

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUÍS GUSTAVO DA SILVA FAGUNDES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
Dengue virus 1 ISOLADO EM ALFENAS, MINAS GERAIS**

Alfenas-MG

2014

LUÍS GUSTAVO DA SILVA FAGUNDES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
***Dengue virus 1* ISOLADO EM ALFENAS, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências aplicadas à Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas-MG

2014

Fagundes, Luís Gustavo da Silva.

Caracterização molecular e análise filogenética de *Dengue virus 1* isolado em Alfenas, Minas Gerais / Luís Gustavo da Silva Fagundes - 2014.

82 f. -

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Dengue - vírus. 2. Febre Hemorrágica da Dengue. 3. Filogenia.
I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD: 614.571



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas MG. CEP 37130-000
Fone (0xx35) 3299-1392/3299-1300



LUÍS GUSTAVO DA SILVA FAGUNDES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Dengue virus 1*
ISOLADO EM ALFENAS, MINAS GERAIS.

A banca abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG.
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovado em: 17, 01, 2014

Prof. Dr.: Luiz Felipe Leomil Coelho (Presidente)

Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Prof. Dr.: Breno de Melo Silva (Membro externo)

Breno de Melo Silva

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Prof. Dr.: Fábio Antônio Colombo (Membro interno)

Fábio Antônio Colombo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG

Dedico a Deus, o mestre, que nos deu o poder do discernimento e a capacidade da inteligência. Aos meus familiares e amigos, que me apoiaram e tornaram possível a realização de mais este passo, na longa caminhada da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades, que sem dúvida, são presentes de suas mãos.

À minha família, Elisângela minha esposa, João Pedro meu filho, que tiveram paciência e souberam entender as muitas vezes que tive de deixar de dar atenção a eles, para conclusão deste trabalho. Agradeço também aos meus sogros, João e Valéria, e a minha mãe, Divanda, que sempre oram por mim.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Pesquisas em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp), na pessoa do professor Dr. Maurício Lacerda Nogueira, que abriram as portas de seu laboratório e nos permitiu avançar em nossas pesquisas.

A professora Betânia Paiva Drumond, do departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG, que com seus conhecimentos contribuiu de forma imprescindível na realização deste trabalho.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Vacinas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL/MG, que compartilharam seus conhecimentos e contribuíram de forma exponencial na realização deste trabalho.

Agradeço de forma especial ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, que me acolheu em seu laboratório, foi um norte em todos os momentos da pesquisa, e acima de tudo um parceiro, com o qual se pode contar a todo o momento, meu muito obrigado.

A todos aqueles, que por lapso de memória ou por não encontrar palavras não agradei aqui.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A dengue é uma arbovirose transmitida ao ser humano, através da picada de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* infectadas. A doença é endêmica em 112 países da África, das Américas, do Mediterrâneo, do Sudeste Asiático e do Pacífico Oeste. Conforme Estimativas da Organização Mundial de Saúde, 40% da população mundial vive em áreas de risco para dengue. A caracterização molecular contribui para compreender e acompanhar a diversidade genética do *Dengue virus*, assim como, a variabilidade da virulência dos isolados virais circulantes. Em Minas Gerais, circulam os quatro sorotipos do *Dengue virus*, porém poucos estudos vêm sendo realizados sobre sua dinâmica populacional. O isolado BR/Alfenas/2012, analisado neste estudo, foi obtido a partir da amostra de soro de um paciente com febre hemorrágica da dengue. A região codificadora da proteína E e NS5 foram amplificadas por RT-PCR e utilizadas nos estudos filogenéticos. As análises agruparam este isolado no genótipo V, linhagem L1, próxima a isolados provenientes do Rio de Janeiro, do Norte do Brasil e outros isolados da Venezuela e Colômbia. A análise filogeográfica forneceu evidências que o isolado BR/Alfenas/2012 é descendente direto de amostras do Rio de Janeiro de 2010 e 2011, tendo como ancestral comum o isolado DENV-1/VE/BID-V2468/2008, proveniente da Venezuela. A análise da região codificadora da proteína E, mostrou que o isolado BR/Alfenas/2012 apresenta uma diferença de 14 bases em relação aos outros isolados presentes no mesmo genótipo e linhagem, gerando desta forma, mutações sinônimas e não-sinônimas. Para caracterizar o potencial virulento desta amostra, camundongos *Swiss* foram infectados por via intraperitoneal com 1×10^4 unidades formadoras de placas. Sete dias pós-infecção os animais foram sacrificados e o fígado retirado para estudo histopatológico, onde os animais infectados apresentaram infiltrados inflamatórios, esteatose hepática, além de edema, hemorragia e pontos de necrose focais. Este é o primeiro relato do isolamento de DENV-1, no Sul do estado de Minas Gerais, o que possibilita iniciar uma inferência sobre a distribuição genética e diversidade desse vírus, nesta região.

Palavras-chave: *Dengue virus*. Febre Hemorrágica da Dengue. Análise filogenética.

ABSTRACT

Dengue virus is an arbovirus transmitted to humans through the bite of infected female *Aedes aegypti* mosquitoes. The disease is endemic in 112 countries in Africa, Americas, Mediterranean, South East Asia and Western Pacific. The World Health Organization estimates that 40% of the world population lives in areas at risk for dengue. Molecular characterization helps to understand and monitor the genetic diversity of DENV, as well as the variability in virulence of circulating viral isolated. The four serotypes of DENV circulate in Minas Gerais state, however few studies have been conducted about the population dynamics of DENV in this state. The isolate BR/Alfenas/2012 analyzed in this study was obtained from the serum sample from a patient with dengue hemorrhagic fever. The coding region of the E and NS5 protein were amplified by RT-PCR and used in phylogenetic studies. The analysis grouped this isolate in genotype V, line L1, getting very close to isolates from Rio de Janeiro, Brazil's North and other isolated from Venezuela and Colombia. The phylogeographic analysis provided evidence that the isolated BR/Alfenas/2012 is a direct descendant of samples from Rio de Janeiro in 2010 and 2011, and the common ancestor isolated DENV-1/VE/BID-V2468/2008, from Venezuela. Analysis of the coding region of the E protein showed that the isolated BR/Alfenas/2012 differ from 14 to other isolates from the same genotype and lineage, thereby generating mutations synonymous and non-synonymous. To characterize the virulent potential of this isolate, Swiss mice were infected with 1×10^4 plaque forming units. Seven days after infection, the animals were sacrificed and the liver removed for histopathological analysis. The liver of infected animals showed a presence of inflammatory cells, steatosis and also focal points of edhema, hemorrhage and necrosis. This is the first report of the isolation of DENV-1, in the south of Minas Gerais, which allowed starting an inference about the distribution and genetic diversity of the virus.

Key words: *Dengue virus*. Dengue hemorrhagic fever. Phylogenetic analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados das análises laboratoriais.....	34
Tabela 2 -	Iniciadores desenhados com base na sequência do DENV-1 isolado brasileiro DENV-1/BR/BID-V3490/2008, utilizados para sequenciamento completo dos fragmentos genômicos sobrepostos.....	38
Tabela 3 -	Diferenças de aminoácidos na proteína E entre isolados brasileiros do <i>Dengue virus</i> tipo 1.....	52
Tabela 4 -	Estimativas de divergência evolucionária entre as sequências de bases nitrogenadas da proteína E do DENV-1 amostra BR/Alfenas/2012 e outras amostras pertencentes à mesma linhagem.....	53
Tabela 5 -	Mutações sinônimas presentes no isolado BR/Alfenas/2012 em comparação com outros isolados da linhagem L1.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Região NS5 amplificada (<i>contig</i>) BR/Alfenas/2012.....	43
Quadro 2 - Região da proteína codificadora E amplificada (<i>contig</i>) BR/Alfenas/2012.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	O genoma do DENV.....	16
Figura 2 -	Modelo de uma partícula viral do <i>Dengue virus</i> (<i>virion</i>).....	17
Figura 3 -	Vírus da dengue imaturo e maduro.....	17
Figura 4 -	Ciclo de replicação do DENV.....	19
Figura 5 -	Áreas de alto e baixo risco de ocorrência de dengue.....	23
Figura 6 -	Esquema com as diferentes manifestações clínicas da infecção pelo DENV.....	26
Figura 7 -	Distribuição mundial do DENV.....	31
Figura 8 -	Imagens demonstrando a formação de sincícios em culturas de Células C6/36 infectadas com sobrenadante de 5 ^o passagem do DENV isolado de paciente com FHD.....	41
Figura 9 -	RT-PCR para amplificação da região NS5.....	42
Figura 10 -	Análise filogenética do isolado BR/Alfenas/2012, baseada na região NS5.....	44
Figura 11 -	RT-PCR para amplificação da região codificadora da proteína E.....	45
Figura 12 -	Árvore filogenética com história evolucionária inferida pelo método <i>Maximum Likelihood</i> , a partir do envelope do DENV 1.....	47
Figura 13 -	Análise filogenética de DENV-1 baseada no gene que codifica a proteína E.....	49
Figura 14 -	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos inferida entre os isolados pertencentes ao genótipo V, linhagem L1, através do <i>software</i> MEGA5.....	51
Figura 15 -	Análise histopatológica do fígado de animais infectados com o isolado BR/Alfenas/2012.....	54

