

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

**Caracterização genômica de um vírus dengue tipo 3,
isolado de paciente com dengue clássico.**

Paula Fernanda Gonçalves

Orientador: Prof Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2007

Paula Fernanda Gonçalves

**Caracterização genômica de um vírus dengue tipo 3,
isolado de paciente com dengue clássico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Paula Fernanda

Caracterização genômica de um vírus Dengue tipo 3, isolado de paciente com dengue clássico. Ribeirão Preto, 2007.

71 p.: il. ; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada á Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Quintana, Victor Hugo Aquino.

1. dengue tipo 3
2. análise filogenética
3. genoma completo

DEDICATÓRIA

Á minha mãe Rosa...

Á meu pai João Helio...

Á minha irmã Claudia...

Ao meu irmão Luquinha...

Ao Rasta...

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Á Deus sobre todas as coisas, por toda força concedida para sempre poder caminhar em frente e vencer os obstáculos;

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana (FCFRP-USP), pela orientação e apoio para o desenvolvimento deste projeto;

Ao Prof. Dr. Luis Tadeu Moraes Figueiredo (FMRP-USP), pelo espaço concedido e pela grande sabedoria e humildade com as quais dirige o Centro de Virologia;

Ao Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca (FMRP-USP), pelas correções e sugestões realizadas, contribuindo grandemente para a finalização dessa dissertação;

Á Prof. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini (FCFRP-USP), também pelas sugestões e correções, contribuindo grandemente para o amadurecimento desse trabalho;

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP-USP), por permitir que realizássemos parte de nosso trabalho em seu laboratório;

A Ariane por ter nos auxiliado, inúmeras vezes com a maior paciência;

A Prof. Dra. Danielle Malta, pelas conversas, incentivos e conselhos, desde o estágio;

Ao pessoal do laboratório, Alberto, Liz, Telma, Flávia, Harry pelo incentivo e colaboração para as atividades científicas, além das grandes conversas e momentos de descontração;

Ao pessoal do Centro de Virologia, Soraya, Sueli, D.Maria, Paulo, Pavanelli, por toda força e estando sempre dispostos a nos ajudar em tudo o que precisássemos;

Aos grandes colegas Virologistas, Rafael, Tereza, Mariana, Maira, Camila, Emiliana, Paula, Kleber, Felipe, Aldo, Marquinhos, Alex, Luíza, Luzia, Gelse, Alessandra, Glauciane, Talita, Andréa, Regina, Aline, Veridiana, Raquel, pelas conversas, festinhas, discussões, conselhos, que nos renderam boas risadas;

À Juliana, Viviane e Vanessa, pela amizade e companheirismo, pelos dias e noites de convivência, grandes conselhos e pelo ombro amigo com que sempre me acolheram;

Ao pessoal da pós-graduação da FCFRP-USP;

Aos meus pais pela confiança, amor e carinho, além de estarem presentes em todos os momentos;

À minha irmã Claudia e ao Luquinha por serem muito especiais na minha e estarem sempre ao meu lado independentemente da situação, me apoiando sempre;

Ao Rasta pelas conversas, conselhos, paciência e compreensão, sempre me mostrando o lado positivo das situações, não me deixando abater nunca;

Ao Centro Cultural Orunmilá pelo cuidado, equilíbrio e direcionamento, além do carinho com que sempre me acolheram;

E a todos os meus amigos que por descuido não citei...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Características do vírus.....	13
1.2 Replicação viral.....	15
1.3 Manifestações clínicas.....	16
1.4 Diagnóstico.....	16
1.5 Sorotipos e genótipos de DENV.....	17
1.6 Fatores de virulência.....	18
1.7. DENV no Brasil	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Vírus	25
3.2. Extração do RNA viral	25
3.3. Amplificação genômica da cepa D3BR/RP1/2003 por RT-PCR.....	26
3.5. Clonagem dos produtos amplificados	28
3.6. Purificação dos plasmídeos (<i>Mini Prep</i>)	29
3.7. Seqüenciamento nucleotídico	30
3.8. Análise das seqüências de DNA.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Amplificação por RT-PCR de todo o genoma viral	33
4.2. Análise do genoma viral	36
4.3. Comparação do genoma da cepa D3BR/RP1/2003 com outras cepas de DENV-3	37
4.4. Análise filogenética	40
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8. ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema representando o plasmídeo pCR [®] -XL-TOPO [®]	28
FIGURA 2 - Esquema demonstrando a região genômica amplificada por RT-PCR da cepa D3BR/RP1/2003 utilizando os <i>primers</i> RNC5'-S e E-C(D3).....	33
FIGURA 3 - Representação da seleção das colônias por coloração (azuis e brancas), em placa de Petri de meio LB-ágar contendo canamicina (50µg/ml)	34
FIGURA 4 - Eletroforese dos plasmídeos obtidos na clonagem do produto de amplificação utilizando os primers RNC5-S e E-C(D3)	34
FIGURA 5 - Eletroforese dos plasmídeos purificados.....	35
FIGURA 6 - Esquema demonstrando as regiões genômicas amplificadas por RT-PCR, que representem todo o genoma viral.....	36
FIGURA 7 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos de uma região do domínio III da proteína E, da cepa brasileira D3BR/RP1/2003	39
FIGURA 8 - Análise filogenética baseada na seqüência genômica completa da cepa D3BR/RP1/2003, com outros vírus de DENV-3, disponíveis no GenBank	41
FIGURA 9 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene da proteína E de DENV-3 americanos.....	42
FIGURA 10 - Árvore filogenética baseada na seqüência do gene da proteína NS5 de DENV-3 americanos.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- *Primers* utilizados na RT-PCR para amplificação de regiões sobrepostas que representem todo o genoma de DENV327

TABELA 2- *Primers* desenhados com base na seqüência da cepa brasileira BR74886/02 ...27

TABELA 3- *Primers* utilizados para confirmação e orientação da posição do inserto pCR[®]XL-TOPO[®]30

TABELA 4- *Primers* desenhados com base na seqüência do DENV-3, cepa brasileira BR74886/02, utilizados para seqüenciamento completo dos fragmentos genômicos sobrepostos31

TABELA 5- Mutações de nucleotídeos e aminoácidos observadas entre as cepas D3BR/RP1/2003 e BR74886/02.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

- DF** - (do inglês - dengue fever) febre do dengue clássica
- DHF** - (do inglês - dengue hemorrhagic fever) febre hemorrágica do dengue
- DSS** – (do inglês - dengue shock syndrome) síndrome do choque da dengue
- DENV** – vírus da dengue
- RT-PCR** - (do inglês – Reverse transcriptase polimerase chain reaction) transcriptase reversa
– reação em cadeia polimerase
- PCR** - (do inglês - polimerase chain reaction) reação em cadeia polimerase
- cDNA** – DNA complementar
- RE** – Retículo Endoplasmático
- RNC5'** – região não sodificadora 5'
- RNC3'** – região não codificadora 3'
- JEV** – (do inglês – Japanese Encefalite virus) vírus da encefalite japonesa
- SLEV** - (do inglês – Saint Louis Encefalite virus) vírus da encefalite de Saint Louis

RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo vírus da dengue (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), transmitida pela picada de artrópodes do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*, e sendo atualmente um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente em mais de 100 países de todos os continentes. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica do dengue (DF) e dengue hemorrágico com ou sem choque (DHF/DSS). Recentemente, viu-se um dramático aumento do número de casos de DHF/DSS nas Américas, e este aumento coincidiu com a introdução do dengue tipo 3, genótipo III. Neste trabalho, caracterizamos completamente o genoma de um vírus brasileiro de dengue tipo 3 (D3BR/RP1/2003) isolado de um paciente com dengue clássica. O genoma viral possui um tamanho de 10707 nucleotídeos e contém uma única região codificadora (posição 95 a 10264) flanqueada por duas regiões não codificadoras (RNC5', 1 a 94; RNC3', 10268 a 10707). A comparação do genoma viral com outros vírus isolados de pacientes com DF e DHF não mostrou diferenças significativas que sugerissem a presença de um fator genético associado à virulência. A análise filogenética baseada no genoma completo, mostra que a cepa D3BR/RP1/2003 pertence ao genótipo III e encontra-se proximamente relacionada a outro vírus isolado no Rio de Janeiro em 2002. Entretanto, quando essa análise filogenética é realizada com as regiões codificadoras das proteínas E e NS5 individualmente, a cepa D3BR/RP1/2003 encontra-se mais proximamente relacionada a um vírus isolado na Ilha de Martinica no Caribe. Este achado sugere que o isolado D3BR/RP1/2003 pode ter sido originado através de um evento de recombinação entre duas cepas virais distintas antes ou após sua introdução no Brasil. Dados sugestivos de recombinação foram observados também quando analisada a relação filogenética entre vírus isolados na Ásia.

ABSTRACT

Dengue is an infectious disease caused by dengue virus (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*), transmitted by the bite of arthropods of the *Aedes* genus, mainly *Aedes aegypti*, and being currently an important problem of public health worldwide. According to the World Health Organization, about 50 to 100 million people are infected annually in more than 100 countries of all continents. Dengue can be presented in three main clinical forms; undifferentiated febrile illness, classic dengue fever (DF) and hemorrhagic dengue fever with or without shock (DHF/DSS). Recently, a dramatic increase of DHF/DSS cases in the Americas have been seen, and this increase coincided with the introduction of the dengue type 3, genotype III. In this work, we have completely characterized the genome of a Brazilian dengue type 3 (D3BR/RP1/2003 strain) isolated from a DF patient. The viral genome possesses a size of 10707 nucleotides and has a unique open reading frame (position 95 to 10264), flanked by two untranslated regions (UTR5', 1 to 94; UTR3', 10268 to 10707). The comparison of the viral genome with other viruses isolated from patients with DF and DHF did not show significant differences to suggest the presence of a genetic factor associated with virulence. Phylogenetic analysis based on the complete genome showed that D3BR/RP1/2003 strain belongs to genotype III and is closely related to another virus isolated in Rio de Janeiro in 2002. However, when the phylogenetic analysis was based on the individual coding regions of E and NS5 proteins, D3BR/RP1/2003 strain was closely related to a virus isolated in the Island of Martinique in the Caribbean. This finding suggests that D3BR/RP1/2003 strain could have been originated through an event of recombination between different virus strains before or after its introduction to Brazil. Data supporting recombination events between viruses isolated in Asia have also been observed.

1. INTRODUÇÃO

A febre do dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e reconhecida como entidade clínica desde 1779 (SILER et al., 1926). O vírus foi isolado pela primeira vez, em 1943, por Susumo Hotta, durante epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão (KIMURA & HOTTA, 1944). O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos, principalmente *Aedes aegypti*. Outros mosquitos do gênero *Aedes*, como *Aedes albopictus* e *Aedes africanus*, têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica do dengue (DF) e dengue hemorrágico com ou sem choque (DHF/DSS) (PAHO, 1994). Nos anos seguintes à Segunda Guerra Mundial iniciou-se uma lenta disseminação deste vírus. O número de nações e pessoas afetadas tem aumentado progressivamente e, hoje, a dengue é considerada como a arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo, ocorrendo em todos os continentes. Estima-se que cerca de 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, sendo que aproximadamente 500.000 casos requerem hospitalização, com cerca de 2,5% de óbitos (WHO, 2005).

1.1. Características do vírus

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (WESTAWAY et al., 1985). As partículas virais são esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro, constituídas por core de ribonucleoproteínas e de envelope de lipoproteínas. O genoma consiste de uma fita simples de RNA com aproximadamente 11 kilobases (kb). Este RNA possui 5' cap (m⁷G5'ppp5' A), não contém cauda de "polyA" e é de polaridade positiva. O RNA viral possui uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF) a qual codifica uma grande poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e serina proteases codificadas pelo vírus em 3 proteínas estruturais (C-pre-M-E) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-

NS4A-NS4B-NS5) (LINDENBACH; RICE, 2001). Nas extremidades 5' e 3' existem regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem seqüências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento viral.

A proteína C, de aproximadamente 11 kilodaltons (kd), é altamente básica. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N e C-terminal e, provavelmente, atuam em forma cooperativa quanto à ligação específica ao RNA genômico. A região central da proteína C possui um domínio hidrofóbico que atua na membrana celular e, também, poderia ter participação na montagem do *virion*. A extremidade N-terminal da proteína prM (~26 kd) é gerada no retículo endoplasmático (RE) por uma peptidase sinal do hospedeiro. Durante a saída do *virion* pela via secretora, a proteína prM é clivada pela enzima furina residente no trans-Golgi formando a proteína M (~8 kd), a qual está presente no *virion* maduro e o segmento N-terminal "pr" é secretado no meio extracelular. A glicoproteína E (~50 kd) é uma proteína de membrana que contém domínios transmembrana, adjacentes à extremidade C-terminal, os quais servem para ancorar esta proteína na membrana e atuam como seqüências sinal para a translocação de NS1. Esta proteína glicosilada possui o sítio de ligação ao receptor celular, e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. A glicoproteína NS1 (~46 Kd) existe em três formas, associada à célula, na superfície da célula, e em forma extracelular; NS1 é translocada para o *lúmen* do retículo endoplasmático (RE) e separada do extremo C-terminal da proteína E por peptidase sinal; NS1 é separada de NS2A por proteases celulares residentes no RE; NS1 teria participação na replicação do RNA viral. NS2A (~22 kd) é uma proteína hidrofóbica de função desconhecida e que é separada da NS1 por proteases do RE. NS1-2A é clivada da NS1 e o C-terminal é gerado por clivagem da junção NS2A/2B por serina protease do citoplasma; NS2B (~14 Kd) é uma proteína de membrana com 2

domínios hidrofóbicos os quais rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com NS3, e é um cofator necessário para a função serina protease de NS3. NS3 é uma proteína citoplasmática (~70 Kd) que se associa à membrana por interação com NS2B e possui várias atividades enzimáticas relativas ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA. NS4A e NS4B (~16 Kd e 27 Kd) são proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana. Com base em sua distribuição subcelular e interação com NS1, supõe-se que NS4A deva participar na replicação do RNA. NS5 (~103 kd) é a maior e mais conservada proteína viral. Contêm seqüências homólogas a RNA polimerases dependentes de RNA de outros vírus RNA com polaridade positiva. Dentre estas seqüências homólogas destaca-se o motif Gly-Asp-Asp (GDD). A NS5 também apresenta homologia com meltitransferases envolvidas na formação de cap do RNA.

