiano, porém com fraco suporte das relações entre as amostras analisadas. Desta forma, a árvore gerada pelo método de Inferência Bayesiana foi escolhida por apresentar maior confiabilidade (figura 17).

Os VDEN-1 isolados no Ceará em 2011 pertencem ao genótipo I, segundo a classificação proposta por Rico-Hesse (1990), e estão organizados em três clados distintos, representados pelas letras A, B e C, indicando a circulação de três linhagens diferentes durante a epidemia de 2011 (figura 17).

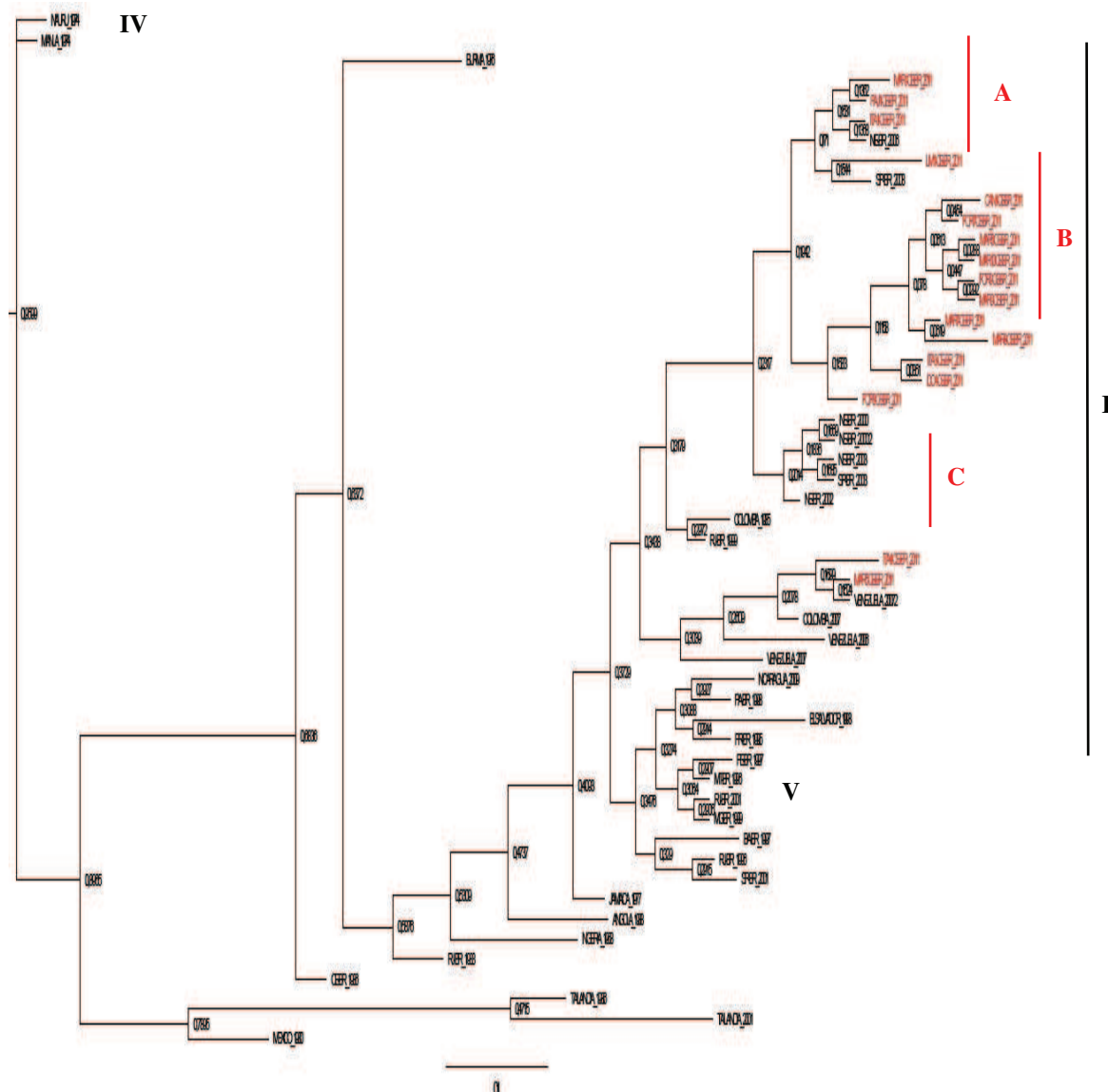


Figura 17. Análise filogenética da região de junção E/NS1 gerada pelo método de Inferência Bayesiana utilizando como modelo evolutivo o TIM2EF+G escolhido pelo programa JModeltest v3.0., visualizada no programa FigTree v1.4.

O subclado A agrupa as cepas isoladas no Brasil, na região nordeste em 2006 e no sudeste em 2008, o subclado B é formado pela segregação independente de 11/17 isolados deste estudo, e o subclado C agrupa cepas provenientes de outros países da América Latina que circularam entre 2006-2007. Topologia idêntica foi encontrada para o subclado B na análise de MV (figura 18).