LISTA DE SIGLAS

ADEs	- Anticorpos Potencializadores da Infecção (<i>Antibody-Dependent Enhancement</i>)
BSSVS	- <i>Bayesian stochastic search variable selection</i>
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
C	- proteína do Capsídeo
CTMC	- <i>standard continuous-time Markov chain</i>
D	- Domínio
DCC	- Dengue com Complicação
DC-SIGN	- <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	- <i>Dengue virus</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
E	- proteína do Envelope
EUA	- Estados Unidos da América
Fc	- Porção constante das imunoglobulinas
FD	- Febre do Dengue
FHD	- Febre Hemorrágica do Dengue
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
IL	- Interleucina
Ig	- Imunoglobulina
IFN- γ	- Interferon gama
KDa	- Quilodalton
L-15	- Leibowitz 15
M	- glicoproteína de Membrana
MG	- Minas Gerais
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
NC	- Nucleocapsídeo
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ORF	- Janela Aberta de Leitura
PAHO	- Organização Pan-Americana de Saúde
pb	- pares de base
pfu	- unidade formadora de placa

prM	- proteína precursora de Membrana
PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase
RE	- Retículo Endoplasmático
RNA	- Ácido Ribonucleico
RT-PCR	- Transcrição Reversa Reação em Cadeia da Polimerase
SCD	- Síndrome do Choque do Dengue
SFB	- Soro Fetal Bovino
TAPs	- Transportador Associado com o Processamento de Antígeno
TBR	- Árvore de biseção e reconexão (Tree Bisection and Reconnection)
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
UTR	- Regiões não Traduzidas
UNIFAL-MG	- Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	MORFOLOGIA DO <i>Dengue virus</i>	16
2.2	CICLO DE REPLICAÇÃO.....	18
2.3	PATOLOGIA.....	20
2.4	DENV NO BRASIL E NO MUNDO.....	22
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO.....	25
2.6	SOROTIPOS, GENÓTIPOS E VIRULÊNCIA DO <i>Dengue virus</i>	28
3	OBJETIVO GERAL.....	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	ASCPECTOS ÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA.....	33
4.2	CULTURA DE CÉLULAS C6/36 E INFECÇÃO CELULAR.....	34
4.3	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	34
4.4	TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	35
4.4.1	Região codificadora da proteína NS5.....	35
4.4.2	Região codificadora da proteína E.....	36
4.5	PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	36
4.6	SEQUENCIAMENTO.....	37
4.7	ANÁLISE FILOGENÉTICA E EVOLUTIVA.....	38
4.8	INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO DOS ANIMAIS INFECTADOS.....	40
5	RESULTADOS.....	41
6	DISCUSSÃO.....	55
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	APÊNDICES.....	74
	ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose transmitida ao ser humano através da picada de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* infectadas. A doença é atualmente endêmica em 112 países da África, das Américas, do Mediterrâneo, do Sudeste Asiático e do Pacífico Oeste. Para este ano, estima-se que quase metade da população mundial, cerca de 3,6 bilhões de pessoas, esteja vivendo em áreas de risco para dengue (WILDER-SMITH et al., 2012). O *Dengue virus* (DENV) infecta de 50 a 100 milhões de pessoas a cada ano, com 500.000 pacientes desenvolvendo a doença mais grave, ou seja, Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e/ou Síndrome do Choque do Dengue (SCD), levando a internações e cerca de 20.000 mortes, principalmente em crianças (BURKE; MONATH, 2001; GUBLER, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006).

Há variações nas manifestações clínicas causadas pela infecção com o DENV, desde casos assintomáticos, que representam a maioria, ou casos onde ocorra a Febre do Dengue (FD), e a FHD/SCD. Após um período de incubação de 4 a 7 dias, os indivíduos com FD podem apresentar sintomas abruptos, como febre, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgias, prostração, manchas na pele, linfadenopatia e leucopenia. Já na FHD, pode ocorrer plaquetopenia, hemoconcentração, presença de sangramento espontâneo, insuficiência circulatória e choque, podendo levar o paciente a óbito, devido o aumento da permeabilidade vascular (OISHI et al., 2007; RIGAU-PEREZ et al., 1998).

Para acompanhar a dispersão viral, bem como qual sorotipo circula em determinada região, são realizados estudos de caracterização molecular. Esses contribuem para compreender e acompanhar a diversidade genética dos DENV, assim como, a variabilidade da virulência dos isolados virais (HOLMES; BURCH, 2000). A análise genética dos DENV permite o monitoramento da transmissão de genótipos virais, associados ao aparecimento e/ou aumento de casos graves da doença, identificando áreas de alta diversidade viral e padrões de fluxo gênico (FOSTER et al., 2003; MOTA et al., 2002).

Em Minas Gerais, circulam os quatro sorotipos do DENV (MINAS GERAIS, 2013). O que pode favorecer o aparecimento dos casos graves da doença. Porém, poucos estudos vêm sendo realizados sobre a dinâmica populacional do DENV no estado. No Sul do estado de Minas Gerais, este é o primeiro relato do isolamento e

análise filogenética do DENV-1, o que possibilita iniciar uma inferência sobre a distribuição genética e diversidade desse isolado, bem como compreender a propagação espaço-temporal do DENV na região.

A doença causada pelo DENV afeta milhares de pessoas em todo o mundo, principalmente em países com clima temperado, em regiões tropicais e subtropicais, tais como o Brasil. O sequenciamento do genoma viral, ou de partes dele, permite uma melhor compreensão dos processos evolutivos e migratórios do DENV, permitindo uma melhor compreensão da epidemiologia da doença. A identificação genotípica se mostra uma importante abordagem para determinar a origem e a dispersão de epidemias e para tentar estabelecer correlação de virulência entre as variantes dos DENVs. Com isso, visamos realizar a análise molecular e filogenética de um isolado viral de DENV-1, possivelmente circulante no Sul do estado de Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA DO *Dengue virus*

O DENV é um vírus envelopado, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, esférico, com diâmetro entre 40-50 nanômetros. É classificado como um vírus RNA fita simples positivo, com cerca de 11 kilobases de comprimento, cujo RNA possui na extremidade 5' um cap, e na extremidade 3' não há cauda poli A (FIGURA 1). O genoma viral codifica uma única janela aberta de leitura (ORF), que codifica três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais são o capsídeo (C), responsável pela forma esférica da partícula viral, possui 11 KDa, encapsula o RNA genômico, formando o nucleocapsídeo, que também é cercado por uma bicamada lipídica. A proteína precursora de membrana (prM) de 8 KDa, é glicosilada, sendo clivada durante a replicação viral gerando a glicoproteína de membrana (M), que juntamente com a proteína do envelope (E), de 56 KDa, formam o revestimento externo da partícula viral (FIGURA 2) (GUZMAN et al., 2010).

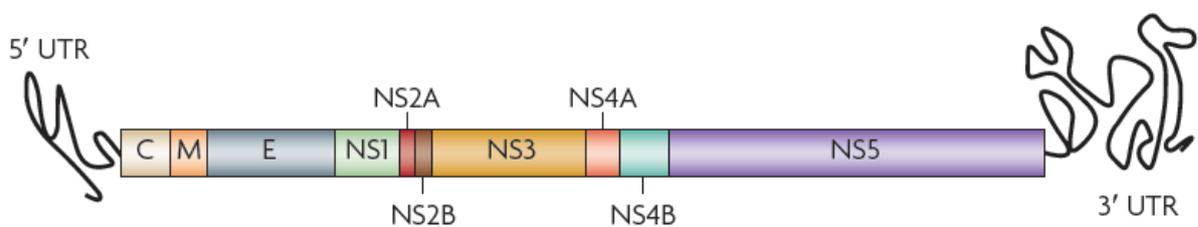


Figura 1 - O genoma do DENV

A única janela aberta de leitura codifica as três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). O genoma possui ainda nas regiões 3' e 5', regiões não traduzidas (UTR)

Fonte: Guzman et al. (2010).