1.2. Replicação viral

Após tradução e processamento das proteínas virais, a replicase viral é montada a partir das proteínas NS atuando sobre a RNA viral, provavelmente auxiliada por alguns fatores do hospedeiro. A replicase associa-se às membranas, provavelmente por interação de proteínas hidrofóbicas NS pequenas. A replicação começa com a síntese da fita negativa do RNA, a qual serve como molde para a síntese de fitas positivas de RNA da progênie. O RNA viral acumula-se em associação com membranas citoplasmáticas na região perinuclear das células de mamíferos. A montagem do *virion* acontece em associação com membranas do RE, os nucleocapsídios montados brotam dentro do *lúmen* do RE e as partículas virais são liberadas pela via exocítica (LINDENBACH; RICE, 2001).

Os DENV, como outros vírus de RNA, apresentam uma alta taxa de mutação devido à ausência de atividade de *proofreading* (capacidade de correção do erro cometido) da RNA polimerase viral (HOLLAND et al., 1982). Devido a esta alta taxa de mutação os vírus de

RNA não consistem de um único genótipo, se não, de um grupo de genótipos relacionados denominados *quasispecies* (HOLLAND et al., 1992). Esta alta taxa de mutação do DENV seria o fator determinante da alta variabilidade genética observada neste vírus, porém, recentemente, outros estudos mostraram que a recombinação gênica também teria um papel importante na diversidade genética dos DENV (WOROBEY et al., 1999; HOLMES et al., 1999; TWIDDY & HOLMES, 2003).

1.3. Manifestações clínicas

A DF apresenta-se como uma enfermidade aguda febril autolimitada que perdura por aproximadamente 4 a 5 dias. A doença começa abruptamente, com febre elevada, dor retro-orbitária, cefaléia de grau variável, erupção maculopapular, dores musculares e articulares.

A DHF/DSS, afora a sintomatologia inicial que corresponde à febre clássica, cursa, entre o segundo e o quarto dia de doença, com síndrome de extravasamento de líquidos para o interstício e plaquetopenia, que ocasionam queda importante da pressão arterial com tonturas, sudorese fria, taquicardia, dores abdominais e fenômenos hemorrágicos. Nestes casos, pode ocorrer grande diminuição de volume plasmático intravascular e conseqüente choque hipovolêmico que pode levar à morte.

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico específico de infecções por DENV pode ser feito por isolamento viral, a partir do sangue de pacientes, até 5 dias após o início da febre. Linhagens celulares contínuas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284), *Aedes albopictus* (C6/36), e *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) são freqüentemente utilizadas para isolamento do vírus (KUNO et al., 1985). Após isolamento, os vírus devem ser identificados e sorotipados, comumente por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais sorotipos-específicos. Para o

diagnóstico rápido de infecções por dengue têm sido usada a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando iniciadores (*primers*) sorotipo-específicos e análise dos *amplicons* em gel de agarose (DEUBEL et al., 1990; LANCIOTTI et al., 1992). Recentemente foram descritas também RT-PCR em tempo real para diagnóstico do dengue (SHU et al., 2003; GOMES-RUIZ 2006; CHIEN et al., 2006).

O diagnóstico sorológico é comumente feito por detecção de IgM específica por teste imunoenzimático de captura (Mac-ELISA). A IgM aparece logo depois de terminar a febre e começa a diminuir depois de 1 a 2 meses. Os métodos sorológicos clássicos podem, também, serem utilizados e dependem da demonstração do aumento em quatro ou mais vezes do título de anticorpos detectados por inibição da hemaglutinação (HAI), fixação de complemento (CF), ou neutralização (NT). Geralmente é difícil estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga. Devido à associação entre a infecção seqüencial com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária. HAI é o método mais utilizado para distinguir entre infecção primária e secundária. Na infecção primária, os títulos séricos para DEN não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença. Na infecção secundária, os títulos séricos devem ser maiores ou iguais a 2500 (SHOPE, 1963).

1.5. Sorotipos e genótipos de DENV

Com base em testes de neutralização, os DENV são classificados em 4 sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Em cada sorotipo existem vírus com genótipos diferentes. Análises filogenéticas com base na seqüência de 240 nucleotídios correspondente à região de junção das proteínas E e NS1 de diferentes cepas de DENV-1 e DENV-2, têm indicado a existência de 5 genótipos para cada um destes sorotipos (RICO-HESSE, 1990). Para DENV-1 estes são: o das Américas, África e Sudeste Asiático; o

de Sirilanka; o japonês; um grupo representando Taiwan e Tailândia; e o quinto grupo incluindo cepas do Sudeste Asiático, do Pacífico Sul, México e Austrália. DENV-2 inclui os seguintes genótipos: do Caribe; do Pacífico Sul; da Indonésia; do Vietnã e Tailândia; e do Oeste da África. Esta classificação foi confirmada por outros estudos analisando a seqüência completa do gene da proteína E e a região não codificadora 3' (RNC3') (LEWIS et al., 1993; WANG et al., 2000; SHURTLEFF et al., 2001). Por outro lado, outros estudos têm mostrado a existência de 4 genótipos de DENV-3 (genótipo I, Filipinas; genótipo II, Tailândia; genótipo III, Sri Lanka e genótipo IV, Porto Rico) e 3 genótipos de DEN-4 (WANG et al., 2000; LANCIOTTI et al., 1997).

No homem, a infecção por DENV, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra reinfecção pelo mesmo sorotipo causador da infecção, mas não contra outros sorotipos. Estudos epidemiológicos têm identificado a infecção secundária (infecção por um segundo sorotipo) e a presença de anticorpos pré-existentes contra DENV como fatores de risco para desenvolvimento de DHF/DSS (BURKE et al., 1988; SANGKAWIBHA et al., 1984). Entretanto, apesar do número grande de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para DHF/DSS. Acredita-se que fatores ambientais, do hospedeiro e virais contribuem para o desenvolvimento da DHF/DSS (HALSTEAD, 1988; MONATH, 1994; LOKE et al., 2001; SPAULDING et al., 1999; MATHEW et al., 1998). A ausência de um modelo animal adequado tem dificultado a caracterização destes fatores.

1.6. Fatores de virulência

Estudos de epidemiologia molecular têm sugerido a importância de fatores virais para o desenvolvimento de DHF/DSS. Apesar da presença de diversos sorotipos nas Américas, foi durante a epidemia de Cuba, em 1981, que o primeiro caso de DHF/DSS aconteceu, e isto

coincidiu com a introdução de um novo genótipo de DENV-2, o Asiático (RICO-HESSE et al., 1990). O genótipo americano nativo tem sido associado à doença leve, entretanto, a introdução do genótipo Asiático coincidiu com a aparição de DHF/DSS em 4 países sul-americanos (RICO-HESSE et al., 1997; WATTS et al., 1999).

Estudos funcionais *in vitro* têm mostrado que distintos genótipos virais apresentam diferentes características de infecção celular, sugerindo que a virulência estaria relacionada com o genótipo viral. Distintas cepas de DENV-2, isoladas de pacientes com diferentes manifestações da doença, produzem uma variedade quanto o grau de infectividade em células LLC-MK2, leucócitos do sangue periférico, e células C6/36 (MORENS et al., 1991; MANGADA; IGARASHI, 1998). Também, diversas cepas de DENV-2 variam na sua capacidade de infectar *in vitro* o mesmo tipo de célula dependendo do genótipo e do número de passagens (DIAMOND et al., 2000).

Leitmeyer et al. (1999), seqüenciando o genoma completo de DENV-2, dos genótipos do Sudeste Asiático e Americano, diretamente do plasma de pacientes com DF e DHF/DSS, identificaram 3 regiões do genoma (proteína E, RNC5' e RNC3') que estariam relacionadas com a patogenia viral. Também, Cologna & Rico-Hesse (2003), prepararam clones quiméricos infecciosos de DENV-2 dos genótipos do Sudeste Asiático e do Americano intercambiando as 3 regiões mencionadas acima, e observaram que existia uma diminuição na liberação de vírus que infectaram macrófagos e células dendríticas, quando o vírus quimérico possuía estruturas do genótipo Americano. Estes resultados sugerem que a região codificadora da proteína E, RNC5' e RNC3' podem ter alguma influência na patogenia viral.

Nas últimas duas décadas, DENV-3 tem causado epidemias inesperadas de DHF/DSS no Sri Lanka, Leste Asiático e América Latina. Um estudo filogenético realizado recentemente tem mostrado que o aumento de surtos de DHF/DSS tem coincidido com o

aparecimento de uma variante do genótipo III de DENV-3, a qual, provavelmente, surgiu na Índia e se espalhou pela África e América Latina (MESSER et al., 2003).

1.7. DENV no Brasil

Nos últimos 16 anos, têm acontecido diversas epidemias de dengue em todas as regiões do Brasil devido à disseminação do vírus e do vetor transmissor. A primeira epidemia de DENV-1 no Brasil começou numa cidade vizinha a cidade do Rio de Janeiro, em março de 1986. No mesmo ano, o vírus chegou ao Rio de Janeiro, e foi o começo de uma epidemia explosiva com 95.000 casos notificados e, aproximadamente, 3 milhões de infectados (SCHATZMAYR et al., 1986; FIGUEIREDO et al., 1990; PIRES NETO et al., 2005). Esta epidemia chegou aos estados do nordeste e do centro-oeste do Brasil entre 1986 e 1987 (FUNASA, 2002; VASCONCELOS et al. 1995; PIRES NETO et al., 2005). Entre 1990 e 2002, foram notificados casos de DENV-1, praticamente, em todas as regiões do Brasil (VASCONCELOS et al. 1995).

Em abril de 1990, começou a primeira epidemia de DENV-2 na cidade de Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 1990; PIRES NETO et al., 2005). Nesta epidemia foram notificados 17.000 casos com 2% destes apresentando DHF/DSS. Epidemias de DENV-2 têm sido notificadas em, praticamente, todas as regiões do Brasil, em muitos casos associados ao DENV-1 (ROCCO et al., 1998; FUNASA, 2002).

DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 1999 de um paciente que retornou de uma viagem à Nicarágua (ROCCO, 1999), sugerindo que em breve poderia chegar ao Brasil. Isto aconteceu em janeiro de 2001 quando ocorreu o primeiro surto no Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2001; MIAGOSTOVICH et al., 2002). Este primeiro surto foi seguido da maior e mais grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro, tendo seu pico entre janeiro e fevereiro de 2002. No período de 1 de janeiro de 2001 a 22 de junho de

2002 foram notificados 80.000 casos de DF e aproximadamente 1.000 casos de DHF/DSS, sendo que 63 pacientes foram a óbito (CASALI et al, 2004; PASSOS et al., 2004, MARTÍNEZ, E., 2006). Analisando 362 casos de dengue do Rio de Janeiro durante a epidemia de 2001/2002, com isolamento viral confirmado laboratorialmente, observaram que a maioria (238 casos) pertencia ao sorotipo 3, sendo que os sorotipos 1 e 2 foram observados em 62 casos, cada um. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que indivíduos infectados com o sorotipo 3 do vírus da dengue apresentaram sintomatologia mais grave, sugerindo maior virulência deste sorotipo. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade. Após a epidemia de 2001/2002 o DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil. No ano de 2006 houve aumento no número de casos em 16 estados do país sendo notificados 345.922 casos dos quais 828 foram de DHF com 87 óbitos. Isto representou um aumento de 39,38% nas notificações, 36% nos casos de DHF e de 49% nos óbitos quando comparado com o ano de 2005. Até 31 de janeiro de 2007 já foram notificados 21.444 casos sendo 12 casos confirmados de DHF com 4 óbitos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar o genoma de um vírus dengue sorotipo 3 brasileiro isolado de paciente com dengue clássico;
- Comparar a sequência genômica e de aminoácidos da cepa viral brasileira do dengue sorotipo 3, com outras sequências correspondentes a outros vírus dengue, depositados no GenBank;
- Analisar a relação filogenética entre esta cepa brasileira, do vírus dengue sorotipo 3, com vírus isolados em outras regiões do mundo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus

Neste trabalho foi estudada a cepa viral do dengue sorotipo 3, D3BR/RP1/2003, isolado em 2003, na cidade de Ribeirão Preto, SP, de um paciente com dengue clássico. Esta cepa viral foi escolhida para a caracterização genômica, por apresentar alta homologia quando analisada a seqüência nucleotídica de 4 regiões genômicas (RNC5', E, NS1, e RNC3'), e comparando-as com outros vírus isolados em diferentes regiões do Brasil e do Paraguai a partir de pacientes com dengue clássico (AQUINO et al., 2006).