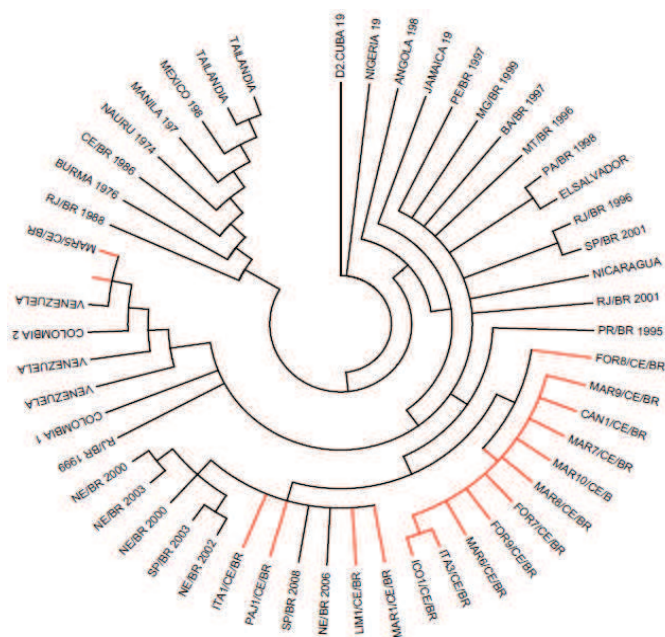


Figura 18. Análise filogenética da região de junção E/NS1 construído pelo método de Máxima Verossimilhança no programa PhyML v3.0. usando como modelo o TIM2EF+I+G escolhido pelo programa JModeltest v.3.0. VDEN-2 foi utilizado como *outgroup*.

A árvore filogenética não revelou segregação de cepas por localização geográfica, porém, há uma tendência de agrupamento pelo ano do isolamento. Os isolados brasileiros da década de 90 não se relacionam com isolados deste estudo e formam um clado distinto, enquanto as cepas ITA4/CE/BR_2011 e MAR5/CE/BR_2011 estão agrupadas com cepas provenientes da Venezuela_2006/2007 e Colômbia_2007.

6. DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, a RT-PCR é mais sensível que a técnica de isolamento viral para detecção de VDEN (CHAN *et al*, 2004) e, dentre vários kits comerciais disponíveis para amplificação, o kit One Step RT-PCR (Qiagen), o mesmo utilizado em nossos experimentos, apresenta o melhor desempenho/rendimento quando comparado a outros kits comerciais disponíveis (DE PAULA *et al*, 2004). Em contrapartida, nosso estudo apresentou menor sensibilidade da RT-PCR quando comparada ao isolamento viral, com apenas 19 amplificações dentre 33 amostras positivas no isolamento viral. Provavelmente, houve degradação do RNA viral, uma vez que as amostras estavam estocadas há cerca de um ano quando iniciaram os experimentos moleculares.

Sete amostras negativas na RT-PCR foram satisfatoriamente sequenciadas. De acordo com Cordeiro (2010), resultados falso-negativos na RT-PCR são comuns quando o paciente apresenta baixa carga viral no momento da coleta da amostra de sangue. Por outro lado, não foi possível identificar a sequência nucleotídica em nove amostras positivas na RT-PCR devido a altos picos que se sobrepunham. É possível que a quantidade de DNA e *primer* nestas amostras estejam elevadas. De modo igual, outros estudos moleculares de VDEN também não conseguiram sequenciar todas as amostras positivas na RT-PCR (PIRES-NETO, 2001; CORDEIRO, 2010).

A diversidade genética de VDEN tem sido muitas vezes associada ao aumento do risco de epidemias e ao desenvolvimento de formas graves da doença (DOS SANTOS *et al*, 2011). A ausência de atividade corretora da RNA polimerase RNA dependente do VDEN provavelmente dá origem a cerca de uma substituição de base a cada processo replicativo que, apesar de representar, em sua maioria, alterações prejudiciais, essa variação pode dar origem a um conjunto de diversos vírus capazes de ocupar novos nichos ecológicos ou se adaptar à pressões severas durante a replicação (HOLMES, 2003; MENDEZ *et al*, 2010).

A análise de 240 nt da região E/NS1 de VDEN-1 isolados no Ceará e outros estados do Brasil mostrou 27 sítios variáveis e 13 sítios informativos. Santos *et al* (2004) identificaram maior variação (65 sítios variáveis e 28 substituições informativas) em cepas de São Paulo entre 1995-2001. Possivelmente devido ao extenso período de coleta dos vírus e maior número de amostras utilizadas neste trabalho.

As cepas deste estudo mostraram alta taxa de substituições silenciosas e mudanças não silenciosas conservativas que podem estar relacionadas ao longo período em que VDEN-1 circula no Estado, desde 1986, ainda que em níveis baixos (CARNEIRO, 2012). Este tipo de mutação é muito comum entre VDEN onde a maioria das substituições ocorrem no terceiro códon (RICO-HESSE, 1990; PIRES-NETO *et al*, 2005; BEHURA; SEVERSON, 2013).

Em nosso conjunto de dados, as mutações estavam mais presentes na região E, a maior glicoproteína de superfície de VDEN, sendo responsável pelo principal determinante antigênico e indutor da resposta imunológica protetora (CHAMBERS *et al*, 1990). A análise molecular de genes que codificam para proteínas estruturais de VDEN-1 realizada por Carneiro *et al* (2012) identificou um número maior de mutações no gene E em comparação com outras proteínas estruturais.

A substituição fixa de A:G no terceiro códon nas posições 84 e 121 das cepas deste estudo, concordam com os resultados de Behura e Severson (2013) que observaram uma significativa transição de A:G entre isolados de VDEN de origem americana e asiática.