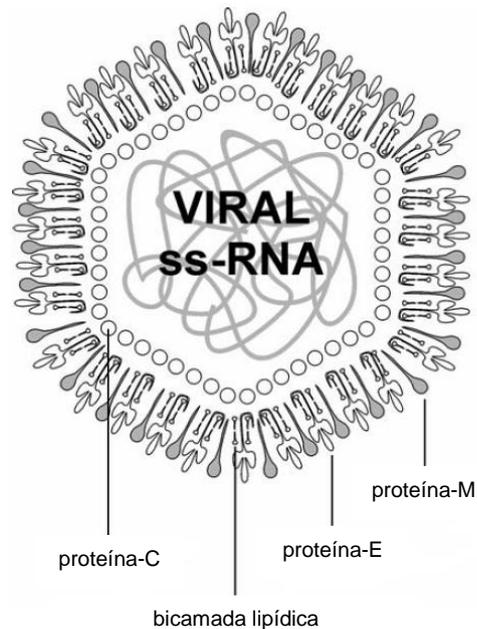


Figura 2 - Modelo de uma partícula viral do *Dengue virus* (*virion*)
 Fonte: Barth (2000).

A superfície do DENV é composta de 180 cópias da glicoproteína do envelope (proteína E) e da proteína de membrana (proteína M). A proteína E contém uma sequência peptídica de fusão classe II que é importante para a invasão viral em uma célula hospedeira. Há grandes diferenças estruturais entre os envelopes do DENV imaturos e maduros (KUHN et al., 2002; ZHANG et al., 2003). A partícula do DENV imaturo é coberta com 60 trómeros assimétricos de heterodímeros prM-E que se projetam como pontas na superfície do DENV (FIGURA 3).

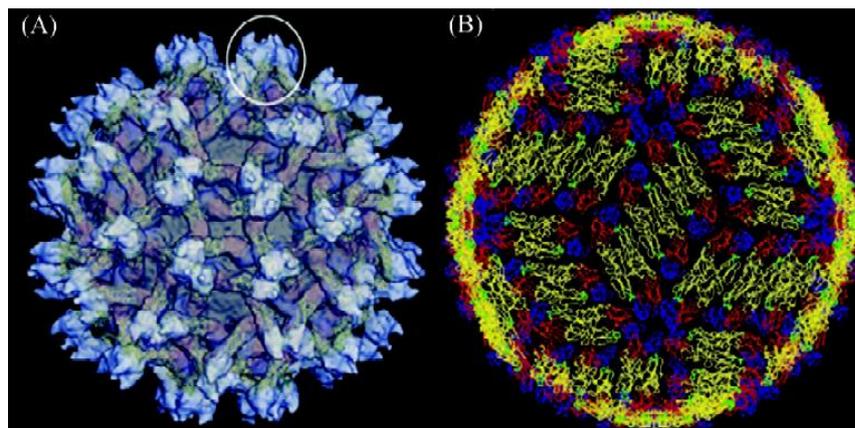


FIGURA 3 - Vírus da dengue imaturo e maduro. (A) Partícula viral imatura. Possui 60 proteínas “spikes” (círculo branco) que se projetam, a partir de sua superfície, tornando-se muito menos suave do que a forma madura. (B) Estrutura viral madura. A superfície do vírus é mais suave e sua membrana é totalmente fechada por um envoltório de proteínas. Uma série é composta por três dímeros paralelos de proteína do envelope, os diferentes domínios que são representados por cores diferentes (domínios I, II e III, são de cor vermelha, verde e azul, respectivamente) e o peptídeo de fusão é mostrado em verde.

Fonte: Qi, Zhang e Chi (2008).

Em condições ácidas, as partículas prM não são capazes de realizar a fusão com as células do hospedeiro. Para que isso ocorra é necessário que heterodímeros prM-E sejam dispostos de modo que formem picos de trímeros assimétricos, onde os pré-peptídeos cubram e ocultem a fusão dos peptídeos na glicoproteína E (ZHANG et al., 2003). Durante a maturação, a parte N-terminal da proteína prM é clivada pela furina (uma protease da célula hospedeira), induzindo um rearranjo da proteína E que por sua vez é essencial para o processo de fusão. No vírus maduro, a proteína E existe como um homodímero que se encontra na membrana viral sob a forma de 30 *rafts*. Cada *raft* contém três dímeros paralelos dispostos em simetria icosaédrica e organizados em um padrão de espinha de peixe (KUHN et al., 2002).

2.2 CICLO DE REPLICAÇÃO

O ciclo de replicação do DENV inicia-se quando o vetor alimenta-se de sangue e o vírus é introduzido no hospedeiro. O vírus liga-se e entra numa célula hospedeira permissiva (células dendríticas imaturas, células parenquimais hepáticas, macrófagos dos gânglios linfáticos, fígado e baço, células neuronais, células endoteliais e monócitos do sangue periférico) mediada pelo receptor de endocitose.

O DENV reconhece moléculas presentes na superfície dessas células, tais como, o receptor CD209 (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* - DC-SIGN), sulfato de heparina e o receptor para a porção constante dos anticorpos (Fc) de imunoglobulinas. Nesse processo tem papel de destaque a proteína E, que tem função de promover a ligação do DENV ao receptor celular, o que permite a penetração e endocitose na célula hospedeira. Após a internalização e acidificação do endossomo ocorre fusão das membranas virais e vesiculares, o que permite a entrada do nucleocapsídeo (NC) no citoplasma e o desnudamento do genoma, com concomitante liberação do RNA viral (FIGURA 4) (KNIPE et al., 2001; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

O NC é, então, liberado para o citoplasma, conduzindo à dissociação da proteína C e do RNA viral. Uma vez que o genoma é liberado no citoplasma, ocorre a tradução do mesmo em uma única poliproteína que será processada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação viral inicia-se com a síntese da fita negativa, que serve como molde para a produção de uma fita dupla, a partir da qual são

sintetizadas várias cópias de fitas positivas de RNA. No ciclo de replicação viral, do DENV, o RNA viral age como um RNA mensageiro e utiliza fatores da célula do hospedeiro para traduzir a poliproteína viral. A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares, sendo que a montagem e formação de partículas virais imaturas ocorrem na superfície do Retículo Endoplasmático (RE), quando as proteínas estruturais e o RNA, recém-sintetizado, ocupa o lúmen do RE. Sucessivos ciclos de tradução produzem múltiplas cópias das proteínas virais, as quais juntamente com RNA viral, participam da formação, maturação e secreção da partícula viral, as quais são transportadas através do compartimento de Golgi (ALLISON et al., 1995; BRINTON, 2002; LINDENBACH; RICE, 2003; KNIPE et al., 2001).