Para a realização dos diversos experimentos, foi preparado um estoque da cepa viral D3BR/RP1/2003. Para isso foram utilizadas células da linhagem C6/36 (células de mosquito *Aedes albopictus*).

As células C6/36 foram cultivadas em um frasco de cultura de 75cm³ (Corning, EUA), com meio nutriente Leibowitz L-15 suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e antifúngico (100U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina e 25µg de anfotericina B). Após a formação da monocamada, foram inoculados 300µl de sobrenadante de cultivos celulares infectados com o vírus (número de passagem 2), e após 10 dias de incubação a 28°C, foram colhidas alíquotas de 200µl do sobrenadante infectado (número de passagem 3), e estocados a -70°C.

3.2. Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 µl do sobrenadante infectado da cultura de células C6/36, utilizando o *QIAamp Viral RNA Kit* (QIAGEN[®], Alemanha) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. As partículas virais contidas no fluido da cultura celular foram lisadas por adição da solução de lise e o RNA viral foi precipitado com etanol, para ser posteriormente passado nas colunas de sílica que possuem alta afinidade por ácidos

nucléicos. Após lavagem, o RNA foi eluído utilizando 80µl de água destilada livre de RNase, sendo diretamente utilizado ou estocado em freezer a -20°C.

3.3. Amplificação genômica da cepa D3BR/RP1/2003 por RT-PCR

Para amplificação de fragmentos sobrepostos que representem todo o genoma viral foram utilizados os *primers* indicados nas Tabelas 1, os quais foram previamente utilizados para amplificação das RNC5' e RNC3', e do gene da proteína E do DENV-3, isolados no Brasil e no Paraguai (AQUINO et al., 2006). E também foram utilizados os *primers* indicados na Tabela 2, os quais foram desenhados com base na sequência da cepa brasileira de DENV-3, BR74886/02 (código de acesso ao GenBank AY 679147).

Para a síntese de cDNA, a reação foi feita contendo 24µl de RNA viral, 100ng de *random primers*, 0,125mM de dNTPs; esta mistura foi aquecida a 95°C por 1 minuto e incubada no gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 400U de transcriptase reversa MMLV (USB, EUA), juntamente com 8µl da respectiva solução tamponante (5X), 40U do inibidor para RNase (RNaseOUT, Invitrogen[®], EUA) e água destilada livre de RNase até volume final de 40µl. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguida de outra incubação a 37°C por 2 horas, finalmente, 5 minutos a 85°C. O RNA da mistura de reação foi degradado por adição de 4U de Ribonuclease H (Invitrogen[®], EUA) e incubação a 37°C por 20 minutos.

A PCR foi realizada num volume final de 50µl e contendo 4µl de cDNA, 0,125mM de dNTP, 0,3µM de cada *primer*, 2,5U da enzima *TripleMaster[®] PCR System High Fidelity* DNA polimerase (Eppendorf, EUA), juntamente com 5µl da respectiva solução tamponante (10X). A amplificação foi realizada no ciclador térmico (MJ Research, EUA), como indicado a seguir: 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, para a desnaturação inicial, seguido de 45 ciclos de 30

segundos a 95°C; 45 segundos a 60°C; e 5 minutos a 68°C; com uma extensão final de 10 min a 68°C.

Tabela 1. *Primers* utilizados na RT-PCR para amplificação de regiões sobrepostas que representem todo o genoma de DENV3,

Primers	Seqüências (5'-3')	Posição no genoma
RNC5 ⁺ -S	AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA	1 - 23
RNC5 ⁺ -C	CGC GTT TCA GCA TAT TGA AAG	130 - 149
ES (D3)	GCC CTA TTT CTT GCC CAT TAC A	845 - 866
EC (D3)	CCG CAC ACT CCA TTC TCC CAA	2560 - 2580
RNC3-S (D3)	GCC CAG AAC ATA CTC ACA GCA	10142 - 10162
RNC3-C (D3)	AGA ACC TGT TGA TTC AAC AGC ACC	10684 - 10707

Tabela 2. *Primers* desenhados com base na seqüência da cepa brasileira BR74886/02,

Primers	Seqüências (5'-3')	Posição no genoma
D3/3385-S	GGG AGA AGA CGG TTG CTG GTA TGG C	3385 - 3409
D3/4050-C	AAC TCC CAT AGC TGC CAC TGC CA	4050 - 4028
D3/5730-S	GGG ACT TCG TGG TGA CAA CTG ACA T	5730 - 5755
D3/6734-C	GGG GGG TTC TCT GCT TTT CTG GTT C	6734 - 6758

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5mg/ml) e visualizados através de luz ultravioleta.

Os fragmentos correspondentes aos tamanhos esperados foram cortados do gel e purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen[®], Alemanha) seguindo as especificações do fabricante. O produto purificado foi eluído em 30µl de água livre de RNase. Após a purificação, 3µl das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo para a confirmação da purificação.

3.4. Clonagem dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram inseridos no vetor pCR[®]-XL-TOPO[®] (*TOPO[®] XL PCR Cloning Kit*, Invitrogen[®], EUA) que possui extremidades 3' timidina (T) que permitem a ligação dos produtos de PCR contendo extremidades 3' adenina (A) adicionadas inespecificamente pela *Taq* DNA polimerase. Esse vetor suporta fragmentos de até 10 kb. O sítio de inserção do produto de PCR encontra-se no gene *lacZ* (Figura 1).

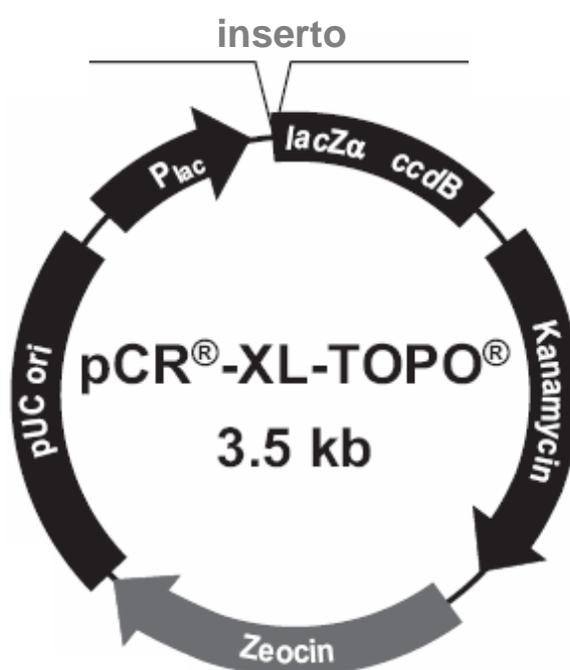


Figura 1. Esquema representando o plasmídeo pCR[®]-XL-TOPO[®] (*TOPO[®] XL PCR Cloning Kit*, Invitrogen[®], EUA).

A reação de ligação foi realizada seguindo protocolo recomendado pelo fabricante e a sua totalidade (10µl) foi adicionada a 50µl de células competentes (MAX Efficiency[®] DH5α[™], Invitrogen[®], EUA) e incubadas no gelo por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico, de 42°C por 30 segundos, e novamente colocadas no gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 250 µl de meio SOC (2% de triptona, 0,5%

de extrato de levedura, 10mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM de NgSO₄, 20mM de glicose) e a mistura incubada a 37°C, por uma hora, com agitação de 175 rpm.

As células foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB-ágar (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl e 15 g de ágar bacteriológico, água destilada, com pH final 7,0), com canamicina (50µg/ml), X-Gal (100mg/ml) e IPTG (100mM), sendo, finalmente, incubadas a 37°C por 14 horas, seguindo o protocolo do fabricante *TOPO[®] XL PCR Cloning Kit*, (Invitrogen[®], EUA).

Após as 14 horas, as colônias foram selecionadas com base na cor. As colônias azuis foram aquelas que não receberam inserto e portanto a β-galactosidase foi expressa corretamente degradando o X-Gal (análogo da galactose) e produzindo a cor azul. Por outro lado, as colônias brancas foram aquelas que receberam o inserto e portanto a β-galactosidase não foi expressa corretamente, não havendo degradação do X-Gal. As colônias brancas foram semeadas em forma de estrias em placas contendo meio LB-ágar com canamicina (50µg/ml) e incubadas a 37°C por 14 horas (MANIATIS, 1989).

3.5. Purificação dos plasmídeos (*Miniprep*)

As bactérias correspondentes às diferentes colônias brancas foram inoculadas em 2ml de meio LB contendo canamicina (50µg/ml) e incubadas a 37 °C com agitação de 175 rpm por 14 h. Como controle foi utilizado uma colônia azul. Os plasmídeos foram purificados pelo método da lise alcalina (MANIATIS, 1989), e, em seguida, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% para determinação de seus tamanhos. Os plasmídeos com tamanho superior ao do plasmídeo controle (colônia azul) foram purificados utilizando o *Qiagen Plasmid Mini Kit[®]* (Qiagen[®], EUA), seguindo as especificações do fabricante. Cada um dos plasmídeos foi eluído em 50µl de água livre de DNase e a concentração foi estimada em gel de agarose a 1% por comparação com amostra de plasmídeos de concentração conhecida.

3.6. Seqüenciamento nucleotídico

Os insertos contidos nos plasmídeos foram completamente seqüenciados utilizando os *primers* das Tabelas 1, 2, 3 e 4. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o *Thermo Sequenase Cy5.5 dye terminator cycle sequencing kit*[®] (Amersham-Pharmacia-Biotech, EUA) conforme recomendação do fabricante. Para tal, foram utilizados ~100ng do plasmídeo e 1µM de cada *primer*, 2U da enzima *thermo sequenase* juntamente com sua solução tamponante (10X), num volume final de 10µl. O seqüenciamento foi também realizado com o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*[®] (Applied Biosystems, EUA) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Para tal, foi utilizado 100ng do plasmídeo, 1µM de cada *primer*, 1µl da mistura Big Dye. As amplificações foram realizadas no ciclador térmico (MJ Research, EUA), da seguinte forma: um ciclo a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, e 72°C por 2 minutos.

A purificação da reação para extrair os excessos de componentes, foi realizada utilizando 80µl isopropanol a 75%, 200µl de etanol a 70% e o pellet foi suspenso com 3µl formamida. A reação de seqüenciamento foi realizada no seqüenciador automático Seq 4x4 (Amersham-Pharmacia-Biotech, EUA) quando utilizado o *Thermo Sequenase Cy5.5 dye terminator cycle sequencing kit*[®] (Amersham-Pharmacia-Biotech, EUA) ou no ABI377 (Applied Biosystems, EUA) quando utilizado o *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit*[®] (Applied Biosystems, EUA), utilizando para ambos um gel de poliacrilamida a 6%.

Tabela 3. Primers utilizados para confirmação e orientação da posição do inserto pCR[®]XL-TOPO[®] (*TOPO[®] XL PCR Cloning Kit*, Invitrogen[®], EUA),

Primers	Seqüências (5'-3')
<i>M13 Forward</i>	GTA AAA CGA CGG CCA G
<i>M13 Reverse</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC

Tabela 4. Primers desenhados com base na seqüência do DENV-3 cepa brasileira BR74886/02, utilizados para seqüenciamento completo dos fragmentos genômicos sobrepostos,

Primers	Seqüências (5'-3')	Posição no genoma
E-SD3P1	GAG GAG CAG GAC CAG AAC TAC G	1184 - 1206
E-CD3P1	ACA CCA CCC ACT GAT CCA AA	2211 - 2191
NS1-SD3P1	GGG GAA AGG CAA AAA TAG TGA	2766 - 2787
D3/3230S	TTA GAG CTG GAC TTC AAC TAT TG	3230 - 3253
NS1-CD3P1	CCC TGA CAC TGT TGT TGT TCT	3328 - 3307
D3/3864-S	GGC TCT TAA AC GAT AAC ACA AT	3865 - 3888
D3/4535-S	CCC AGC CCC CCA GAG ACA CAG AAA	4535 - 4558
D3/4772-C	CCT CCT CCC CCT TTT GCC ATT GTG C	4772 - 4796
D3/5308-C	GTT CAC AAT GCG TCT GCT GTC AC	5308 - 5331
D3/5378-C	GCT ATA CTG GCT GGG TCT GTG AA	5378 - 5356
D3/5880-C	GCC AAC TCT CCC TCT CCT TTG CG	5880 - 5903
D3/6047-S	CCA GAA AGG GAG AAG TCA GCC G	6048 - 6070
D3/6591-S	CAG GTA AAG GGA TTG GAA AGA CT	6591 - 6614
D3/6781-S	CGT GAT AGG CAT ACT TAC ATT GG	6781 - 6804
D3/7470-C	ATC GTG GTG TTC CAA AAC TTC CC	7470 - 7448
D3/7551-S	GAA CAG GAA AAA GAG GAA CAG GC	7551 - 7574
D3/7672-C	CCC TTC TTT GGC TTC TGT TCT ATC C	7672 - 7696
D3/8150-S	CTA CAA AGG AAA CAT GGA GGA AT	8150 - 8173
D3/8198-C	CAG TAC ATT TCG TGC GTG GAG TT	8198 - 8220
D3/8304-S	GAA GAC CCA CCA TTG AGA AAG AT	8304 - 8327
D3/8889-S	CTG GGC AAG TGT GGA AGC TGT GT	8891 - 8914
D3/9518-C	CCA TTC TTT TTA ACC TCT CCA C	9518 - 9540
D3/9795-S	CGG GAT GGA GCC TTA GAG AAA CC	9795 - 9818
D3/10105-C	AAG TGA GAC CAA TAA GTG ATC CG	10105 - 10082

3.7. Análise das seqüências de DNA

As seqüências individuais de ácidos nucléicos sobrepostos foram montadas utilizando o programa *Vector NTI ContigExpress* incluído no grupo de programas do *Vector NTI Suite* (Invitrogen[®], EUA). As seqüências de ácidos nucléicos e aminoácidos foram alinhadas pelo método de *Clustal X* e com base nesses alinhamentos foram construídas as árvores filogenéticas pelo método de máxima parsimônia, utilizando o programa MEGA 3 (Sudhir et al. 2001). A distância genética foi calculada utilizando o algoritmo de distância de Tamura-Nei e a confiabilidade das árvores inferidas foi estimada pelo método de bootstrap com 1000 replicas (SUDHIR, et al.,2004).