A cepa ITA4/CE/BR_2011 apresentou substituição não-sinônima (E15 The:Ala) localizada no domínio de haste a âncora da proteína E (região C-terminal). Análises da relação entre mutações não-sinônimas e mutações sinônimas por sítio dentre e entre populações de VDEN sugere que estes estão sujeitos a forte seleção negativa, havendo relativamente pouca evidência de evolução adaptativa de VDEN, embora evidência de adaptação já tenha sido observada para VDEN-2, VDEN-3 e VDEN-4 (BENNET *et al*, 2003; TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; MENDEZ *et al*, 2010; TISSERA *et al*, 2011). A cepa ITA4/CE/BR_2011 apresenta evidência de seleção positiva quando a substituição de um aminoácido hidrofílico por um hidrofóbico ocorreu em um domínio transmembrana altamente hidrófobo.

A similaridade da sequência de aminoácidos entre as cepas recentes do Ceará e cepas brasileiras incluídas neste estudo variam de 96,3% a 100%, resultados semelhantes foram encontrados por Santos *et al* (2004), com uma similaridade de até 97,5% a 100%.

Desde a década de 80 é observada a variabilidade genética dos VDEN. Com a melhoria das ferramentas moleculares estudos mais acurados foram realizados inicialmente por Rico-Hesse (1990) identificando um limiar de divergência de 6% que classifica genótipos dentro de sorotipos. Diferenças na severidade da doença associadas a determinado sorotipo ou genótipo são discutidas na literatura (WEAVER; VALSILAKIS, 2009). É provável que

processos evolutivos de VDEN apresentem maior impacto sobre a virulência e epidemiologia no mundo (KLUNGTHONG *et al*, 2008). O controle eficiente da dengue requer, entre outros aspectos, conhecimento do vírus circulante e a possível rota de entrada (RICO-HESSE, 1990).

No Brasil, apenas o genótipo I de VDEN-1 tem circulado no país, embora seja considerada a possibilidade de que outros genótipos tenham sido introduzidos e que por motivos desconhecidos não se estabeleceram. Fatores ecológicos, vetoriais e do hospedeiro podem estar envolvidos (SANTOS *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2004; PIRES-NETO *et al*, 2005).

Em nosso estudo, as cepas isoladas no Ceará são classificadas como genótipo I, segundo a classificação de Rico-Hesse (1990), estando agrupadas com outras cepas provenientes de países americanos, corroborando com estudos de Santos *et al* (2004), Pires-Neto *et al* (2001; 2005), Cordeiro (2010), Carneiro *et al* (2012) e Bona *et al* (2012).

A análise filogenética mostrou a segregação de VDEN-1 em três clados, onde as cepas ITA4/CE/BR_2011 e MAR5/CE/BR_2011 estão agrupadas com cepas da Venezuela e Colômbia isoladas entre 2006-2007 (Clado C). Estudos filogenéticos recentes utilizando cepas oriundas dos estados de Roraima, Amazonas, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Paraná também identificaram agrupamento desses isolados com cepas da Venezuela (CORDEIRO, 2010; DOS SANTOS *et al*, 2011; CARNEIRO *et al*, 2012; BONA *et al*, 2012). Rodriguez-Roche *et al* (2012) sugerem que múltiplas introduções de VDEN-1 tenham ocorrido de países da América Latina para a Venezuela e vice-versa. A constante importação de múltiplas linhagens de vírus através de regiões vizinhas também tem sido observada em Taiwan (SHU *et al*, 2009). A Venezuela provavelmente é uma importante rota de entrada do vírus no país com potencial de disseminação para regiões vizinhas.

O retorno de VDEN-1 no Ceará foi identificado primeiramente nos municípios localizados no interior do Estado, que fazem parte da rota rodoviária que vem do Piauí, localizado mais ao norte do país, onde o VDEN-1 foi isolado em março de 2009 quando ainda não havia registro deste sorotipo no Ceará. Os primeiros isolados de VDEN-1 em 2010 no Ceará pertencem aos municípios de Tauá (janeiro), Jati (janeiro) e Quixadá (março) alcançando a cidade de Fortaleza, região litorânea, em junho do mesmo ano, culminando na maior epidemia de dengue do Estado em 2011 (informação verbal)².

Padrões distintos de ocorrência da FHD no Brasil entre 1981 e 2002 foram descritos por Siqueira *et al* (2005). A primeira, afetando adultos entre 20-40 anos na maioria

² Informação fornecida pela Dra. Fernanda Montenegro, de acordo com os registros de dengue do setor de virologia do LACEN-CE, em março de 2013.

dos estados brasileiros, e a segunda, ocorrendo entre jovens menores que 15 anos na região amazônica, ao norte do Brasil, apresentando o mesmo padrão observado em outros países da América Latina e do sudeste da Ásia. A diferença entre linhagens de VDEN-1 circulantes pode explicar a ocorrência de padrões clínicos distintos da doença (CORDEIRO, 2010). É possível que mudanças no padrão epidemiológico da dengue no Ceará registrada na epidemia de 2011, afetando principalmente a população mais jovem, possam ser resultado da introdução de novas linhagens no estado.

Em 2011, foi registrado o maior número de óbitos por dengue com complicações (CEARÁ, 2013), segundo Mendez *et al* (2010), manifestações clínicas mais agressivas podem estar relacionadas a circulação de novas linhagens com maior potencial patogênico. A epidemia de 2011 apresentou diferentes manifestações da doença e, de acordo os resultados da nossa análise filogenética, as linhagens de VDEN-1 que circularam em 2011 são diferentes daquela isolada em 1986. A substituição de linhagens envolve o estabelecimento de uma cepa que apresenta mutações vantajosas na população como resultado de contínua seleção evolutiva no hospedeiro humano e no vetor (LAMBRECHTS *et al*, 2012; BEHURA *et al*, 2013).