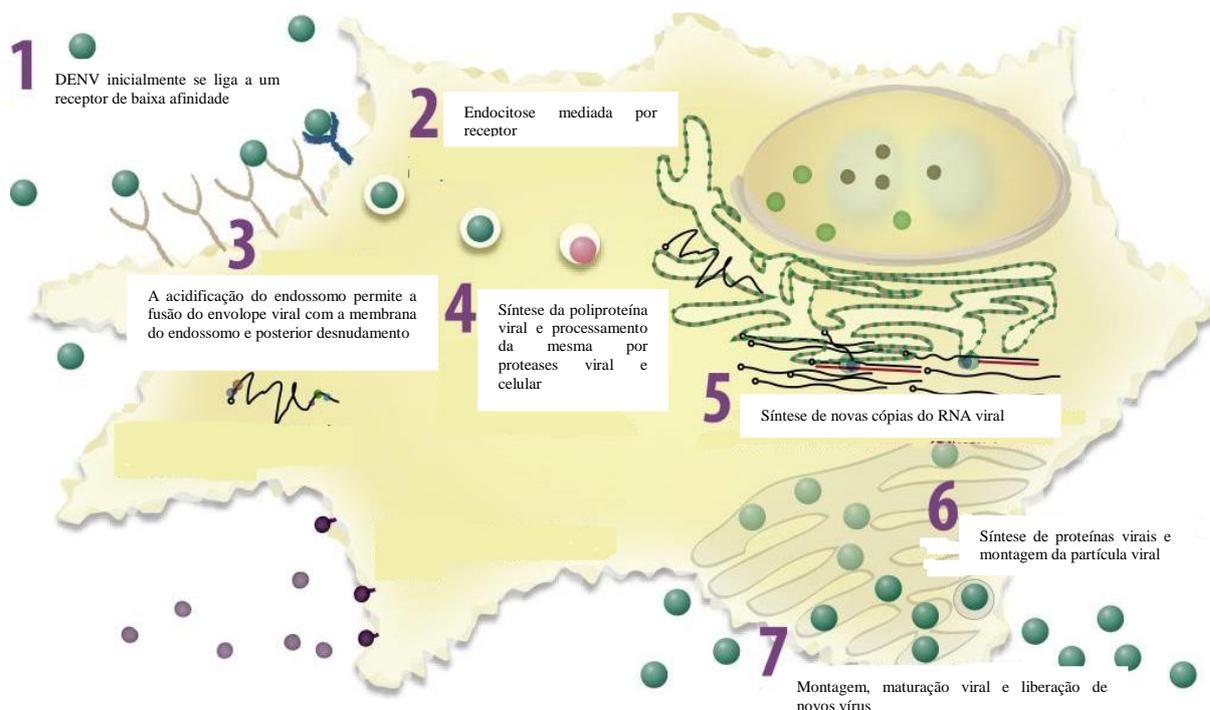


Figura 4 - Ciclo de replicação do DENV

O DENV se liga aos receptores (1) e entra na célula (2) por meio de endocitose mediada por receptor. A acidificação endossomal (3) resulta em uma trimerização irreversível da proteína viral E, expondo o domínio de fusão. Após ter sido liberado, o RNA viral é traduzido (4) e processado em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. Após o complexo de replicação viral ser sintetizado, a tradução do RNA viral termina e a síntese de RNA (5) se inicia. Posteriormente, sucessivos ciclos de tradução (6) são seguidos pela montagem da partícula viral no Retículo Endoplasmático. O *virion* é maturado no compartimento de Golgi (7) e sai através da via secretora do hospedeiro

Fonte: Adaptado de Clyde, Kyle e Harris (2006, p. 11419).

As partículas subvirais e virais imaturas, não são infecciosas, sendo necessário seu transporte através da rede trans-Golgi, onde, então, são clivadas pela protease celular, denominada furina, resultando em partículas maduras (infecciosas) e

subvirais. Os *virions* maduros e as partículas subvirais são liberados, a partir da célula hospedeira, por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

A proteína C é a primeira proteína estrutural a ser sintetizada durante o processo de tradução viral. A pré-M é encontrada em *virions* imaturos intracelulares. Já a proteína M, é encontrada apenas após a liberação da partícula viral (exocitose), quando o *virion* se encontra maturo. A clivagem da pré-M em M favorece a reorganização da superfície do vírus para exposição do domínio de ligação do receptor E, o que contribui para a infectividade viral (HENCHAL; PUTNAK, 1990; YU et al., 2008). A proteína E possui várias funções no ciclo de replicação viral, tais como, ligação ao receptor da célula hospedeira, fusão específica de membrana e montagem viral (GUZMAN; KOURÍ, 2004).

2.3 PATOLOGIA

De acordo com Martina, Koraka e Osterhaus (2009) os mecanismos para as manifestações graves de infecções pelo DENV ainda não são totalmente compreendidos, mas se trata de uma doença multifatorial onde há uma complexa interação entre fatores virais e do hospedeiro.

A doença é transmitida quando mosquitos vetores, principalmente fêmeas *Aedes Aegypti* infectadas, alimentam-se do sangue humano, durante o período de viremia. O vírus passa do trato intestinal para as glândulas salivares do mosquito, após um período de incubação extrínseco, um processo que leva cerca de 10 dias (WATTS et al., 1987).

Na pele, o DENV pode infectar várias células do sistema imune, principalmente células dendríticas residentes no tecido, macrófagos e mastócitos (WU et al., 2000). As células dendríticas infectadas amadurecem e migram para os gânglios linfáticos regionais ou locais, onde apresentam antígenos virais às células T, iniciando a resposta imune celular e humoral. Há também evidência de replicação abundante do DENV em células parenquimais hepáticas e em macrófagos nos gânglios linfáticos, fígado e baço, bem como nos monócitos do sangue periférico (JESSIE et al., 2004).

Alguns fatores de risco podem estar diretamente relacionados com a fisiopatologia da dengue, levando a um maior risco de se desenvolver a FHD/SCD, sendo que o principal fator, apontado pelos pesquisadores, seria a ocorrência de uma infecção secundária, em um mesmo indivíduo, por um sorotipo diferente

(BURKE et al., 1988; ENDY et al., 2002). Nesse caso, os anticorpos induzidos pela infecção anterior, ao invés de proteger contra a segunda infecção, por um sorotipo diferente, contribuem para a entrada do vírus nas células, através dos receptores para as porções Fc das imunoglobulinas, promovendo a replicação viral. Este mecanismo inicialmente proposto por Halstead e O'Rourke em 1977 foi denominado de Anticorpos Potencializadores da Infecção (*Antibody-Dependent Enhancement*). Dessa forma, os anticorpos heterólogos pré-existentes, produzidos em uma infecção primária, são capazes de reconhecer os epítomos do DENV, formando complexos antígeno/anticorpo, os quais são reconhecidos e internalizados pelas células mononucleares, através dos receptores da porção constante dos anticorpos, sem, no entanto, neutralizar o vírus.

Ainda, existem evidências que anticorpos soro-específico (homólogos), sejam produzidos em níveis subneutralizantes, podendo interagir com o DENV, sem que haja neutralização (HALSTEAD, 2003; MATHEW; ROTHMAN, 2008; KLIKS et al., 1988). Como os anticorpos heterólogos, ou mesmo os anticorpos homólogos em níveis subneutralizantes, não são capazes de neutralizar a infecção, há uma intensa replicação viral no interior das células fagocitárias, aumentando o número de células infectadas, e conseqüentemente aumentando a carga viral no hospedeiro (GONCALVEZ et al., 2007; LI et al., 2013).

Outra teoria relacionada à imunopatogênese da Dengue é baseada na atividade cruzada de células T. O modelo proposto como teoria do pecado antigênico original (*original antigenic sin*), refere-se à produção de células T de memória que desempenham reação cruzada aos diferentes sorotipos do DENV. A reatividade cruzada destas células é caracterizada pela falha de estabelecer uma resposta eficaz contra o sorotipo infectante (homólogo) e pela intensa proliferação de células T que combatem o sorotipo que causou a infecção anterior (heterólogo). Portanto, essas células T possuem baixa afinidade para o sorotipo do vírus causador da atual infecção, produção alterada de citocinas, dificuldade na eliminação do vírus, aumentando desta forma, a viremia e os eventos hemorrágicos (KURANE et al., 2011; MONGKOLSAPAYA et al., 2003, 2006). Isso se deve ao fato de que os linfócitos T CD8⁺ gerados, ligam-se fracamente ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que apresentam epítomos do vírus causador da infecção. Também ocorre a apresentação de um fenótipo apoptótico que dirige às células T CD8⁺ a morte celular programada, antes de exercerem sua função antiviral

e controlarem a infecção (MALAVIGE et al., 2012; NIELSEN, 2009; CHATURVEDI; NAGAR; SHRIVASTAVA, 2006).

Portanto, uma das consequências da infecção secundária por DENV e ativação de células T é a produção de várias citocinas que estão implicadas na fisiopatologia da dengue, tais como o interferon gama (INF- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina (IL) 6, IL-8 e IL-10 (STEPHENSON, 2005). O sinergismo que se dá entre a ativação de células T e a produção de citocinas e mediadores químicos acaba por aumentar a permeabilidade vascular, induzir a trombocitopenia, levando a hemorragia, o que contribui para o desenvolvimento de FHD/SCD (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Segundo Avirutnan et al. (2006), a ativação excessiva do sistema complemento na superfície do endotélio contribui para aumentar o extravasamento vascular, comum nas formas graves da dengue. Isso ocorre devido aos altos níveis da proteína NS1 no sangue e a existência de anticorpos anti-NS1, pré-existentes, que desencadeiam a ativação do complemento favorecendo o extravasamento vascular (KURANE, 2007; GUZMAN et al. 2002). O NS1 atenua a ativação da via clássica e da via das lectinas do complemento na superfície do vírus pela interação direta com C4, promovendo sua degradação em C4b. Desse modo, a NS1 protege o DENV através da neutralização dependente do complemento na solução (AVIRUTNAN et al., 2010). Também, na fase de defervescência aparecem altos níveis de C3a e C5a ativados no plasma, seguido de redução acentuada dos componentes do complemento na SCD. Essas citocinas quando secretadas em grande quantidade podem produzir resposta inflamatória local, e a nível sistêmico, podem levar ao colapso circulatório (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; NIELSEN, 2009; KURANE, 2007).