4. RESULTADOS

4.1. Amplificações por RT-PCR de todo o genoma viral

Para amplificação de fragmentos sobrepostos que representem todo o genoma do isolado D3BR/RP1/2003 foram utilizados os *primers* indicados na Tabela 1, os quais foram selecionados de seqüências altamente conservadas de DENV-3 depositadas no Genbank e previamente utilizadas para amplificação do gene das proteínas RNC5' e RNC3' e E de DENV-3 isolados no Brasil e no Paraguai (AQUINO et al., 2006).

Diversas combinações dos *primers* foram utilizadas na RT-PCR, mas apenas aquela incluindo o par de *primers* RNC5-S – EC(D3) foi a que produziu um fragmento de amplificação de tamanho esperado (Figura 2).

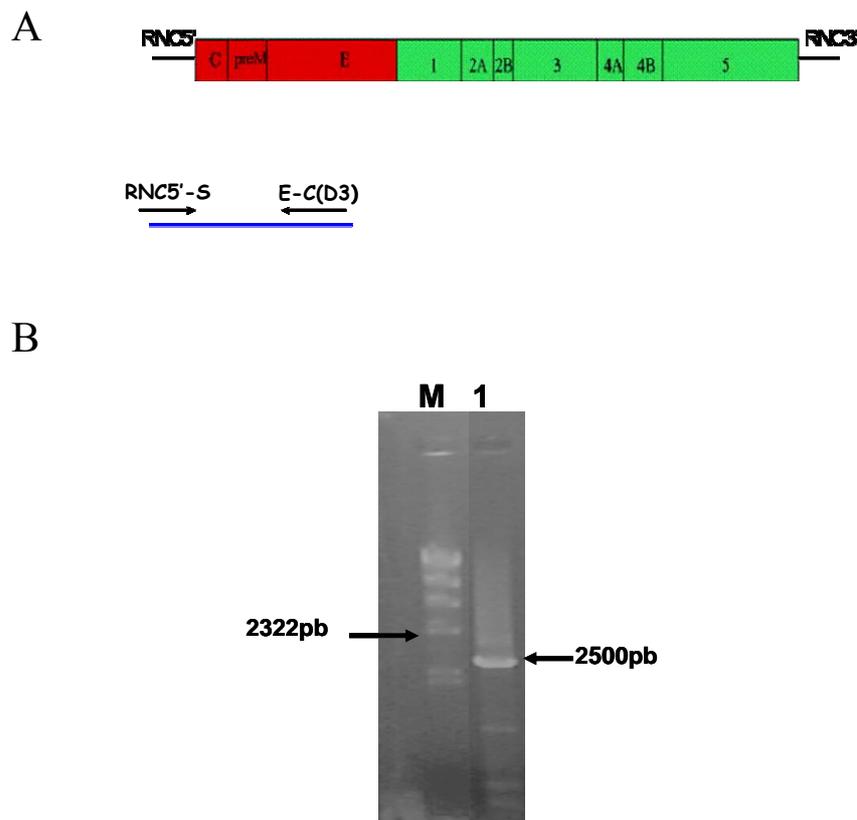


Figura 2. RT-PCR da cepa D3BR/RP1/2003 utilizando os primers RNC5'-S e E-C(D3). **A)** Esquema demonstrando a região genômica amplificada por RT-PCR; **B)** gel de agarose a 1% mostrando o produto da amplificação.

O produto amplificado obtido com os *primers* RNC5-S – EC(D3) foi inserido no vetor *pCR[®] XL TOPO[®]* e a reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli*. As bactérias foram semeadas em placas de Petri e as colônias foram selecionadas com base na cor (Figura 3).



Figura 3. Placa de Petri com meio LB-ágar (canamicina, 50µg/ml) mostrando a Seleção das colônias brancas (B) que conteriam o plasmídeo com inserto esperado. Colônias azuis (A) contém os plásmídeos sem inserto.

Os vários plasmídeos obtidos de colônias brancas foram analisados em gel de agarose para determinar a presença do inserto. Na Figura 4 observam-se vários plasmídeos com tamanho superior ao plasmídeo controle sem inserto.

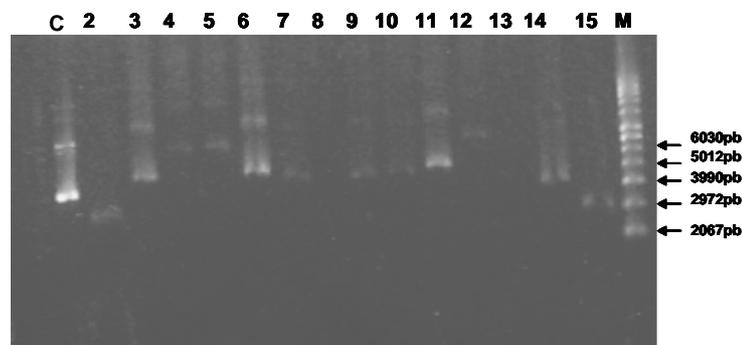


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% de plasmídeos obtidos na clonagem do produto de amplificação utilizando os primers RNC5-S e EC (D3). **M.** supercoiled DNA ladder; **C.** colônia controle. **4, 5 e 12.** colônias suspeitas.

Os plasmídeos com tamanho superior ao controle foram novamente purificados utilizando o *Qiagen Plasmid Mini Kit*[®] (Qiagen[®], EUA). (Figura 5). Posteriormente foram seqüenciados mostrando que continham o inserto esperado.

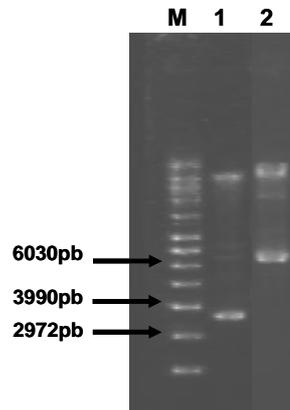


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos plasmídeos purificados; **1.** controle e **2.** plasmídeo de ~6000pb.

Na tentativa de amplificar outras regiões genômicas, foram desenhados novos *primers* com base na seqüência genômica do DENV-3 cepa BR74886/02 depositada no GenBank (Tabela 2). Diversas combinações dos *primers* indicados nas Tabelas 1 e 2 foram utilizadas para a obtenção de fragmentos que representem todo o genoma viral. Na figura 6, observam-se os produtos de amplificação obtidos das seguintes combinações de *primers*: RNC5'-S - EC (D3), RNC5'-S – D3/4050-C, D3/3385-S – D3/6734-C e D3/5730-S - RNC3'-S.

Os produtos da amplificação mostrados na Figura 6 foram clonados e seqüenciados como indicado anteriormente. O seqüenciamento mostrou que os plasmídeos continham os insertos esperados.

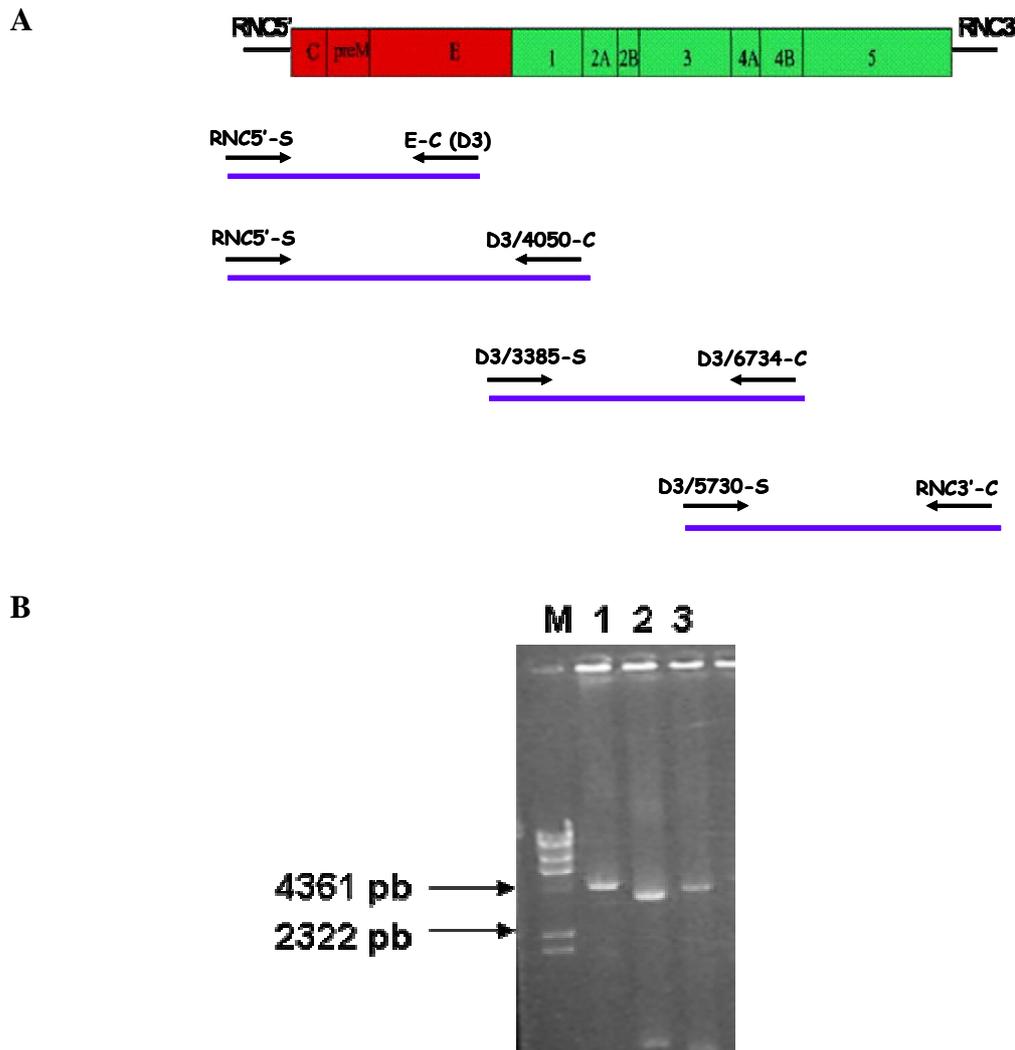


Figura 6. **A)** Esquema demonstrando as regiões genômicas amplificadas por RT-PCR. **B)** 1- RNC5' -S – D3/4050-C; 2- D3/3385-S – D3/6734 e 3- D3/5730-S – RNC3' -C.

4.2. Análise do genoma viral

O seqüenciamento completo das regiões genômicas sobrepostas contidas nos diversos plasmídeos, mostrou que o DENV-3, cepa D3BR/RP1/2003, possui 10707 nucleotídeos, contendo uma única região codificadora (posição 95 a 10264), flanqueada por duas regiões não codificadoras (RNC5' de 1 a 94 e RNC3' de 10268 a 10707). Por comparação com outras cepas de DENV-3, depositadas no GenBank, observamos que a cepa D3BR/RP1/2003 codifica as seguintes proteínas: C de 95 a 436; prM de 437 a 709; M de 710 a 934; E de 935 a

2413; NS1 de 2414 a 3469; NS2a de 3470 a 4123; NS2b de 4124 a 4513; NS3 de 4514 a 6370; NS4a de 6371 a 6820; NS4b de 6821 a 7564; e NS5 de 7565 a 10264.

4.3. Comparação do genoma da cepa D3BR/RP1/2003 com outras cepas virais de DENV-3

A seqüência genômica da cepa D3BR/RP1/2003, isolada de um paciente com dengue clássico em 2003, na cidade de Ribeirão Preto-SP, foi comparada com aquela correspondente à cepa brasileira BR74886/02, isolada em 2002 de um caso fatal de dengue hemorrágico no Rio de Janeiro. Esta comparação mostrou a presença de 58 mutações de nucleotídeos distribuídos homogeneamente em todo o genoma. Na região codificadora foram observadas 55 mutações, sendo que 16 delas resultaram em mudanças de aminoácidos (Tabela 5). Das 16 mudanças de aminoácidos, 10 foram mudanças não conservativas (entre aminoácidos de famílias diferentes).