As cepas MAR1/CE/BR_2011, ITA1/CE/BR_2011, PAJ1/CE/BR_2011 e LIM1/CE/BR_2011 se agruparam com isolados mais recentes do nordeste do Brasil e de São Paulo no clado A e 11 cepas deste estudo constituíram o clado B, numa segregação independente.

A literatura traz diversos relatos de múltiplas linhagens de VDEN-1 em uma mesma região, na maioria dos casos não há sobreposição de clados/linhagens, apenas durante o período de transição (THU *et al*, 2005; MENDEZ *et al*, 2010; LAMBRECHTS *et al*, 2011). Geralmente, a existência de linhagens distintas tem relação geográfica e temporal (THU *et al*, 2005; DOMINGO *et al*, 2006; KUKRETI *et al*, 2009; MENDEZ *et al*, 2010). No entanto, o estudo de Santos *et al* (2004), realizado no estado de São Paulo, não identificou linhagens específicas para uma região, assim como ocorre no Ceará, exceto para os isolados da cidade de Fortaleza que estão clusterizados com cepas de outros municípios em um ramo distinto. Estas cepas provenientes de Fortaleza foram coletas em fevereiro de 2011 e possivelmente estão relacionadas ao mesmo surto por pertencerem ao mesmo clado, como sugerido por Santos *et al* (2004).

No México, a evolução de VDEN-1 se dá pela entrada de múltiplas linhagens no país (CARRILLO-VALENZO *et al*, 2010). A diversidade de VDEN-1 no Brasil também tem sido atribuída a introdução de novas linhagens, sem, contudo, ser produto de evolução local (DOS SANTOS *et al*, 2011). Todavia, a análise genética de VDEN-1 isolados na Polinésia Francesa durante um surto ocorrido após quatro anos de baixa transmissão da doença, esteve relacionado a evolução *in situ* do vírus, não havendo indícios de entrada de novos vírus (DESCLOUX *et al*, 2009), assim como observado na Venezuela, com extensa diversidade genética em isolados de uma mesma área indicando evolução local deste a introdução do vírus no país (RODRIGUEZ-ROCHE *et al*, 2012).

Determinar a base evolutiva de substituições é inerentemente problemática, principalmente se há envolvimento de linhagens que diferem quanto a aptidão sobrepondo-se a linhagem anterior, sendo difícil inferir se as substituições de linhagens são resultado de seleção natural ou se são em grande parte devido a deriva genética com gargalos periódicos na população vetorial (HOLMES, 2009; CARILLO-VALENZO *et al*, 2010)

A substituição de clados parece ser um evento mais comum que a longa persistência em uma determinada localidade (BENNET *et al*, 2003; LAMBRECHTS *et al*, 2011) e pode ser devido a variação sazonal do tamanho populacional do vetor, do hospedeiro e a complexas interações a nível celular (RICO-HESSE, 2003; THU *et al*, 2005). A presença de múltiplos sorotipos de VDEN pode determinar padrões complexos de imunidade cruzada determinando qual clado sobrevive (THU *et al*, 2004).

No Brasil, não está claro se a epidemia ocorrida entre 2009/2010 foi resultado da substituição de linhagem ou se é devido a somatória de susceptibilidade da população, infecções sequenciais e introdução de novos vírus (DOS SANTOS *et al*, 2011). A mesma lógica pode ser aplicada no Ceará, como hipotetizado por Cavalcanti *et al* (2011) em análise à epidemia de 2008 causada por VDEN-2, onde não apenas a re-circulação do sorotipo, mas também a susceptibilidade e sensibilização da população foram determinantes.

O termo linhagem tem sido usado não oficialmente para designar vírus agrupados em clados em um nível taxonômico menor que genótipo (KUKRET *et al*, 2009) e, quando introduzidos em uma região, frequentemente alteram a incidência e gravidade da doença (LAMBRECHTS *et al*, 2011).

Diante dos crescentes relatos de distintas linhagens de VDEN-1 circulando em diferentes regiões do Brasil é necessária uma vigilância mais rigorosa, não apenas virológica,

mas também com identificação de genótipos. É válido um estudo longitudinal com maior número de amostras a fim de compreender os eventos que culminam na grande diversidade de VDEN-1 que vem sendo observada.

Quanto as ferramentas utilizadas para análise filogenética deste estudo, tanto a MV quanto a Inferência Bayesiana foram suficientes na identificação de sub-grupos dentro do genótipo I de VDEN-1, apresentando topologias muito similares. Embora tanto o valor de *bootstrap* na MV quanto da probabilidade *a posteriori* no método Bayesiano ofereçam pouco suporte das relações entre as sequências analisadas, este último apresentou valores mais altos que o *bootstrap*, com resultados mais confiáveis. Santos *et al* (2004), em estudo filogenético de cepas de VDEN-1 de São Paulo de 1995-2001, utilizando a região E/NS1 nos métodos de MV e Bayesiano, se depararam com as mesmas dificuldades em explicar o conjunto de dados na falta de valores robustos que suportem os nós. Enquanto a reconstrução filogenética através do método de NJ de VDEN-1 isolados no Brasil de 1988-2001, também utilizando a região E/NS1, mostrou valores elevados de *bootstrap* (PIRES-NETO *et al*, 2005). A diferença desses resultados pode ser atribuída, em parte, aos diferentes métodos de análise utilizados e a natureza do estudo.