2.4 DENV NO BRASIL E NO MUNDO

A incidência de dengue tem crescido de forma acentuada em todo o mundo nas últimas décadas. Mais de 3,6 bilhões de pessoas (40% da população mundial) vivem em áreas de risco de transmissão de dengue (WILDER-SMITH et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que pode haver de 50 a 100 milhões de infecções por dengue em todo o mundo, a cada ano. Antes da década de 1970, apenas nove países relataram epidemias de dengue grave. No entanto, a doença é

agora endêmica em mais de 100 países na África, nas Américas, no Mediterrâneo Oriental, no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental. As Américas, o Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental são os mais gravemente afetados, ultrapassando 1,2 milhões de casos em 2008 e mais de 2,3 milhões em 2010. Em 2010, 1,6 milhões de casos de dengue foram notificados apenas nas Américas, dos quais 49.000 casos foram de dengue grave (WHO, 2012).

Estima-se também, que em 2010, houve 96 milhões de infecções aparentes por dengue em todo mundo, das quais a Ásia contribuiu com 70% (cerca de 67 milhões de infecções) (FIGURA 5). A Índia contribuiu com 34% (cerca de 33 milhões de infecções) (CHAKRAVARTI; ARORA; LUXEMBURGER, 2012; KAKKAR, 2012). As Américas contribuíram com 14% (cerca de 13 milhões de infecções), das quais mais da metade ocorreram no Brasil e México. Estima-se também que houve 294 milhões de infecções assintomáticos em todo o mundo em 2010 (BHATT et al., 2013).

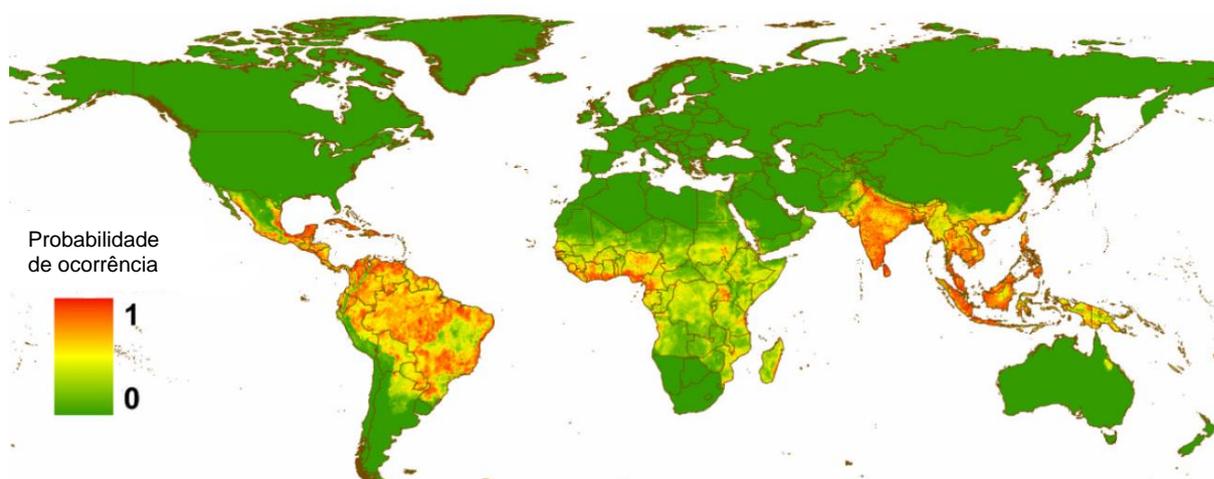


Figura 5 - Áreas de alto e baixo risco de ocorrência de dengue
Vermelho: alta probabilidade. Verde: baixa probabilidade
Fonte: Bhatt et al. (2013).

A cada ano cerca de 500.000 pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização e aproximadamente 2,5% das pessoas afetadas morrem. O aumento da doença em todo o mundo é atribuído a vários fatores, mas é em grande parte, resultado de um aumento da população mundial, aumento da urbanização (propiciando criadouros para reprodução do vetor), e diminuição do apoio aos programas de controle de vetores, fatores convergentes em áreas tropicais e subtropicais (GUBLER, 2004; WHO, 2012).

De 2001 a 2007, mais de 30 países das Américas notificaram mais de 4,3 milhões de casos de dengue. Os casos de FHD, no mesmo período, foram de

106.037. O número total de mortes por dengue de 2001 a 2007 foi de 1.299, com uma letalidade de 1,2% pela FHD (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE - PAHO, 2008).

Os países do Cone Sul, que são a Argentina, o Brasil, o Chile, o Paraguai e o Uruguai, no período de 2001 a 2007, foram responsáveis por 64,6% (2.798.601) de todos os casos de dengue nas Américas, dos quais 6.733 foram por FHD, com um total de 500 mortes. No Brasil, foram notificados 98,5% casos, que também relata a maior taxa de letalidade na sub-região (WHO, 2009).

A primeira evidência de ocorrência de epidemia de dengue no Brasil se deu em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (OSANAI, 1984). Após o período de interrupção da transmissão da dengue, o sorotipo DENV-1 foi reintroduzido em 1986, na cidade de Nova Iguaçu, disseminando-se para as cidades vizinhas, incluindo Niterói e Rio de Janeiro. Neste mesmo ano já atingia o Ceará e Alagoas, e em 1987, Pernambuco. Nesse período surtos localizados em pequenas cidades de São Paulo, Bahia e Minas Gerais foram relatados (TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

Entre 1986 e 1987 circulava exclusivamente o DENV-1, com apenas casos de FD, onde se observou baixa endemicidade da doença. Com a introdução do DENV-2, circulando simultaneamente com o DENV-1, houve um ressurgimento da doença, de grandes proporções em 1990. O surgimento do DENV-2 trouxe consigo os primeiros diagnósticos de FHD no país, quando foram confirmados 462 casos e oito óbitos. Nos anos subsequentes, a circulação viral (DENV-1 e DENV-2) se expandiu rapidamente para outras áreas do território brasileiro, acompanhando a expansão do vetor, o *Aedes aegypti*, e a co-circulação dos dois sorotipos (TEIXEIRA et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2005).

O sorotipo DENV-3 foi introduzido no Brasil em janeiro de 2001, e foi responsável pela epidemia de 2002, quando foram notificados aproximadamente 800 mil casos de dengue (80% das ocorrências de dengue do continente americano) (NOGUEIRA et al., 2005). O DENV-4 foi reintroduzido no Brasil em julho de 2010, em Boa Vista. Posteriormente, este sorotipo foi detectado nos estados do Amazonas e Pará, se espalhando para Bahia, Pernambuco e Piauí. Em 2011, ocorreram os primeiros episódios da doença na região Sudeste, no estado do Rio de Janeiro. Atualmente, o sorotipo 4 se encontra circulando em pelo menos 11 dos 27 estados

do Brasil, sendo eles: Amazonas, Roraima, Pará, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (BRASIL, 2011).

Com relação aos casos de dengue no Brasil, pode-se destacar que na década de 2000, registrou-se 13.493 casos confirmados de FHD e 40.504 de Dengue com Complicação (DCC). Deste total, houve 1.622 óbitos, sendo 898 (55,4%) por FHD e 724 por DCC. A letalidade por FHD, nesse período, foi de 6,7%, atingindo mais de 10% em 2006 e 2007, enquanto a letalidade por DCC foi de 1,8% (BRASIL, 2010).

Em Minas Gerais, no ano de 2013, foram confirmados cerca de 350.000 casos de dengue. Destes casos, 89 foram classificados como FHD e 301 como DCC. Os casos de morte por dengue no estado foram de 111 (MINAS GERAIS, 2013).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

Os quatro sorotipos do DENV têm a capacidade de poder produzir tanto a forma leve, quanto à forma grave da Dengue. O espectro da doença pode variar, desde uma síndrome febril leve, não específica, no caso da FD, as formas graves da doença a FHD/SCD. As formas graves geralmente se manifestam após uma fase febril, dois a sete dias após o surgimento da febre (WHO, 1999; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2009; ROSS, 2010). A FD se caracteriza por possuir um curso autolimitado, apesar de desconfortável, mostra-se relativamente benigno. Já a FHD pode aparecer como uma infecção de início relativamente benigno, porém pode se desenvolver rapidamente em uma doença com risco de morte, principalmente na etapa de defervescência (CDC, 2009).