Tabela 5. Mutações de nucleotídeos e aminoácidos observadas entre as cepas D3BR/RP1/2003 e BR74886/02. Em azul as mutações de aminoácidos. (*) as mutações não conservadas,

POSIÇÃO NO GENOMA	NUCLEOTÍDEOS		POSIÇÃO NA POLIPROTEÍNA	AMINOÁCIDOS	
	D3BR/RP1/03	D3BR74886/02		D3BR/RP1/03	D3BR74886/02
9	G	A		-	-
340	AAG	AAA		LISINA	LISINA
1018	GGG	GGA		GLICINA	GLICINA
1298	TTG	CTG		LEUCINA	LEUCINA
1426	CCC	CCT		PROLINA	PROLINA
1678	CTG	CTA		VALINA	VALINA
1766	TCA	GCG	558	SERINA*	ALANINA*
1768	TCA	GCG	558	SERINA*	ALANINA*
1774	CAT	CAC		HISTIDINA	HISTIDINA
1777	TTA	TTG		LEUCINA	LEUCINA
1908	AGA	AAA	604	ARGININA	LISINA
2029	ATC	ATT		ISOLEUCINA	ISOLEUCINA
2083	AAC	AAA	663	ASPARAGINA*	LISINA*
2087	TTG	CTG		LEUCINA	LEUCINA
2104	TAT	TAC		TIROSINA	TIROSINA
2106	AAG	AGG	671	LISINA	ARGININA
2110	AAA	AAG		LISINA	LISINA
3141	ACC	ATC	1016	TREONINA*	ISOLEUCINA*
3374	CTG	TTG		LEUCINA	LEUCINA
3418	ATT	ATC		ISOLEUCINA	ISOLEUCINA
3629	ACG	GCG	1179	TREONINA*	ALANINA*
3916	TTG	TTA		LEUCINA	LEUCINA
3937	AAT	AAC		ASPARAGINA	ASPARAGINA
4073	TCA	CCA	1327	SERINA*	PROLINA*
4304	CGG	TGG	1404	ARGININA*	TRIPTOFANO*
4350	ACC	ATC	1419	TREONINA*	ISOLEUCINA*
5038	CCA	CCG		PROLINA	PROLINA
6016	ACG	ACA		TREONINA	TREONINA
6215	CAA	GAA	2041	GLUTAMINA*	ÁC. GLUTAMICO*
6265	ACT	ACA		TREONINA	TREONINA
6429	AGA	AAA	2112	ARGININA	LISINA
6466	CAC	CAT		HISTIDINA	HISTIDINA
6654	TCG	TTG	2187	SERINA*	LEUCINA*
6727	CTT	CTC		LEUCINA	LEUCINA
6772	CTT	CTC		LEUCINA	LEUCINA
6943	TAT	TAC		TIROSINA	TIROSINA
7093	GTG	GTA		VALINA	VALINA
7111	GGC	GGT		GLICINA	GLICINA
7258	ACA	ACG		TREONINA	TREONINA
7504	AGT	AGC		SERINA	SERINA
7518	GTT	GCT	2471	VALINA	ALANINA
7642	GAT	GAC		AC. ASPARTICO	AC. ASPARTICO
7759	TTT	TTC		FENILALANINA	FENILALANINA
7936	GTT	GTC		VALINA	VALINA
8083	AAA	AAG		LISINA	LISINA
8137	GAG	GAA		AC. GLUTAMICO	AC. GLUTAMICO
8623	GTT	GTC		VALINA	VALINA
8730	AAA	AGA	2879	LISINA	ARGININA
8848	GAA	GAG		AC. GLUTAMICO	AC. GLUTAMICO
9556	GAC	GAT		AC. ASPARTICO	AC. ASPARTICO
9586	TTT	TTC		FENILALANINA	FENILALANINA
9615	ACG	ATG	3174	TREONINA*	METIONINA*
9658	AAA	AAG		LISINA	LISINA
10155	CCC	CTC	3354	PROLINA	LEUCINA
10165	ATT	ATC		ISOLEUCINA	ISOLEUCINA
10183	CTT	CTC		LEUCINA	LEUCINA
10472	-	-		-	-
10701	-	-		-	-

A mudança não conservativa do resíduo de aminoácido na posição 663 (Tabela 5) [asparagina (N) na cepa D3BR/RP1/2003 e lisina (K) na cepa BR74886/02] da proteína E, encontra-se localizada numa região altamente hidrofóbica do domínio III da proteína E, que é o provável sítio de reconhecimento do receptor celular (Hung et al., 2004, Modis et al., 2005). Para determinar se a presença de lisina na posição 663 está associada a casos mais graves da doença, comparamos a seqüência do gene da proteína E de isolados obtidos de pacientes com DF e DHF depositadas no GenBank (Figura 7). A maioria dos vírus obtidos de pacientes com dengue hemorrágico possui uma K na posição 663.

663
▼

BR/RP1/2003	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
BR74886/02	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
D3BR/PV6/03	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
D3PY/YA2/03	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
D3PY/A39/03	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Mart-1999-85	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
PANAMA/94	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
MEXICO/96	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
MEXICO/95	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Cuba116/00	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Nicaragua24/94	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Cuba21/02	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Cuba580/01	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Polinesia/1994	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Polinesia/1992	DF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Taiwan/98/407	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Taiwan/98/388	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Taiwan/98/368	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Thailand/1998	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Indonesia/1998	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	I	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Indonesia/98	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	I	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Thailand/1994	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Indo/1998	DF -	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	I	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Bangkok/1987	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	V	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R
Java/1998	DHF	T	K	K	E	E	F	V	N	I	E	A	E	P	F	F	G	E	S	N	I	I	I	G	I	G	D	K	A	L	K	I	N	W	Y	K	R	G	S	S	I	G	K	M	F	E	A	T	A	R	G	A	R	R

Figura 7. Alinhamento da seqüência de aminoácidos de uma região do domínio III da proteína E, da cepa brasileira D3BR/RP1/2003 com outras cepas disponíveis no GenBank: AY679147, DQ118876, DQ118891, DQ118885, AY099337, DQ341209, DQ341203, DQ341202, AY702032, AY702033, AY702031, AY702030, AY744685, AY744683, DQ675528, DQ675526, DQ675525, DQ675521, AB189127, AB189126, AY876494, DQ675520, AY676352, AY265857.

4.4. Análise filogenética

A seqüência genômica completa da cepa D3BR/RP1/2003 foi alinhada com seqüências correspondentes a outras cepas de DENV-3, depositados no GenBank. Com base nesse alinhamento uma árvore filogenética foi construída pelo método de máxima parsimônia que mostrou uma próxima relação da cepa D3BR/RP1/2003 com o isolado BR74886/02, e ambos, com outros vírus pertencentes ao genótipo III (Figura 8).

Na tentativa de encontrar sinais de recombinação gênica entre os vírus incluídos na árvore filogenética da Figura 8, diversas árvores filogenéticas foram construídas com base nas seqüências individuais das diferentes regiões não codificadoras e regiões codificadoras das diferentes proteínas virais (Anexo). Na maioria das árvores se mantém uma estreita relação entre as cepas brasileiras, porém, quando analisadas as regiões codificadoras da proteína E e NS5, a cepa D3BR/RP1/2003 está mais proximamente relacionada com a cepa Mart-1999-85 da Ilha da Martinica (Anexo), do que com a cepa brasileira BR74886/02 sugerindo um evento de recombinação. Para confirmar este achado, foram alinhadas as seqüências dos genes das proteínas E e NS5 das duas cepas brasileiras com outras seqüências disponíveis no GenBank e pertencentes a isolados das Américas. As árvores construídas com base nesses alinhamentos mostraram novamente que a cepa D3BR/RP1/2003, se encontra mais proximamente relacionada às cepas da Martinica do que à cepa BR74886/02 (Figura 9 e 10).

Evidências de recombinação gênica foram observadas também entre as cepas Asiáticas. As cepas de Bangladesh se agrupam com cepas da Indonésia (Indo-1982) e das Filipinas (Phi-1997) quando analisadas as regiões codificadoras das proteínas NS2a e NS2b (Anexos 6 e 7), porém, quando analisadas as outras regiões do genoma viral, essas cepas se agrupam de forma diferente.

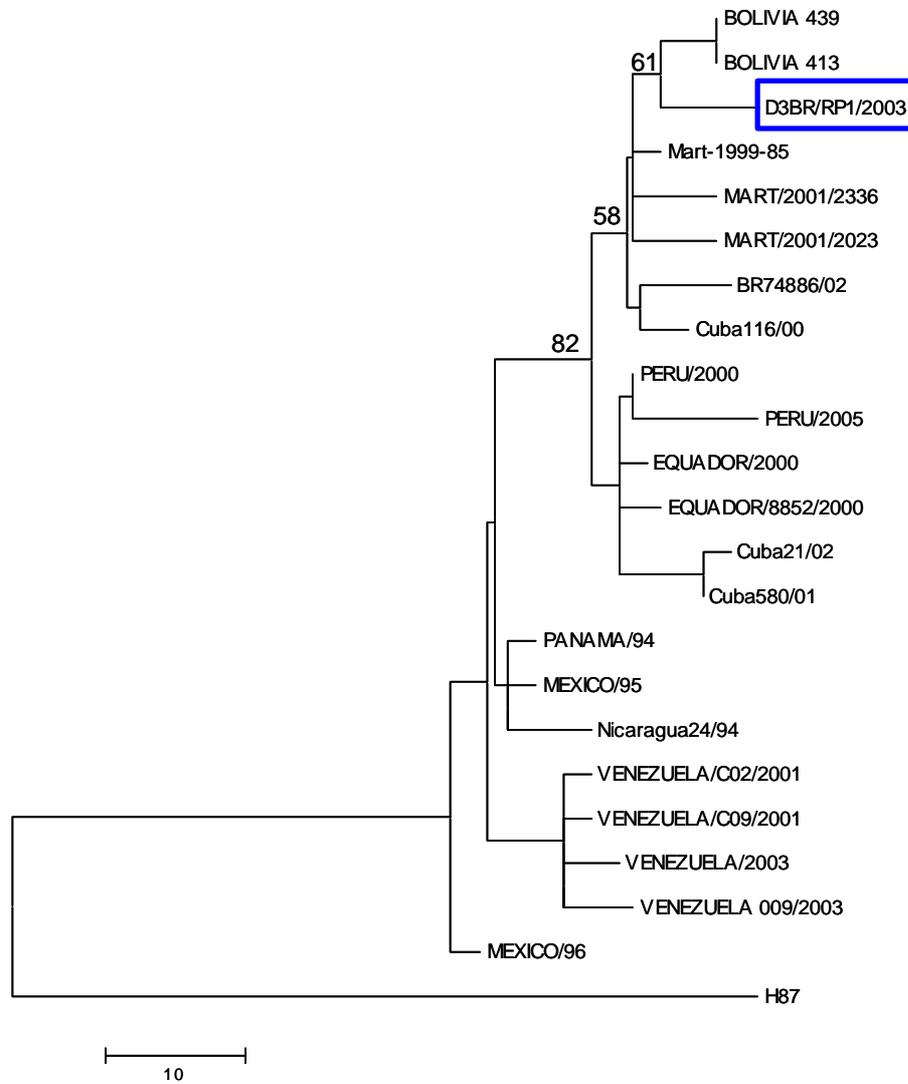


Figura 9. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene da proteína E de DENV-3 americanos. A cepa D3BR/RP1/2003 está em destaque na caixa.