Quando as cepas de 2011 do Ceará foram comparadas a outras cepas brasileiras, identificamos maior divergência dentre os isolados deste estudo. Jarman *et al* (2008) relatam que a introdução frequente de novas linhagens mantêm um nível de diversidade genética apreciável de VDEN, mesmo em uma escala muito regional. Dessa forma, as várias mutações silenciosas e não sinônimas encontradas neste estudo podem conferir novas características a região de junção E/NS1 que culminam na diminuição do sinal filogenético anteriormente descrito para essa região, corroborando com os achado de Santos *et al* (2004).

7. CONCLUSÃO

- As cepas isoladas no Ceará durante a epidemia de 2011 possuem alta identidade nucleotídica com outros isolados brasileiros e países da América Latina pertencentes ao genótipo I;
- Mutações silenciosas estavam amplamente distribuídas na região E/NS1 das cepas deste estudo, com poucas substituições sinônimas e apenas uma substituição não sinônima na cepa ITA4/CE/BR_2011;
- Durante a epidemia de 2011, co-circularam três linhagens (A, B e C) do genótipo I de VDEN-1.
- A mudança de padrão epidemiológico da dengue no Ceará em 2011 sofre influência da entrada e co-circulação de novas linhagens de VDEN-1 no Estado.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, P. O., ZEIDLER, J. D., SOUZA, D. D., CORDEIRO, J. D. Dengue infection in BoaVista, Roraima, Brazil, 1999-2002. **Virus Reviews & Research**, 11(1), 136, 2006.

ALLISON, S.L.; STIASNY, K.; STADLER, K. *et al.* Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. **J Virol Journal of General Virology** (2006), 87, 885–893 DOI 10.1099. 73, n. 7, p. 5605-5612, 1999.

ÁNEZ, G. Evolución molecular del vírus dengue: um área de investigación prioritária. **Investigación Clínica** v.48, n. 3, p. 273-276, 2007.

ARAÚJO, F.M.C.; VILAR, D.C.L.; RAMALHO, I.L.C.; *et al.* Dengue activity in the State of Ceará, 1994-1996. **Dengue-Rio**, Summaries, p. 56. 1996.

ARAÚJO, F.M.C.; NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; *et al.* Concurrent infection with dengue virus type-2 and VDENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 925-928, 2006a.

ARAÚJO, F. M. C. **Vigilância virológica e sorológica de dengue no estado do Ceará nos anos de 2002 e 2003**. 2006. 140p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006b.

ARAÚJO, JMG; BELO, G.; SCHATZMAYR, H. G.; SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 526-529, 2009.

ARAÚJO, F.M.C. **Diagnóstico laboratorial para o vírus dengue em líquido cefalorraquidiano: a detecção do antígeno NS1 como uma nova abordagem**. 2011. pg 37. Tese (doutorado) - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

AVIRUTNAN, P.; PUNYADEE, N.; NOISAKRAN, S.; *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v. 15, n. 193(8), p. 1078-88, 2006.

AVIRUTNAN, P.; FUCHS, A.; HAUHART, R.E.; *et al.* Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **J Exp Med**, v. 12, n. 207(4), p. 793-806, 2010.

BANCROFT, TL. On the aetiology of dengue fever. **Austr Med gazette**, v. 25, p.17-18, 1906

BARRET-VIEIRA, D.F.; JÁCOME, F.C.; RASINHAS, A.C. Experimental murine model for the pathogenesis study of dengue viruses. **XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Meeting of Virology**; vol 17 (2) supplement 1, BV960, p 29-30, 2012.

BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.B. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, p. 64, 2008.

BEHURA, S.K.; SEVERSON, D.W. Nucleotide substitutions in dengue virus serotypes from Asian and American countries: insights into intracodon recombination and purifying selection. **BMC Microbiology** v. 13, p. 37-50, 2013.

BENNET, S.N., HOLMES, E.C., CHIRIVELLA, M. *et al.* Selection-driven evolution of emergent dengue virus. **Mol. Biol. Evol.** v.20, p.1650-1658, 2003.

BENNETT, S.N.; HOLMES, E.C.; CHIRIVELLE, M. *et al.* Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. **J Gen Virol** v. 87, p. 885–893, 2006.

BICHARA, C.D.A. **Prevalência de anti auto-anticorpos entre antígenos celulares em pacientes com infecção pelo vírus da dengue e vírus linfotrópico de células T humanas, HTLV-1 e 2.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. 2009.

BONA, A.C.D.; TWERDOCHLIB, A.L.; NAVARRO-SILVA, M.M. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the state of Paraná, Brazil, based on fragment of the capsid/premembrane junction region. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.** v. 45, n.3, p.297-300, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Brasília** – DF, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Dengue no Brasil: tendências de mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. **Brasília** -DF, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. **Brasília** - DF, 2011.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; *et al.* Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 40, n.2, p. 192-196, 2007

CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J.M. *et al.* Antigenic relationships between as determined by cross-neutralization testes with polyclonal antisera. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.37-43, 1989.

CARNEIRO, A.R.; CRUZ, A.C.R.; VALLINOTO, M.; *et al.* Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.107, n.6, p. 805-812, 2012.

CARRILLO-VALENZO, E.; DANIS-LOZANO, R.; VELASCO-HERNÁNDEZ, J.X.; *et al.* Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. **Arch Virol**, v. 155, p. 1401–1412, 2010.