A figura 6 mostra como a infecção pela dengue é clinicamente dividida. A doença assintomática ocorre em metade dos indivíduos, não apresentando sinais ou sintomas clínicos da doença. Na febre indiferenciada, há febre, com sintomas leves, não específicos, semelhantes a outras doenças febris agudas. Na FD, com ou sem hemorragia, os sintomas iniciais são febre alta de 2 a 7 dias e dois ou mais dos seguintes sintomas: forte dor de cabeça, dor ocular retro-orbital, mialgias, artralgias, eritema maculo-papular difuso e manifestações hemorrágicas leves. Pode haver epistaxe, gengivorragia, hemorragia gastrointestinal, hemorragia urogenital, mas são raras. Ocorre leucopenia, acompanhada por trombocitopenia de vários graus (WHO, 1997; WHO, 1999; CDC, 2009).

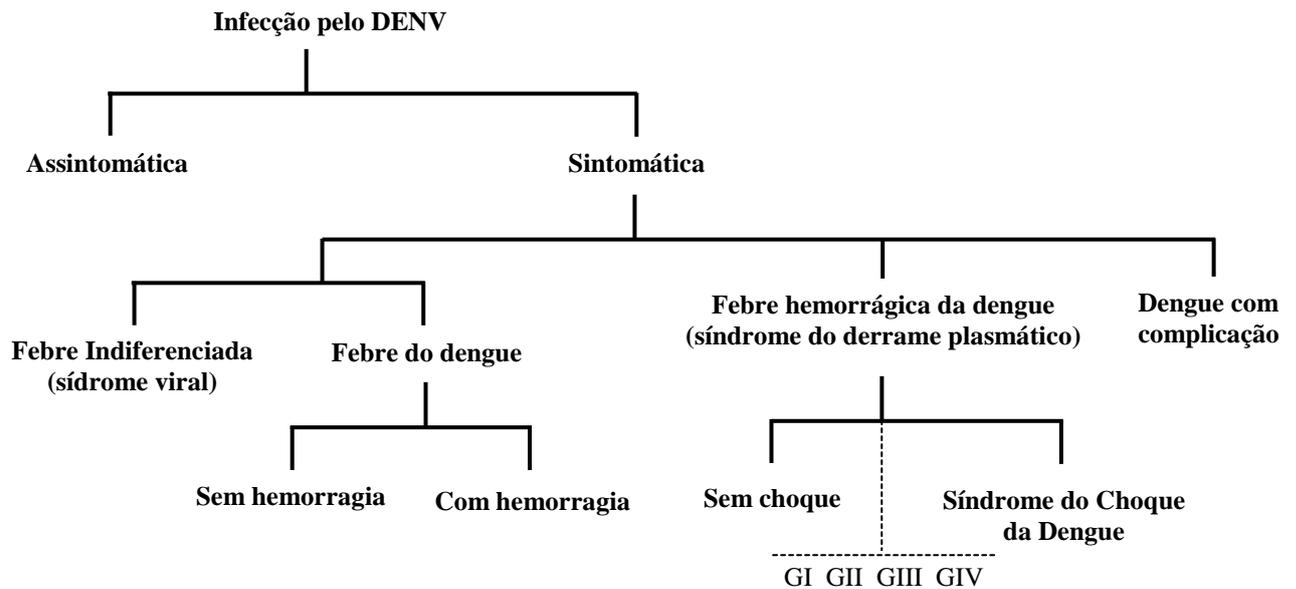


Figura 6 - Esquema com as diferentes manifestações clínicas da infecção pelo DENV
G I, II, III e IV: graus de I a IV

Fonte: Adaptado de WHO (1997; 2009).

No caso da doença grave, após o período de incubação, se inicia abruptamente as seguintes fases. 1) Fase febril: febre alta repentina, de 2 a 7 dias, acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, dor corporal generalizada, mialgia, artralgia e dor de cabeça, anorexia, náuseas e vômitos são comuns, além de epistaxe e gengivorragia. 2) Fase crítica: período de defervescência, há aumento da permeabilidade capilar e do hematócrito, além de leucopenia e decréscimo na contagem de plaquetas. 3) Fase de recuperação: observa-se melhora do bem-estar geral e apetite, diminuição dos sintomas gastrointestinais, estabilidade do estado hemodinâmico e retorno da diurese a níveis normais. Bradicardia e alterações eletrocardiográficas são comuns nessa fase. O hematócrito se estabiliza, a contagem de células brancas começa a subir (WHO, 2009).

Durante a fase de defervescência, pode surgir tendência hemorrágica, caracterizando a FHD, que é evidenciada por: prova do laço positiva, petéquias, equimose, púrpura, epistaxe, gengivorragia, hematêmese, melena, trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$) e extravazamento plasmático por aumento da permeabilidade capilar, caracterizado por hemoconcentração (hematócrito 20% \geq ao valor basal) ou ainda presença de derrame cavitário ou hipoalbuminemia.

A FHD é classificada de acordo com sua gravidade, em: Grau I - febre com dois ou mais dos seguintes sinais: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia e

artralgia, prova do laço positiva, contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ e um aumento de hematócrito, maior ou igual a 20%; Grau II - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau I, mais sangramentos espontâneos; Grau III - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau II, mais falhas circulatórias (pulso fraco, hipotensão e agitação); Grau IV - os mesmos sinais e achados laboratoriais, mais choque profundo com pulso e pressão indetectáveis. A FHD de grau III e IV é classificada como SCD (WHO, 1999).

De acordo com Brasil (2009), a DCC é caracterizada como evolução para forma grave, porém não se tem todos os critérios que possam classificá-la como FHD. Nesse caso o paciente que apresente uma ou mais das seguintes alterações: alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; hemorragia digestiva importante; derrame pleural, pericárdico e ascite; plaquetopenia inferior a $20.000/\text{mm}^3$; leucometria igual ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$.

Em uma nova revisão da classificação da dengue, realizada pela OMS (WHO, 2009; 2012) foi inserida a dengue grave, associada com “manifestações incomuns”, que não se enquadram como FHD/SCD, possuindo uma ou mais das seguintes características: (i) perda plasmática que pode levar ao choque (choque da dengue) e/ou acumulação de fluido, com ou sem qualquer dificuldade respiratória, e/ou (ii) o sangramento grave, e/ou (iii) grave disfunção de órgãos.

O diagnóstico de dengue começa com a suspeita clínica, evidenciada pelo reconhecimento dos sinais e sintomas. Porém, o diagnóstico clínico não possui especificidade, necessitando-se de confirmação laboratorial. Os métodos de diagnóstico laboratoriais para confirmar a infecção pelo DENV podem envolver a detecção do vírus, do ácido nucleico viral, antígenos ou anticorpos, ou uma combinação dessas técnicas. Nas fases iniciais da doença, o isolamento do vírus, do ácido nucleico ou a detecção do antígeno podem ser utilizados para diagnosticar a infecção. No final da fase aguda da infecção, a sorologia é o método de escolha para o diagnóstico. Antes do quinto dia da doença, durante o período febril, as infecções pelo DENV, podem ser diagnosticadas através do isolamento do vírus, em cultura de células, através da detecção do RNA viral, por meio de ensaios de amplificação de ácidos nucleicos, ou através da detecção de antígenos virais por ELISA. No entanto, esses testes requerem equipamentos caros e reagentes para os ensaios (WHO, 2009).

A detecção de anticorpos contra o dengue (IgM e IgG), é o teste mais amplamente utilizado no diagnóstico da dengue (DE PAULA; FONSECA, 2004). Os kits fazem captura ou detecção direta da imunoglobulina e são configurados para detectar IgM e/ou IgG anti-dengue (BLACKSELL et al., 2011). Outro método que pode ser utilizado é a detecção de anticorpos neutralizantes contra o DENV, os quais podem ser detectados pelos Ensaio de Neutralização (RUSSELL; NISALAK, 1967; SHU et al., 2002).