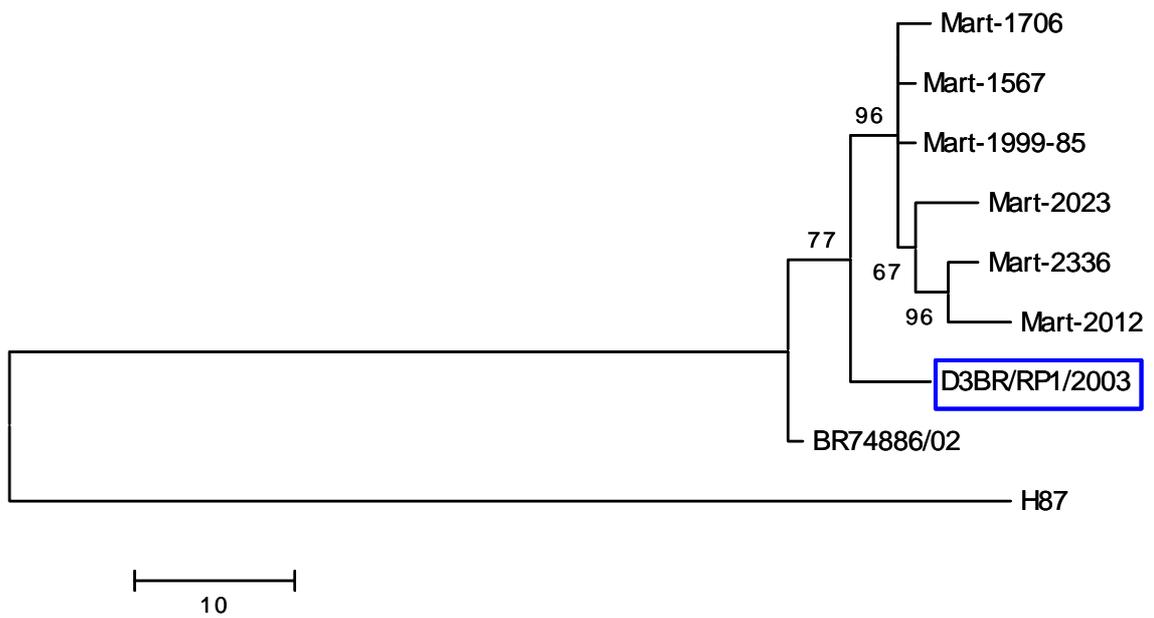


Figura 10. Árvore filogenética baseada na seqüência do gene da proteína NS5 de DENV-3 americanos. A cepa D3BR/RP1/2003 está em destaque na caixa.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho descrevemos pela primeira vez a seqüência completa de um isolado brasileiro de DENV-3 obtido de um paciente com dengue clássico. O seqüenciamento completo do genoma de isolados obtidos de pacientes com diferentes formas de evolução da doença poderiam auxiliar num melhor entendimento dos fatores genéticos envolvidos no aparecimento dos casos mais graves. Na tentativa de identificar alguma região genômica envolvida na patogênese da doença, comparamos a seqüência da cepa D3BR/RP1/2003, isolada de um paciente com dengue clássico, com a cepa BR74886/02, isolada por Miagostovich et al, 2006, a partir de um caso fatal de dengue hemorrágico. Esta comparação mostrou a presença de mutações de nucleotídeos e aminoácidos distribuídos homogeneamente em todo o genoma viral. Dessas mutações, uma não conservada [asparagina (N) na cepa D3BR/RP1/2003 por lisina (K) na cepa BR74886/02] encontra-se na posição 663 da poliproteína correspondente à região C-terminal do domínio III da proteína E (aa 583 até 675) implicada no reconhecimento do receptor celular (HUNG et al., 2004, MODIS et al., 2005). A glicoproteína E está presente na superfície do DENV, sendo responsável pela ligação viral ao receptor celular, fusão do envelope viral com a membrana do endossomo em pH ácido durante o processo de penetração, e montagem das partículas virais. A glicoproteína E representa o antígeno dominante do vírus e o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (CHEN et al., 1996). A maioria dos determinantes antigênicos que reagem com anticorpos está exposto na superfície da proteína e, portanto, são hidrofílicos (BERZOFSKY, 1985; SUTCLIFFE et al., 1983). Baseado neste conceito, algoritmos que calculam a hidrofiliidade tem sido utilizados para predizer a antigenicidade (HOPP et al., 1981; KYTE et al., 1982). A maioria dos variantes de flavivirus resistentes à neutralização possui substituições de aminoácidos que causam mudanças de carga, e é conhecido que resíduos carregados são importantes na interação de sítios antigênicos com anticorpos (HASEGAWA et al., 1992; JIANG et al., 1993; MANDL et al., 1989). A mudança na posição 663 de um aminoácido

neutro (Asn) por outro básico (Lys) poderia levar a um aumento da força de ligação do vírus ao receptor celular, e por sua vez, isto poderia estar relacionado ao aumento da virulência. Por outro lado, essa mudança poderia evitar o reconhecimento dos anticorpos neutralizantes. Para analisar se a presença de Lys na posição 663 está associada aos casos mais graves, comparamos a seqüência de aminoácidos de outros isolados de DENV-3 obtidos de pacientes com dengue clássico e dengue hemorrágico disponíveis no GenBank. Esta comparação mostrou uma maior freqüência de Lys em vírus obtidos de pacientes com DHF (Figura 7). Entretanto, nessa análise foram incluídas cepas do DENV-3 de genótipos diferentes. Essa mutação poderia estar relacionada com o genótipo e não com a virulência. Para avaliar melhor esta associação deveria ser analisado um número maior de vírus pertencentes ao mesmo genótipo; infelizmente existem poucos DENV-3 do genótipo III, isolados de pacientes com dengue hemorrágico depositados no GenBank. Sendo assim, faz-se necessário o seqüenciamento completo do genoma de vários vírus isolados a partir de pacientes com dengue hemorrágico, na tentativa de identificar fatores genéticos relacionados com a virulência.

Lietmayer et al., (1999) sugeriram que mutações no sítio de reconhecimento do receptor celular estariam relacionadas com o aumento da patogenia viral quando analisadas diversas cepas de DENV-2 obtidas de pacientes com DF e DHF/DSS. Nesse trabalho, os autores encontraram mutações de aminoácidos que envolviam mudanças de carga na região da proteína E, principalmente uma mutação na posição 668 de Asp, aminoácido polar carregado negativamente, no genótipo Americano por Asn, aminoácido polar neutro, no genótipo Asiático sugerindo que a presença de Asn nessa posição estaria associada com o aumento da virulência. Entretanto, em nosso trabalho observamos que tanto os DENV-3 obtidos de pacientes com DF quanto aqueles obtidos de pacientes com DHF/DSS apresentam Asn na posição E-668, sugerindo que esse sítio não está associado à virulência (Figura 7).

A análise filogenética incluindo DENV-3 isolados em todo o mundo com seqüências completas depositadas no GenBank mostrou que a cepa D3BR/RP1/2003 pertence ao genótipo III, o qual corresponde ao genótipo originalmente introduzido nas Américas em 1994 e que circula até hoje (CDC, 1995; MESSER et al, 2003; AQUINO et al., 2006; DÍAZ et al, 2006). Entretanto, o DENV-3, genótipo III, circulante nas Américas é geneticamente diferente daquele originalmente introduzido devido ao processo evolutivo que o vírus vem sofrendo, gerando assim uma ampla diversidade genética (AQUINO et al., 2006). O fator principal na geração da diversidade genética do DENV é a alta taxa de mutação, característica comum entre os vírus de RNA pela falta de fidelidade da RNA polimerase viral. Por outro lado, trabalhos recentes indicam que a recombinação poderia ser potencialmente importante na geração dessa diversidade genética (HOLMES et al., 1999; WOROBEY et al., 1999, Twiddy et al., 2003). O evento de recombinação poderia ocorrer no hospedeiro humano ou no vetor coinfectado por diferentes cepas virais. Worobey et al.(1999), identificaram recombinantes incluindo membros dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Nesse trabalho, os autores construíram diversas árvores filogenéticas utilizando diferentes regiões de 150 pb incluindo os genes das proteínas C, prM, E e NS1. Essas árvores mostraram que alguns vírus apresentavam posições topológicas diferentes, apoiadas por um alto valor de *bootstrap*, dependendo da região genômica analisada, indicando que os mesmos foram originados por eventos de recombinação. Twiddy et al.(2003) analisando o gene da proteína E observaram também eventos de recombinação em DENV-2, DENV-4, JE e SLE utilizando a mesma metodologia descrita por Worobey et al.(1999). Na tentativa de encontrar sinais de recombinação gênica entre os DENV-3 analisados em nosso trabalho, diversas árvores filogenéticas foram construídas baseadas nas seqüências individuais das diferentes regiões não codificadoras e codificadoras das diferentes proteínas virais (Anexos de 1 a 11). Na maioria das árvores filogenéticas foi observada uma estreita relação entre as cepas brasileiras,

porém, quando analisadas as regiões codificadoras da proteína E e NS5, a cepa D3BR/RP1/2003 está mais proximamente relacionada com a cepa Mart-1999-85 da Ilha da Martinica (Anexos 4 e 11), do que com a cepa brasileira BR74886/02, sugerindo um possível evento de recombinação. Assim, a cepa D3BR/RP1/2003 provavelmente foi originada por um evento de recombinação gênica de duas cepas diferentes, seja antes ou após sua introdução no país. As relações filogenéticas sugestivas de recombinação gênica foram também observadas neste trabalho quando analisados vírus asiáticos, sugerindo que este evento seja freqüente entre os DENV-3. Os processos de recombinação gênica estariam participando ativamente na geração de diversidade genética entre os DENV o que poderia ter um importante papel na evolução desses vírus com potencial de gerar cepas mais virulentas ou com maior potencial de transmissão. Portanto, estudos relacionados com a investigação dos mecanismos de recombinação gênica entre estes vírus são de grande importância para um melhor entendimento da participação desse mecanismo na evolução viral.

6. CONCLUSÕES

Diante dos dados apresentados podemos concluir que:

1. A organização genômica da cepa D3BR/RP1/2003 é similar a aquela correspondente ao vírus dengue sorotipo 3 (DENV-3) genótipo III;
2. Não foram observadas diferenças significativas no genoma dos vírus isolados de pacientes com dengue clássico quando comparadas com aquelas isoladas de pacientes com dengue hemorrágica;
3. Sinais sugestivos de recombinação gênica foram observados tanto entre os vírus americanos como entre os vírus asiáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUINO, V.H.; ANATRIELLO E.; GONÇALVES, P.F.; DA SILVA, E.V.; VASCONCELOS, P.F.; VIEIRA, D.S.; BATISTA, W.C.; BOBADILLA, M.L.; VAZQUEZ, C.; MORAN, M.; FIGUEIREDO, L.T. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 710-715, 2006.
- BERZOFSKY, J.A. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science*, 229 (4717): 932-940, 1985.
- BURKE, D.S.; NISALAK, A.; JOHNSON, D.E.; SCOTT, R.M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med.*, 38: 172-180, 1988.
- CASALI, C.G.; PEREIRA, M.R.R.; SANTOS, L.M.J.G.; PASSOS, M.N.P., FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O.; ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(4): 296-299, 2004.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama, October–November 1994. *JAMA*, 273: 840–841, 1995.
- CHIEN, L.J.; LIAO, T.L.; SHU, P.Y.; HUANG, J.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 1295–1304, 2006.
- COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J. Virol.*, 77: 3929-3938, 2003.
- DEUBEL, V.; LAILLE, M.; HUGHNOT, J.P.; CHUNGUE, E.; GUESDON, J.; DROUET, M.T.; BASSOT, S.; CHEVRIER, D. Identification of dengue sequences by genomic amplification: Rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J. Virol. Methods*, 30: 41-54, 1990.

- DIAMOND, M.S.; EDGIL, D.; ROBERTS, T.G.; LU, B.; HARRIS, E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J. Virol.*, 74: 7814-7823, 2000.
- FIGUEIREDO, L.T.M.; CAVALCANTE, S.M.B.; SIMÕES, M.C. Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. *Bulletin of Pan American Health Organization*. 24: 217-225, 1990.
- FUNASA. Casos de dengue no Brasil. Brasília. Ministério da Saúde, 2002.
- GOMES-RUIZ, A.C.; DE PAULA, S.O.; NASCIMENTO, R.T; FONSECA, B.A.L. SYBR Green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. *Journal of Medical Virology*, 78: 760–763, 2006.
- HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239: 476-481, 1988.
- HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology*, 191: 158-165, 1992.
- HOLLAND, J.J.; SPINDLER, K.; HORODYSKI, F.; GRABAU, E.; NICHOL, S.; VANDEPOL, S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, 215:1577-1585, 1982.
- HOLLAND, J. J.; DELATORRE, J. C.; STEINHAEUER, D. A. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176: 1-20, 1992.
- HOLMES, E.C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 405–409, 1999.
- HOPP, T.P.; WOODS, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 78 (6): 3824-3828, 1981.
- HUNG, J.J.; HSIEH, M.T.; YOUNG, M.J.; KAO, C.L.; KING, C.C.; CHANG, W. An External Loop Region of Domain III of Dengue Virus Type 2 Envelope Protein Is

- Involved in Serotype-Specific Binding to Mosquito but Not Mammalian Cells. *J. Virology*, 78: 378–388, 2004.
- JIANG, W.R.; LOWE, A.; HIGGS, S.; REID, H.; GOULD, E.A. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. *J. Gen. Virol.*, 74: 931-935, 1993.
- KIMURA, R.; HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku*, 3379: 629-633, 1944.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157: 105-132, 1982.
- LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 545-551, 1992.
- LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J. Gen. Virol.*, 78: 2279-2286, 1997.
- LEITMEYER, K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON, RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol.*, 73: 4738-4747, 1999.
- LEWIS, J.A.; CHANG, G.J.; LANCIOTTI, R.S.; KINNEY, R.M.; MAYER, L.W.; TRENT, D.W. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 197: 216-224, 1993.
- LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. in *Fields Virology* (Fields Knipe, D.M. & Howley, P.M.), 991-1041. Lippincott Williams & Wilkins Press, Philadelphia, 2001.
- LOKE, H.; BETHELL, D.B.; PHUONG, C.X.; DUNG, M.; SCHNEIDER, J.; WHITE, N.J.; DAY, N.P.; FARRAR, J.; HILL, A.V. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis.*, 184:1369-1373, 2001.

- MANDL, C.W.; GUIRAKHOO, F.; HOLZMANN, H.; HEINZ, F.X.; KUNZ, C. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *J. Virol.*, 63(2): 564-571, 1989.
- MANGADA, M.N.; IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology*, 244: 458-466, 1998.
- MATHEW, A.; KURANE, I.; GREEN, S.; STEPHENS, H.A.; VAUGHN, D.W.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; CHANDANAYINGYONG, D.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol.*, 72: 3999-4004, 1998.
- MESSER, W. B.; GUBLER, D. J.; HARRIS, E.; SIVANANTHAN, K.; DE SILVA, A. M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 800-809, 2003.
- MIAGOSTOVICH, M.P.; DOS SANTOS, F.B.; DE SIMONE, T.S.; COSTA, E.V.; FILIPPIS, A.M.; SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R.M. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res*, 35(8): 869-872, 2002.
- MIAGOSTOVICH, M.P.; DOS SANTOS, F.B.; FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; DA COSTA, E.V.; TAVARES, F.N.; COELHO, J.O.; NOGUEIRA, R.M. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(3): 307-313, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da saúde. Tópicos de saúde. Dengue. www.saude.gov.br; 2007.