CAVALCANTI, L.P.G.; COELHO, I.C.B.; VILAR, D.C.L.F; *et al.* Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 43, n. 4, p. 355-358, 2010.

CAVALCANTI, L.P.; VILAR, D.; SOUZA-SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.G. Change in Age Pattern of Persons with Dengue, Northeastern Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v.17:132-134, 2011.

CEARÁ- SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ (SESA). **Informe Semanal de Dengue**. Fortaleza. Disponível em: <http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins>. Acesso em: março de 2013.

CENTER OF DISEASE CONTROL [CDC]. HealthMap. **DengueMap**. Disponível em <http://www.healthmap.org/dengue/index.php>. Acesso em: novembro/2012.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus: genome organization, expression and replication. **Annals of Microbiology** v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **CAB International**, New York, p.175-197, 1997.

CHUNGUE, E.; CASSAR, O.; DROUET, M.T.; *et al.* Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. **J Gen Virol**, v.76, p. 1877-84, 1995.

COLOGNA, R.; AMSTRONG, P.M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **J Virol** v. 79, n. 2, p. 853-859, 2005.

CORDEIRO, J.S. **Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil**. 2010. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2010.

CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.P.; PETROLA, Z.; *et al.* Retrospective Study on Dengue in Fortaleza, State of Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n.2, p. 155-159, 1998.

DE PAULA, S.O.; LIMA, C.M.; TORRES, M.P.; *et al.* One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 297-301, 2004.

DESCLOUX, E.; CAO-LORMEAU, V-V.; ROCHE, C.; LAMBALLERIE, X. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: Connection with epidemiology and clinical. **PLOS Negl. Trop. Dis.** v.3., n.8, p.493-511, 2009.

DOMINGO, C.; PALACIOS, G.; JABADO, O. *et al.* Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. **J. Clin. Microbiol.** April, p.1519-1529, 2006.

DOS SANTOS, F.B.; NOGUEIRA, F.B.; CASTRO, M.G.; *et al.* First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 8, p. 387-391, 2011.

DA SILVA, M.A.N.; GOMES, G.M.; JACOME, F.C.; *et al.* Ultrastructural studies of C3/36 cells infected with dengue viruses. XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology. Foz do Iguaçu-PR-BR, Posters –Basic Virology973, v.17 (2) - Supplement 1, p.29, October, 2012.

DUBEL, V.; NOGUEIRA, R.M.; DOUET, M.T.; *et al.* Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the Polymerase Chain Reaction for molecular epidemiology of dengue 2 virus. **Arch Virol**, v. 129 (1-4), p. 197-210, 1993.

EDGAR, R.C. Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high Throughput. **Nucleic Acid Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELENA, S.F.; SANJUÁN, R. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. **J. Virol.**, v.79, n.18, p.11555-11558, 2005.

FALCONAR, A.K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol.**;142(5):897-916, 1997.

FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y-M.; *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **J Virol** v. 65, p. 2467-2475, 1991.

FELSENSTEIN, J. F. Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v.17, p.368-376, 1981.

FIGUEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G.; BASTOS, M.S. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p.667, 2008.

FOSTER, J.; BENNETT, S. N.; VAUGHAN, H.; *et al.* Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the caribbean. **Virology** v. 306, n.1,p. 126-134, 2003.

GONÇALVES, A.P.; ESCALANTE, A.A.; PUJOL, F.H. *et al.* Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type-1. **Virology**, v.303, p.100-119, 2002.

GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J.R. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25 Sup 1:S19-S31, 2009.

GUBLER, B. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v.1, n.2, p.55-57, 1995.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever, its history and resurgence as a global public health problem. In: Gluber DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Wallingford. **CAB International**, UK, 1997:1-22.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiol Reviews**, v.11, n.3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol**, 10(2):100-103, 2002.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696 - 704, 2003.

GUIRAKHOO, F.; BOLIN, R.A; ROEHRIG, J.T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n.2, p. 921-31, 1992.

GUZMAN, M.G.; DEUBEL, V.; PELEGRINO, J.L.; *et al.* Partial nucleotide and aminoacid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein 1 gene junction of four Dengue 2 virus strains isolated during the 1981 cuban epidemic. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 3, p. 241-6, 1995.

GUZMÁN, M.G; KOURÍ, G. Dengue Diagnosis, Advances and Challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, v.8, p. 69-80, 2004.

HALSTEAD, S.B. Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **J Biol Med**, Yale, v. 42, p. 350–362, 1970.

HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E.J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J Exp Med**, v. 146, n. 1, p. 201-217, 1977.

HALSTEAD, S.B. Dengue haemorrhagic fever- a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World health Organization**, 58 (1):1-21, 1980.

HALSTEAD, S.B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 273-291, 2008.

HALSTEAD, S.B. Controversies in dengue pathogenesis. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n.S1, 2012.

HAMMOND, S.N.; BALMASEDA, A.; PEREZ, I *et al.* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v. 73, n. 6, p. 1063-1070, 2005.

HENCHAL E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Reviews**, 3(4):376-396, 1990.