2.6 SOROTIPOS, GENÓTIPOS E VIRULÊNCIA DO *Dengue virus*

Baseado em testes de neutralização, foram classificados, até o momento quatro sorotipos imunologicamente distintos do DENV, sendo que eles compartilham cerca de 65% do genoma (HALSTEAD, 2008; HENCHAL; PUTNAK, 1990). As primeiras observações relativas às diferenças na virulência dos isolados do DENV vieram de associações clínicas e epidemiológicas, onde a doença mais grave foi associada a surtos específicos (GUBLER et al., 1978; ROSEN, 1986). Também foi observado um aumento na gravidade da doença em pacientes que foram infectados por mais de um sorotipo do DENV, o que se denominou fenômeno da resposta imune melhorada (HALSTEAD, 1988).

A fim de se conseguir efetuar uma vigilância rigorosa da doença, e entender a evolução do DENV, e os efeitos na transmissão viral, um método com uma melhor acurácia é necessária para identificação genotípica desse vírus. A análise filogenética de sequências genéticas virais é o método mais comumente utilizado, onde se emprega como principal alvo o gene do envelope (KLUNGTHONG et al., 2008). Estudos filogenéticos recentes, a partir do gene do envelope, têm sido capaz de agrupar, a partir de um corte arbitrário de 6%, diferentes genótipos e linhagens dentro dos sorotipos do DENV (RICO-HESSE, 1990).

Baseado na sequência completa do gene E do DENV-1 identificou-se quatro genótipos desse vírus: a) genótipo I, composto por isolados do Sudeste Asiático, China e África Oriental; b) genótipo II, com isolados de Taiwan e da Tailândia; c) genótipo III, isolados silvestres da Malásia; d) genótipo IV, representado por isolados das Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália; e) genótipo V, proveniente de todos os isolados das Américas, isolados da África Ocidental e Ásia (WEAVER; VASILAKIS, 2009; RICO-HESSE, 1990).

O DENV- 2 é composto por cinco genótipos principais: a) genótipo Asiático, que por sua vez foi dividido em dois ramos, a.1) o genótipo Asiático I, com isolados da Malásia e Tailândia, e o a.2) genótipo Asiático II, compreendendo isolados do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; b) Genótipo Cosmopolita, isolados da Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do oceano Pacífico e Índico, e Subcontinente Indiano e Oriente Médio; c) Genótipo Americano, isolados da América Latina, e isolados antigos do Caribe, Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico; d) Genótipos do Sudeste Asiático e Americano, isolados da Tailândia e do Vietnã e isolados colhidos das Américas nos últimos 20 anos; e) Genótipo Silvestre, representado por isolados da África Ocidental e do Sudeste Asiático (LEWIS et al., 1993; RICO-HESSE et al., 1997; TWIDDY; WOELK; HOLMES, 2002; VASILAKIS; TESH; WEAVER, 2008; WANG et al., 2000).

No DENV-3 quatro genótipos foram distinguidos: a) genótipo I, com isolados da Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Pacífico Sul; b) genótipo II, representado por isolados da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; c) genótipo III, com isolados de Sri Lanka, Índia, África e Samoa; d) genótipo IV, representado por isolados de Porto Rico, América Latina e isolados de 1965 do Taiti. Além desses genótipos, há ainda o silvestre, porém, não há dados de isolamento silvestre do DENV-3, mas acredita-se que sejam provenientes da Malásia (WEAVER; VASILAKIS, 2009; RUDNICK, 1984).

O DENV- 4 apresenta quatro genótipos principais: a) genótipo I, com isolados da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão; b) genótipo II, representado por isolados da Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas; c) genótipo III, isolados provenientes da Tailândia (distintas de outros isolados tailandeses); d) genótipo IV, com isolados silvestres da Malásia (KLUNGTHONG et al., 2004; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

Os estudos filogenéticos, de várias amostras de diferentes DENV, levaram à associação desses genótipos específicos (dentro dos sorotipos) e a apresentação da doença mais ou menos grave. Atualmente, os DENVs podem ser classificados como sendo epidemiologicamente de baixo, médio ou alto impacto, ou seja, alguns vírus podem permanecer em ciclos silvestres, de pouca ou baixa transmissibilidade aos humanos; outros mais associados à FD; e alguns genótipos são associados com o potencial de causar a FHD/SCD, além da FD. Embora, os fatores que contribuam para a epidemiologia do DENV sejam complexos, há estudos que sugerem que as

estruturas virais específicas podem contribuir para o aumento da replicação em células alvo humanas e aumentam a transmissão pelo vetor (RICO-HESSE, 2003).

A característica biológica mais óbvia dos genótipos do DENV é sua distribuição geográfica diferente (FIGURA 7). Onde, alguns genótipos se mostram mais cosmopolitas do que outros, por infectar pessoas em vários continentes (África, Ásia, Oceania e América Latina), enquanto que, outros genótipos são mais geograficamente restritos. Por exemplo, DENV-1 genótipo III, dispersou-se para a África, as Américas, Índia e Sudeste Asiático, enquanto que o genótipo I é restrito ao Sudeste Asiático. Não se sabe se essa variação, na distribuição geográfica, é resultado da possibilidade de exportação de linhagens específicas ou reflete diferenças intrínsecas na capacidade (de tal forma que alguns genótipos têm mais potencial epidêmico que outros) (HOLMES, 2009).

A introdução de novos isolados ou novos sorotipos em uma região, além da própria virulência do vírus, entre outros fatores, contribuem para a severidade da doença (RICO-HESSE et al., 1997). Há também algumas evidências de que os genótipos do DENV diferem em capacidade e virulência, e que isso pode ter uma grande influência sobre a estrutura das populações virais. Isto é mais evidente nos casos de substituição da linhagem ou subtipo, em que há uma mudança relativamente abrupta na composição genética dos vírus que infectam uma população específica, gerando o deslocamento de uma linhagem viral por outra (BENNETT et al., 2003; KLUNGTHONG et al., 2004; SITTISOMBUT et al., 1997; THU, et al., 2004; WITTKE et al., 2002).

Os genótipos mais virulentos possuem uma capacidade maior para infectar os vetores, infectando uma proporção maior de mosquitos, do que os genótipos menos virulentos. Desse modo, os isolados virulentos podem replicar-se e serem transmitidos mais precocemente para os hospedeiros humanos, competindo com os vírus menos virulentos e causando muito mais casos da doença, através do deslocamento ecológico daqueles que causam a dengue menos grave. Esta eficiência de transmissão pelo vetor poderia explicar como certos genótipos têm deslocado os outros, mudando a evolução da doença, onde o mais virulento prevalece (RICO-HESSE, 2010).

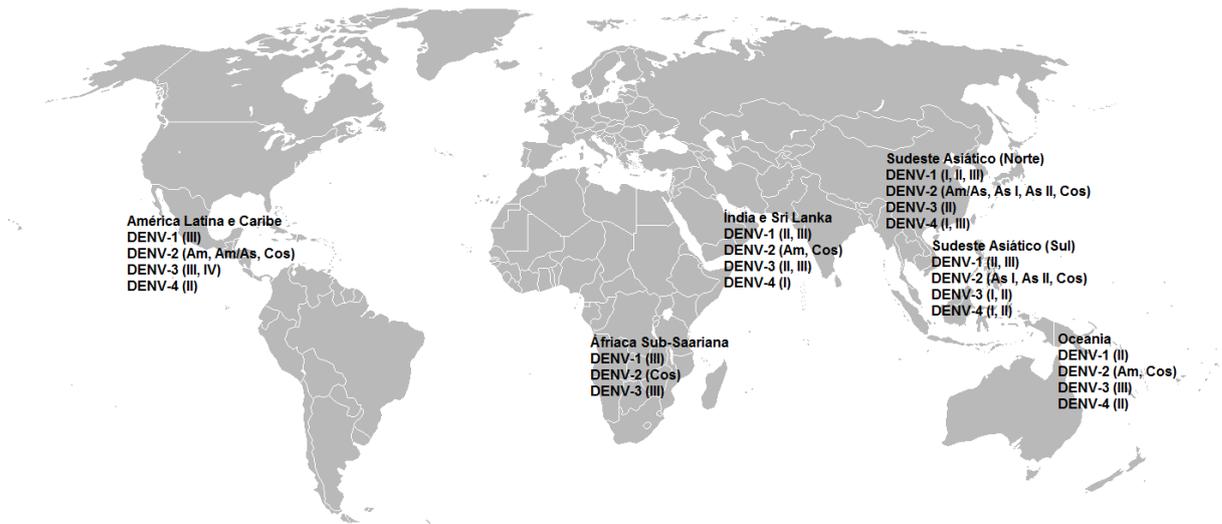


Figura 7 - Distribuição mundial do DENV
 Sorotipos DENV 1 a 4
 Genótipos do DENV de I a IV
 AM - americanos
 Am/As - Americano/Asiático
 As I - Asiático I
 As II - Asiático II
 Cos - Cosmopolita
 Fonte: adaptado de Holmes (2009).