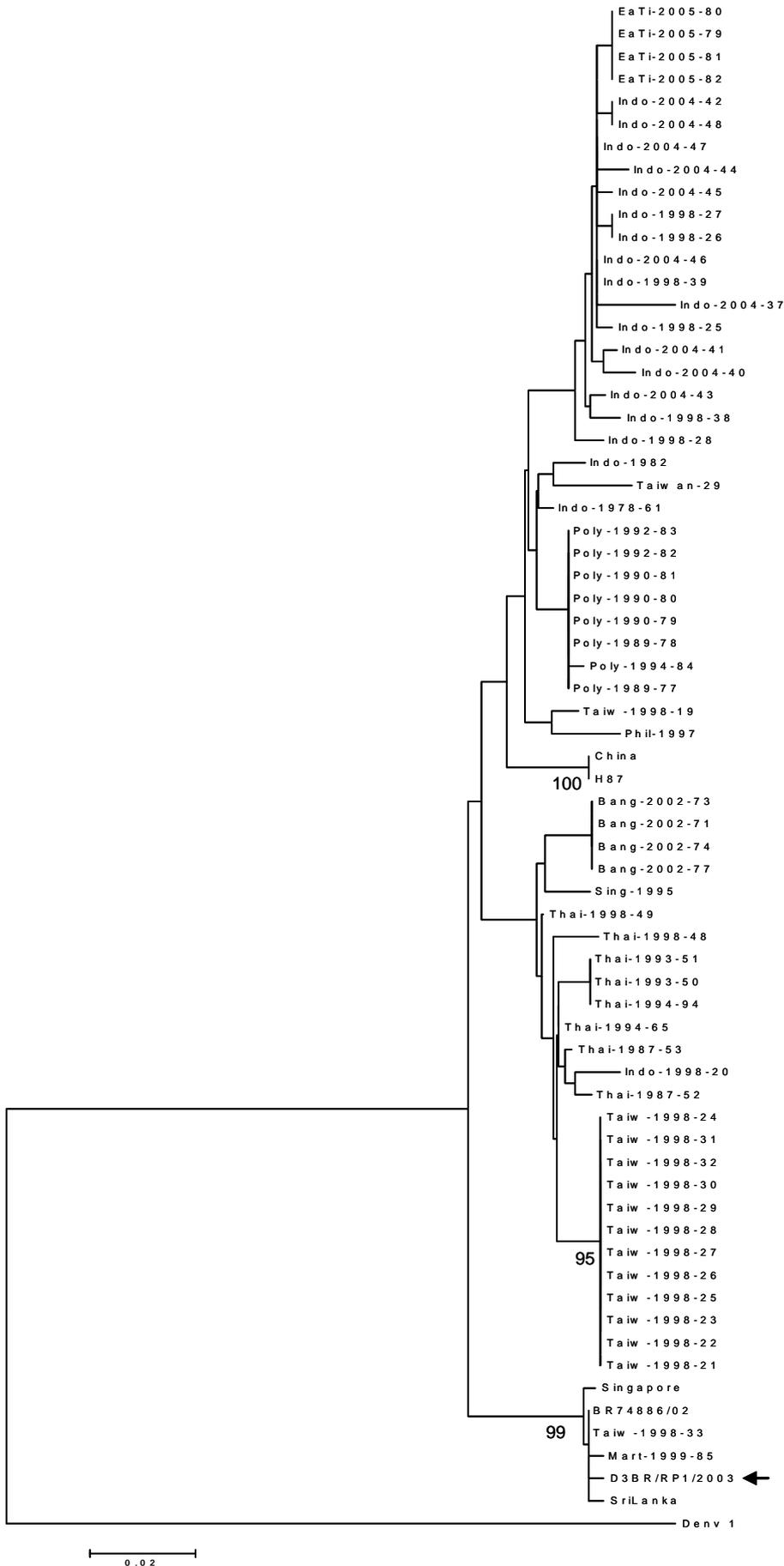
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. *J Virology* 79: 1223–1231, 2005.
- MONATH, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2395-2400, 1994.
- MORENS, D.M.; MARCHETTE, N.J.; CHU, M.C.; HALSTEAD, S.B. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, 45: 644-651, 1991.
- NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E. Isolation of dengue type 2 in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 85: 253, 1990.
- NOGUEIRA, R.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; DE FILIPPIS, A.M.; PEREIRA, M.A.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 (7): 925-926, 2001.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Haemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washinton: Pan American Health Organization, 548: 98, 1994.
- PASSOS, M.N.P.; SANTOS, L.M.J.G.; PEREIRA, M.R.R.; CASALI, C.G.; FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O., ALEXANDRE, A.J.; MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37 (4): 293-295, 2004.
- PIRES NETO, R.J.; LIMA, D.M.; DE PAULA, S.O.; LIMA, C.M.; ROCCO, I.M.; FONSECA, B.A.L. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *J. Med. Biol.Res.*, 38: 843-852, 2005.

- RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174: 479-493, 1990.
- RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M.T.; NOGUEIRA, R.M.; ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, 230: 244-251, 1997.
- ROCCO, I.M.; BARBOSA, M.L.; KANOMATA, E.H. Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 40(3):151-154, 1998.
- ROCCO, I.M. Instituto Adolfo Lutz, 1999. (dado não publicado).
- SANGKAWIBHA, N.; ROJANASUPHOT, S.; AHANDRIK, S.; VIRIYAPONGSE, S.; JATANASEN, S.; SALITUL, V.; PHANTHUMACHINDA, B.; HALSTEAD, S.B. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.*, 120: 653-669, 1984.
- SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81: 245-246, 1986.
- SHOPE, R.E. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Anais de Microbiologia*. 11: 167-171, 1963.
- SHU, P.Y.; CHANG, S.F.; KUO, Y.C.; YUEH, Y.Y.; CHIEN, L.J.; SUE, C.L.; LIN, T.H.; HUANG, J.H. Development of group-and serotype-specific one-step sybr green i-based real-time reverse transcription-pcr assay for dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2408–2416, 2003.

- SHURTLEFF, A.C.; BEASLEY, D.W.; CHEN, J.J.; NI, H.; SUDERMAN, M.T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S.C.; WATTS, D.M.; RUSSELL, K.L.; BARRETT, A.D. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology*, 281: 75-87, 2001.
- SILER, J.F.; HALL, M.W.; KITCHENS, A.P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.*, 29:1-304, 1926.
- SPAULDING, A.C.; KURANE, I.; ENNIS, F.A.; ROTHMAN, A.L. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. *J Virol.*, 73: 398-403, 1999.
- SUDHIR, K.; KOICHIRO, T.; NEI, M. Mega 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163, 2004.
- SUTCLIFFE, J.G.; SHINNICK, T.M.; GREEN, N.; LERNER, R.A. Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science*, 219 (4585): 660-666, 1983.
- VASCONCELOS, P.F.C.; MENEZES, D.B.; MELO, L.P.; PESSOA, E.T.F.P.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TIMBÓ, M.J.; COELHO, I.C.B.; MONTENEGRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; ANDRADE, F.M.O.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*. 37: 253-255, 1995.
- WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A.D.T.; WATOWICH, S.J.; GUBLER, D.J.; WEAVER, S.C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* 74: 3227-3234, 2000.

- WATTS, D.M.; PORTER, K.R.; PUTVATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C.G.; HALSTEAD, S.B. Failure of secondary dengue 2 genotype I infection to cause dengue hemorrhagic fever. *Lancet*, 354: 1431-1434, 1999.
- WESTAWAY, E.G.; BRINTON, M.A.; GAIDAMOVICH, S.Y.; HORZINEK, M.C.; IGARASHI, A.; KAARIAINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K.; TRENT, D.W. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 24: 183-192, 1985.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue, dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in the context of the integrated management of childhood illness. Department of Child and Adolescent Health and Development, Geneva, 2005.
- WOROBAY, M.; RAMBAUT, A; HOLMES, E.C. Evolution Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7352–7357, 1999.