- HENNIG, W. **Phylogenetic systematics**. University of Illinois Press Urbana. 263 pp, 1966.
- HOLMES, E.C.; BURCH, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiol.**, v.8, p. 74-77, 2000.
- HOLMES, E.C. Patterns of intra-and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. **J. Virol.** v77, p.11296-11298, 2003.
- ISHAK, H.; TAKEGAMI, T.; KAMIMURA, K.; *et al.* Comparative sequences of two type 1 dengue virus strains possessing different growth characteristics *in vitro*. **Microbiol. and Immunology**, v. 45, p. 327- 331, 2001.
- JARDIM, D.L.F.; TSUKUMO, D.M.L.; ANGERAMI, R.M.; *et al.* Autoimmune features caused by dengue fever: a case report. **Braz J Infect Dis**, v. 16(1), p. 92-95, 2012.
- JARMAN, R.G.; HOLMES, E.C.; RODPRADIT, P. *et al.* Microevolution of Dengue Viruses Circulating among Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand. **Journal of Virology**, v.82., n.11. p.5494-5500, 2008.
- KING, C.C.; CHAO, D.Y.; CHIEN, L.J. *et al.* Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type-3. **Virology.**, v.5, p.63-76, 2008.
- KOURI, G.; GUZMAN, M.G.; BRAVO, J. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 821-823, 1987.
- KUKRETI, H.; DASH, P.K.; PARIDA, M. *et al.* Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of VDEN-1 (genotype III) in India during 1956-2007. **Virol J**, v.6, n.1, 2009.
- LAMBRECHTS, L.; FRANSIRI, T.; PONGSIRI, A. *et al.* Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. **Journal of Virology**. p.1853-1861, 2011.
- LANCIOTTI, R.S.; LEWIS, J.G.; GUBLER, D.J.; *et al.* Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **Journal of General Virology**, v. 75.p. 65-75, 1994.
- LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 2279–2286, 1997.
- LINDENBACH, B.D; THIEL, H.J; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. **Virology**. 2007. 5^a edition. Philadelphia; Lippincott – Williams & Wilkins: 1102-1103.
- LINDENBACH, B.D; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**. v.59, p. 23–61, 2003.
- MCCLOUD, T.G.; CARDIFF, R.D.; BRANDT, W.E.; *et al.* Separation of dengue strains on the basis of a nonstructural antigen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v20, n 6, p. 964-9568, 1971.

MACDONALD, J.; TONRY, J.; HALL, R.A.; *et al.* NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. **J Virol**, v. 79 (22), p. 13924-13933, 2005.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v.220, p. 232-240, 1996.

MACKENZIE, J.M.; KHOMYKH, A.A.; JONES, M.K.; *et al.* Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. **Virology**, v. 245 (2), p. 10787-10799, 1998.

MARKOFF, L.J.; INNIS, B.L.; HOUGHTEN, R.; *et al.* Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis.*;164(2):294-301, 1991.

MARTINS V.E.P.; MARTINS, M.G.; ARAÚJO, J.M.P.; *et al.* Primeiro registro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Estado do Ceará, Brasil. **Rev Saúde Pública**, v.40, n.4, p. 737-739, 2006.

MARTINS, V.E.P.; ALENCAR, C.H.M.; FACÓ, P.E.G.; *et al.* Distribuição espacial e características dos criadouros de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* em Fortaleza, Estado do Ceará. **Soc Bras Med Trop.**, v. 43, n.1, p. 73-77, 2010.

MARTINS, V.E.P.; ALENCAR, C.H.; KAMIMURA, M.T.; *et al.* Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brasil. **Plos One**, v. 7, n.7, 2012.

MARTINS, S.T.; SILVEIRA, G.F.; ALVES, L.R.; *et al.* Dendritic cell apoptosis and the pathogenesis of dengue. **Viruses**, v.4, p. 2736-2753, 2012.

MCBRIDE, W.J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1041–1050, 2000.

MEDIN, C.L.; FITZGERALD, K.A.; ROTHMAN, A.L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. **J Virol**, v. 79, n.17, p. 11053-11061, 2005.

MENDEZ, J.A.; USME-CIRO, J.A.; DOMINGO, C.; *et al.* Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, 2010, 7:226.

MIAGOSTOVICH, M.P; SEQUEIRA, P.C; SANTOS, F.B.; *et al.* Molecular Typing of Dengue Virus Type 2 in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, n.1, p. 17-21, January-February, 2003

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X.N.; *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med.**, v. 9, n.7, p. 921-7, 2003.

MUNOZ-JORDAN, J.L.; SANCHEZ-BURGOS, G.G.; LAURENT-ROLLE, M.; *et al.* Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 24, p. 14333-14338, 2003.

MURRELL, S.; WU, S-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 239–247, 2011.

NOBUCHI, H. 1979. The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. *Kanpo Rinsho* 26:422–425. In *Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin. Microbiol. Reviews*, 1998, p. 480–496.

PIRES-NETO, R.J. **Análise comparativa de segmentos dos genes das proteínas C e NS1 e da junção E/NS1 de vírus dengue 1 e 2 isolados no Brasil entre 1996 e 2001.** 2001. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PIRES-NETO, R.J.; LIMA, D.M.; DE PAULA, S.O.; *et al.* Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 843-852, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** v.14, p. 817- 818, 1998.

RICO-HESSE R. Molecular Evolution and Distribution of Dengue Viruses Type 1 and 2 in Nature. **Virology**, v. 174, p.479-493, 1990.

RICO-HESSE, R. Microevolution and Virulence of Dengue Viruses. **Adv. Virus Res**, v. 59, p. 315-341, 2003.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; VILLEGAS, E.; COOK, S. *et al.* Population structure of the dengue virus, Aragua, Venezuela, 2006-2007. Insights into dengue evolution under hyperendemic transmission. **Infec. Genet. Evol.** v.12, n.2, p. 332-344, 2012.

RONQUIST, F., VAN DER MARK, P., AND HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. In: Vandamme AM, Salemi M, and P. Lemey (eds). **The Phylogenetic Handbook** 2nd Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 2009.

ROSEN, L.; ROZEBBOM, L.E.; SWEET, B.H.; *et al.* The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* marks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v3. n.5, Sept. 1954.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 26, n. 3, p. 337-43, 1977.

ROSS, T.M. Dengue Virus. **Clin Lab Med.** v.30, n.1, p. 149–160, 2010.

RUSSELL, P.K.; NISALAK, A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. **J Immunol**, v. 99, p. 291-296, 1967.

SAITOU, M.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p.406-425, 1987.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.L. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463 – 5467, 1977.

SANTOS, C.L.S.; BASTOS, M.A.A.; SALLUM, M.A.A.; *et al.* Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, n. 1, p.11-16, 2003.

SANTOS, C.L.S.; SALLUM, M.A.M.; FOSTER, P.G.; *et al.* Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.16, n. 3, p. 145-152, 2004.

SHU, P-Y.; SU, C-L.; LIAO, T-L.*et al.* Molecular characterization of dengue virus imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. **Am. J.Trop. Med. Hyg.** v.80, n.6, p.1039-1069, 2009.

SIQUEIRA, J.B.; MARTELLI, C.M.T.; COELHO, G.E.; *et al.* Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**. v.11, n. 1, 2005.

SOUZA, R.V.; DA CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.P.; *et al.* An outbreak of dengue in the state of Ceara, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.90, p. 345-346, 1995.

SRIKIATKHACHORN, A.; ROTHMAN, A.L.; GIBBONS, R.V.; *et al.* Dengue-How best to classify it. **Clinical Infectious Diseases Advance**. v. 53, 2011.

TAJIMA, S.; NUKUIA, Y.; ITO, M.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. **Virus Research** v. 116, p.38-44, 2006.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 7, n. 197(7), p. 823-829, 2003.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, F.; *et al.* Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25 Sup 1:S7-S18, 2009.

THEPPARIT, C.; SMITH, D.R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptors. **J Virol**, v. 78, p. 12647-12656, 2004.

THU, H.M., LOWRY, K., MYINT, T.T.*et al.* Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3 and 4 by dengue 1. **Emerg. Infect. Dis.** v.10, p.593-597, 2004.

THU, M.H.; LOWRY, K. JIANG, L. *et al.* Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus population are due to stochastic events rather than to natural selection. **Virology**, v.336, p.163-172, 2005.

TISSERA, H.A.; OOI, E.E.; GUBLER, D.J. *et al.* New dengue virus type I genotype in Colombo, Sri Lanka. **Emerg. Infect. Dis** v. 17, n.11. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1711.101893>>. Acesso em: mar/2013.

TOLOU, H.J.G.; COUISSINIER-PARIS, P.; DURAND, J.P.; *et al.* Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **J. Virol**, v. 82, p.1283- 1290, 2001.

TOMLINSON, S.M.; MALMSTROM, R.D.; WATOWICH, S.J. New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease. Inhibitors. **Infectious Disorders - Drug Targets**, 2009, 9, 000-0001.

THOMPSON, J. D.; HIGGING, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment Through sequence weighting, position specific gap penalties and matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TWIDDY, S.; HOLMES, E.C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Mol. Microbiol. Evol.**, v. 20, n. 1, p. 122-129, 2003

VASCONCELOS, P.F.C.; LIMA, J.W.O.; TRAVASSOS, A.P.A.R.; *et al.* Travassos da Rosa Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soro-epidemiológico aleatório. **Rev. Saúde Pública**, v.32, n. 5, p. 447-54, 1998

WANG, E.; NI, H.; XU, R.C.; *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.**, v. 74, p.3227–3234, 2000.

WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution** v. 9, p. 523–540, 2009.

WENGLER, G.; WENGLER, G.; GROSS, H.J. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. **Virology**, v.89, n2, p. 423-437, 1978.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**. v. 29, p. 7221–7228, 2011.

WRIGHT, W.F.; PRITT, B.S. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America. **Diag. Microbiol. Infect. Dis**. v. 73, p. 215–220, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. Chapter 2: **Clinical Diagnosis DF and DHF**. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. **Dengue and severe dengue.** n.117, 2013.

YOUN, S.; CHO, H.; FREMONT, D.H.; DIAMOND, N.S. A short N-terminal peptide motif on Flavivirus nonstructural protein NS1 modules cellular targeting and immune recognition. **J Virol** v. 84, n. 18, p. 9516-9532, 2010.

ZANOTTO, P.M.A.; GOULD, E.A.; GAO, G.F.; *et al.* Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 93, p. 548–553, 1996.

ZHANG, C.; MAMMEN JR., P.M.; CHINNAWIROTPISAN, P. *et al.* Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **J Virol** v 79, n. 24, p.15123–15130, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Ofício nº 357/11 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará.



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 357/11 Fortaleza, 07 de novembro de 2011

Protocolo COMEPE nº 285/ 11

Pesquisador responsável: Morgana Maria de Oliveira Barboza

Título do Projeto: "Caracterização genômica de vírus Dengue isolados no Ceará nos anos de 2010 e 2011"

Levamos ao conhecimento de V.Sª, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 03 de novembro de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dr. José Antônio Torres
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
UFCE