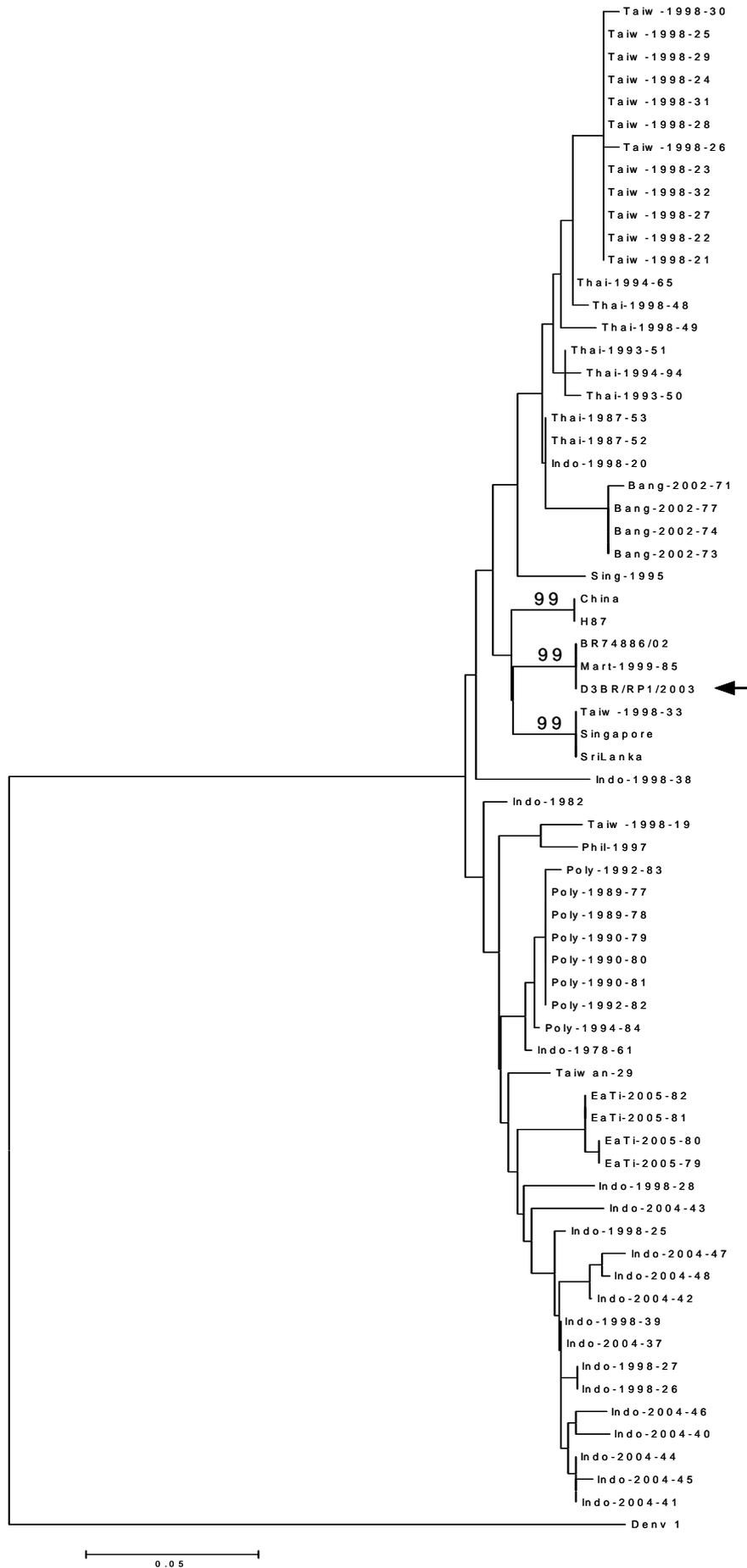
8. ANEXOS



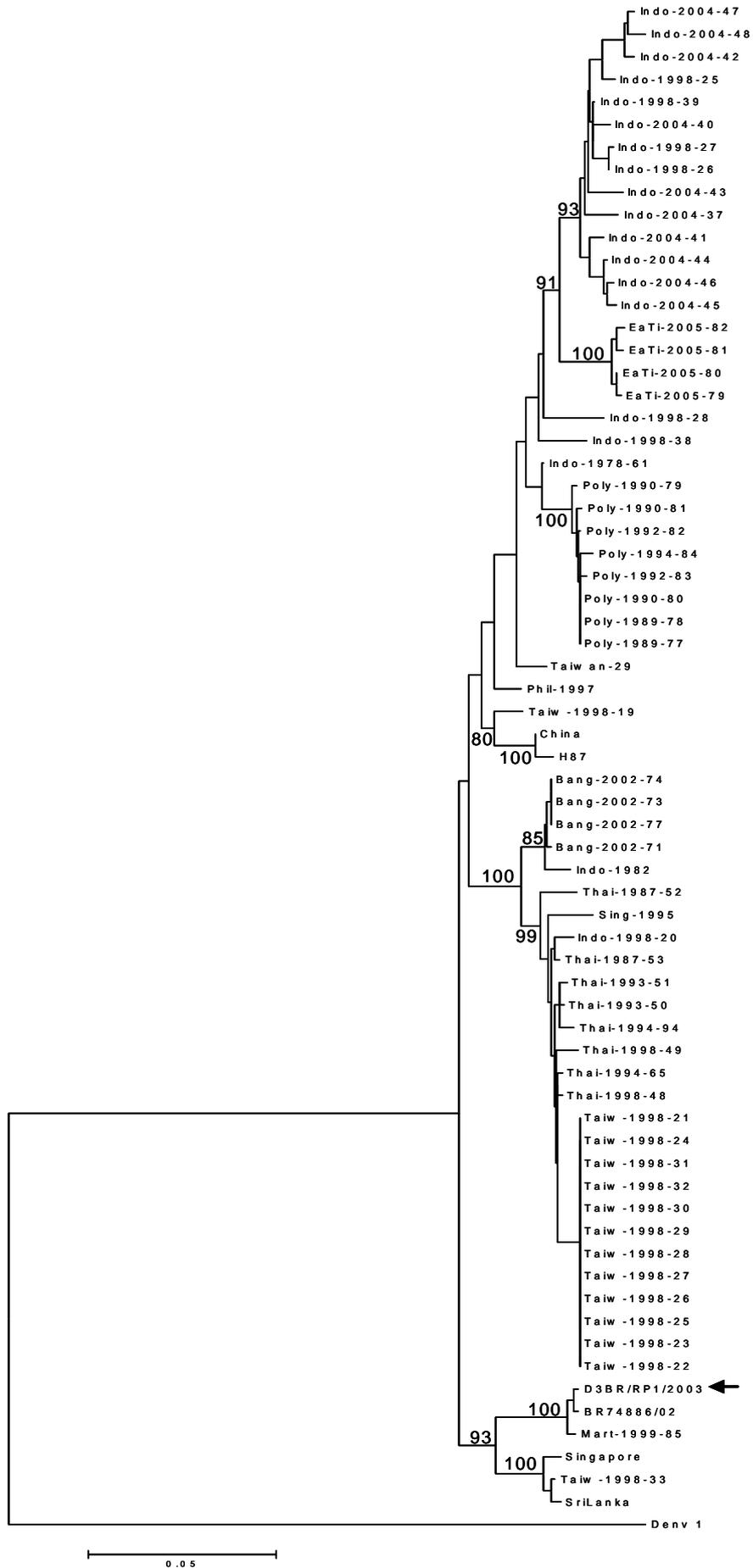
Anexo 1. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína C.



Anexo 2. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína prM.



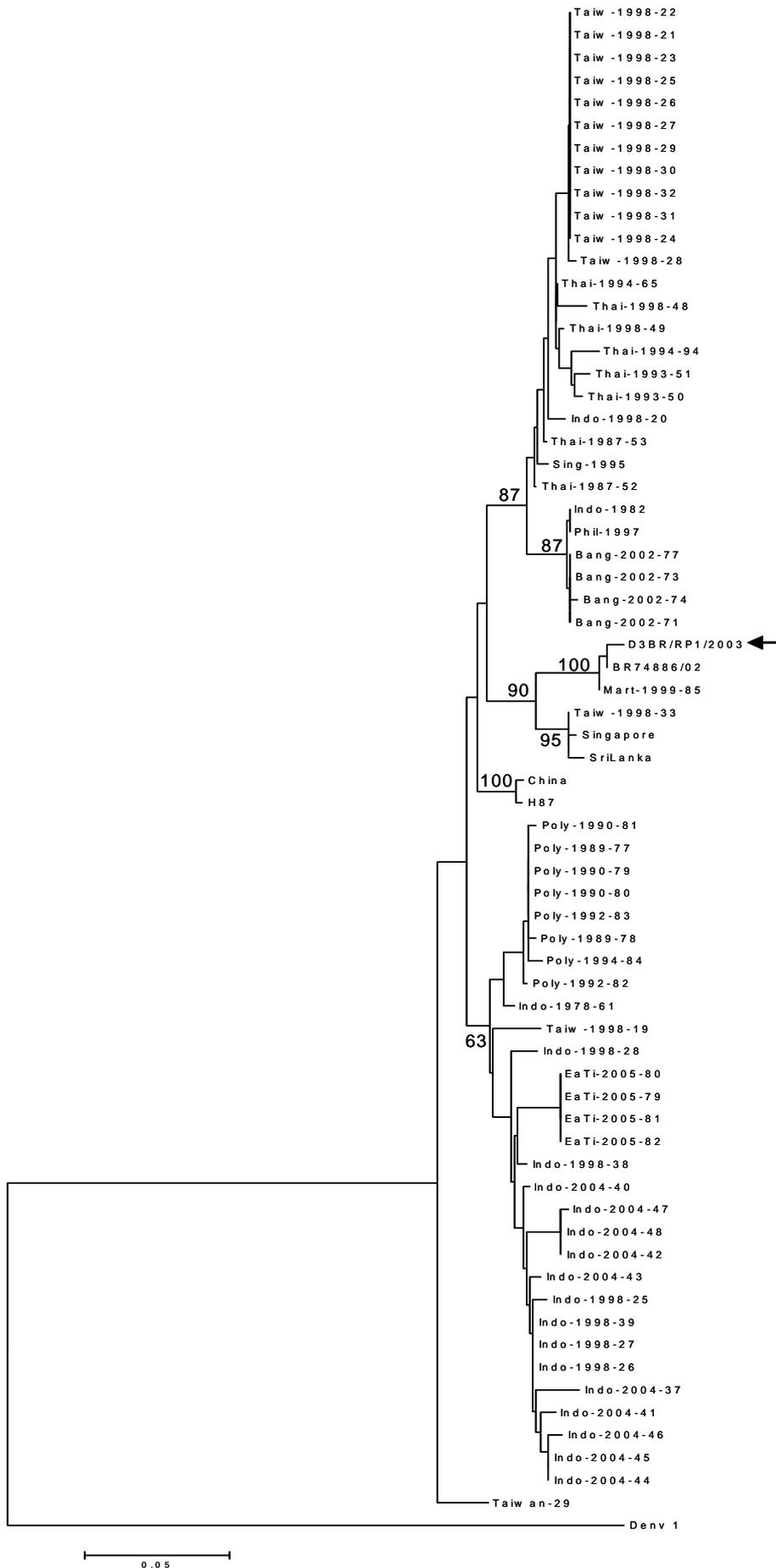
Anexo 3. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína M.



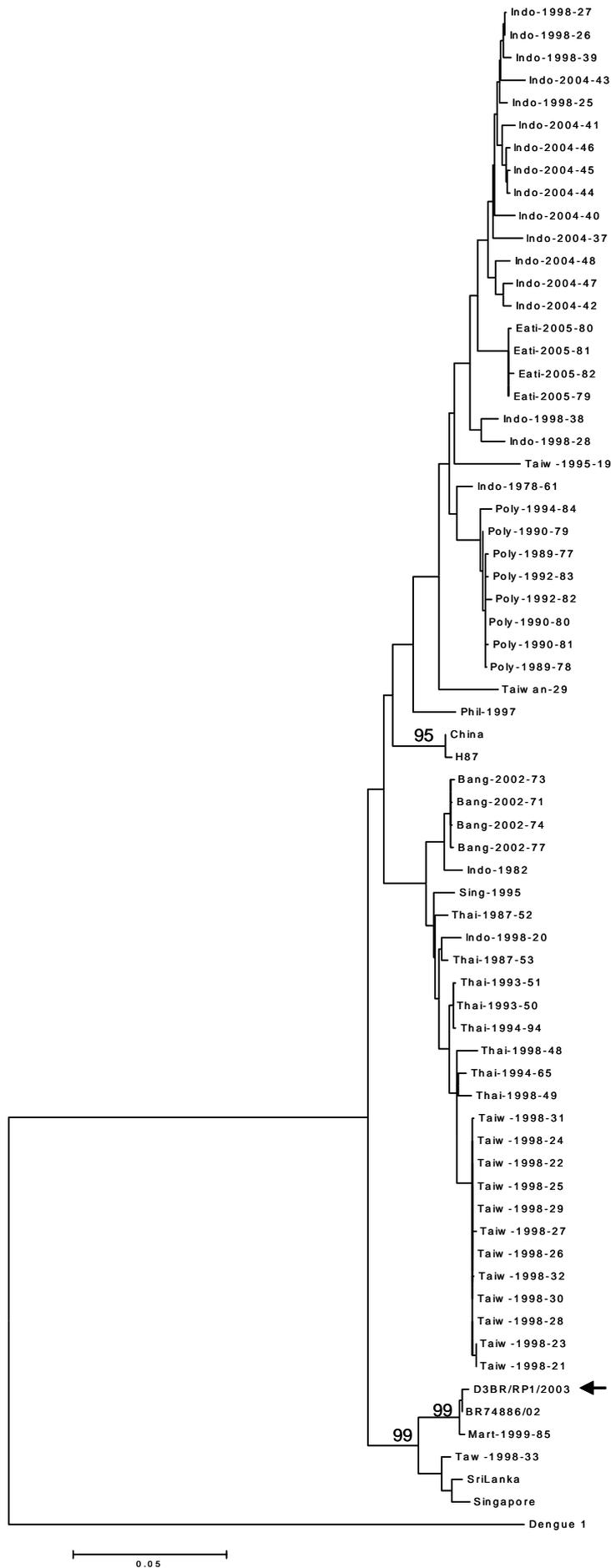
Anexo 5. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS1.



Anexo 6. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS2A.



Anexo 7. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS2B.



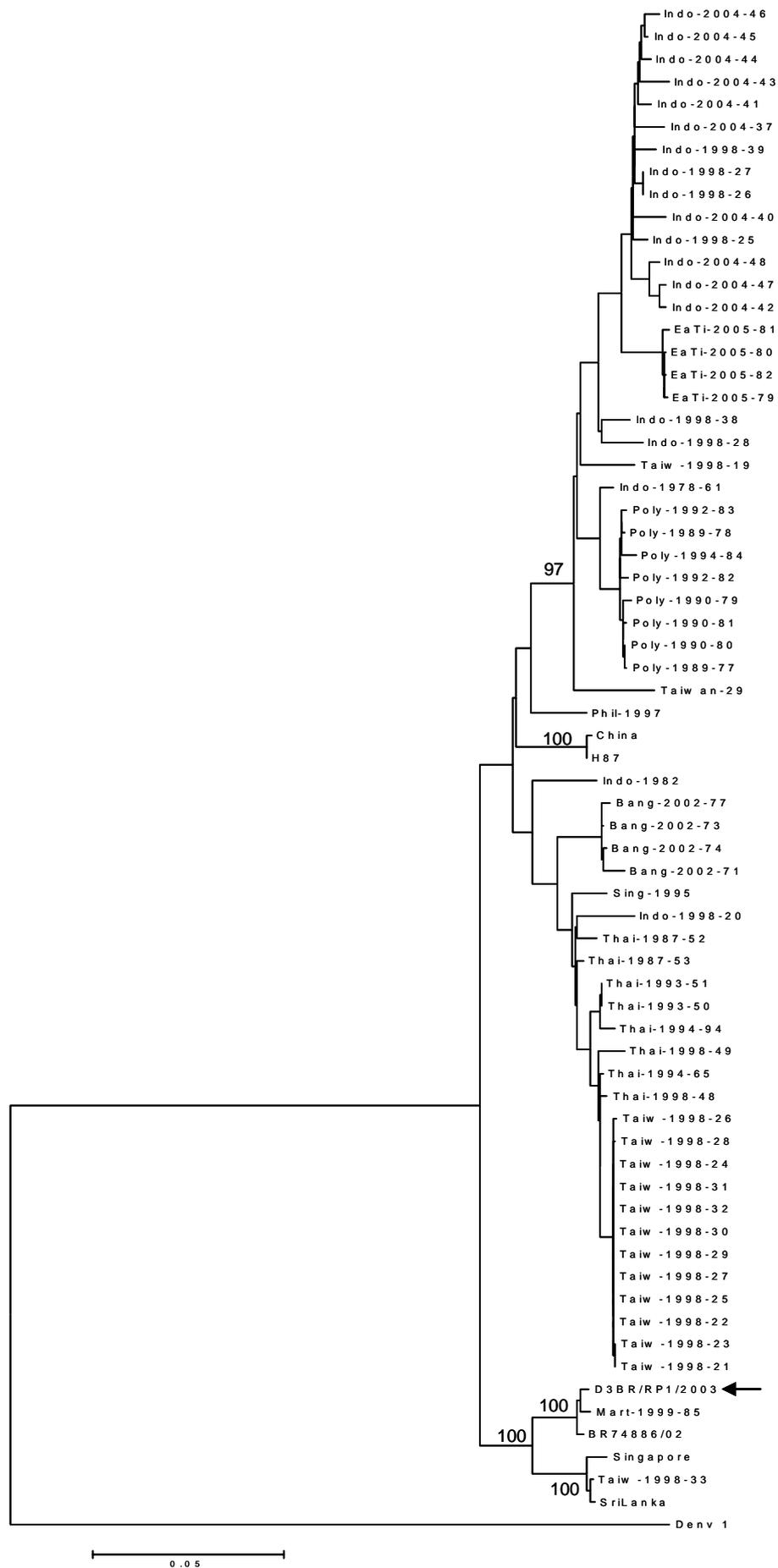
Anexo 8. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS3.



Anexo 9. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS4A.



Anexo 10. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS4B.



Anexo 11. Árvore filogenética construída com base na seqüência da região codificadora da proteína NS5.