3 OBJETIVO GERAL

Realizar análise filogenética e molecular de *Dengue Virus* tipo 1, isolado em Alfenas-MG.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a sequência nucleotídica da proteína do envelope e da região NS5 dos isolados obtidos;
- Realizar análise filogenética entre os isolados, com outros isolados oriundos de várias regiões do mundo;
- Avaliar o potencial de virulência do isolado, em modelo murino de infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

O estudo possui implicações éticas envolvendo seres humanos, pois envolve a coleta, armazenamento e uso de material biológico humano. O projeto foi desenvolvido seguindo as normas e leis que regem o uso de material animal e humano, segundo critérios da resolução 196/96 MS/CNS/CONEP e suas normas e resoluções complementares. Foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL - MG) e aprovado recebendo o número 08410912.9.0000.5142 (ANEXO 1).

A pesquisa oferece mínimos riscos à saúde, envolvendo apenas a coleta de amostra de sangue humano. Convidou-se para participação voluntária, mediante esclarecimento prévio, acerca de seu envolvimento na pesquisa, do atendimento igualitário, bem como o resguardo da identidade. Os objetivos e benefícios da pesquisa foram apresentados e as dúvidas esclarecidas. Foi solicitada autorização através de termo de consentimento livre e esclarecido, o qual foi assinado pelo adulto (ANEXO 2).

Foi coletada amostra de soro de um paciente do município de Alfenas, Sul de Minas Gerais. O mesmo possui 27 anos, é do sexo masculino, branco, residente no centro da cidade de Alfenas-MG, sem histórico anterior de dengue. Como histórico, foi levantado que o mesmo não havia viajado para fora do município, nos últimos 30 dias, podendo assim, ser afirmado, que este adquiriu a infecção por dengue no município de Alfenas. O paciente apresentou sintomas clássicos de dengue grave, que levaram a uma internação hospitalar por um período de 3 dias.

Com o evoluir da infecção, o paciente apresentou os seguintes sinais e sintomas: febre, cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, prostração, artralgia, vômitos, exantema, irritabilidade, emagrecimento, petéquias, epistaxe, visão turva, sudorese intensa, tontura, gengivorragia, hipotensão, dor abdominal, hematúria, hemoconcentração e plaquetopenia, caracterizando-o, como tendo desenvolvido um quadro de febre hemorrágico da dengue.

A amostra de soro foi obtida juntamente ao Laboratório Central de Análises Clínicas, da Universidade Federal de Alfenas, mediante autorização do paciente. O sangue foi coletado no dia 02/05/2012, sete dias após o início dos primeiros

sintomas. O paciente também apresentou resultado de exames laboratoriais, que foram obtidos do Laboratório Central de Análises Clínicas, da Universidade Federal de Alfenas, exibindo os seguintes achados (TABELA 1). A partir do sangue coletado pelo laboratório, foi separado o soro e estocado a -20°C para posteriores análises.

Tabela 1 - Resultados das análises laboratoriais

Tipo de exame	Valor encontrado	Valor de referência
Urina tipo I	sangue: (+)	ausente
	hemácias: 6 por campo	ausente
Hemograma	Hemácias em milhões/ mm^3 : 6,29	4,5 - 5,9
	hemoglobina em g/dL: 19,1	13,5 – 17,5
	hematócrito em %: 55,5	41,0 – 53,0
	plaquetas: 68.000/ mm^3	150.000 – 400.000
Anticorpos para dengue	IgM: reagente índice (7,18)	< 0,90
	IgG: reagente índice (4.29)	< 0,90

4.2 CULTURA DE CÉLULAS C6/36 E INFECÇÃO CELULAR

As células C6/36 foram mantidas em garrafas de 25 cm^2 , previamente esterilizadas, contendo meio Leibowitz 15 (L-15, Cultilab[®], Brasil), suplementado com 100 UI/ml de penicilina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em estufa B.O.D a 28°C .

Para infecção das células C6/36, o soro do paciente foi diluído na razão 1/10, 1/50 e 1/100 em meio L-15 sem SFB, constituindo desta forma a primeira passagem. As células C6/36 infectadas permaneceram em temperatura ambiente por sete dias, até o aparecimento do efeito citopático do vírus nas células C6/36 (formação de sincícios). Após sete dias de infecção, os sobrenadantes destas células foram coletados e clarificados por centrifugação a 4°C , por 15 minutos e na rotação de 800 g. O sobrenadante foi então coletado, aliquotado e 100 μL do mesmo utilizado para uma nova infecção, em culturas de células C6/36 (segunda passagem). O restante foi congelado a -28°C . Este processo se repetiu até a quinta passagem.

4.3 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA foi realizada com 140 µL do sobrenadante das passagens, utilizando o Kit QIAamp MinElute Virus Spin Kit ou o Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Após extração do RNA o produto foi estocado a - 20°C.

4.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

4.4.1 Região codificadora da proteína NS5

A amplificação da proteína NS5 foi realizada utilizando-se o protocolo proposto por Maher-Sturgess et al. (2008) com modificações. A 10 µL do RNA viral extraído foi adicionado 5 µL do iniciador Flav200R (CCIARCCACATRWACCA) a 10 pmol/µL e incubado a 70°C por 5 minutos. Foi então adicionado 4 µL do tampão 5X da transcriptase reversa, 2 µL de dNTPs a 10mM, 1 µL da transcriptase reversa (M-MLV) a 200U/µL e 3 µL de água ultrapura, num volume final de 25 µL. A mistura foi incubada a 42°C por 1 hora e 72°C por 5 minutos.

As seguintes condições foram utilizadas para amplificação da região NS5: 5 µL do tampão 10X da Taq Polimerase; 1,25 µL de MgCl₂ a 50mM; 1 µL dNTPs 10mM; 0,25 µL da Taq Polimerase a 50U/µL; 1 µL do iniciador Flav100F (AAYTCIACICAIGARATGTAY) a 10µM; 1 µL do iniciador Flav200R a 10µM; 2 µL do cDNA e água ultrapura 38,5 µL (volume final de 50 µL). Para a amplificação da região de interesse a reação foi submetida aos seguintes parâmetros: 1 ciclo a 94 °C por 10 minutos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 46°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 44°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 1 ciclo a 94 °C por 15 segundos, 42°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguido por 1 ciclo a 94°C por 15 segundos, 40°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Em seguida foi realizada a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Uma alíquota do produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose de 1% (p/v) em tampão TBE 0,5X (Tris-Acetato 0,45M, EDTA 0,5M pH 8,0, ácido bórico 0,45M) para checar a especificidade (tamanho) e quantidade dos produtos amplificados.

4.4.2 Região codificadora da proteína E

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se 8 µL do RNA total extraído anteriormente, e o Kit “Superscript® III First Strand Synthesis System” (Invitrogen™, EUA). A primeira etapa da RT foi feita utilizando-se 1 µL do iniciador d1a16 (5'-CARCTTCCARGTYTCGTTCTT-3') a 10 pmol/µL, 1 µL de dNTPs 10mM, 3 µL de água ultrapura e 8 µL do RNA em um volume final de 13 µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e 1 minuto no gelo. Posteriormente, foram adicionados os seguintes reagentes: 4 µL do tampão 5X da transcriptase reversa, 1 µL de DTTs a 0,1M, 1 µL de RNase OUT a 40U/µL (Invitrogen™, EUA), e 1 µL da enzima transcriptase reversa 200U/µL. A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos.

Para a amplificação da região codificadora da proteína E foram realizadas Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) com as seguintes condições: 5 µL de tampão 1X da Taq Polimerase; 1,5 µL de Accutaq 1U/µL (Sigma Aldrich, EUA); 2 µL dNTPs 10mM; 1 µL de dimetilsulfoxido (DMSO); 2 µL do iniciador d1s3 (AAACGTTCCGTSGCACTGGC) a 10 pmol/µL; 2 µL do iniciador d1a17 (CCAATGGCYGCTGAYAGTCT) a 10 pmol/µL (TABELA 1); 2 µL do cDNA e água ultrapura 35,75 µL (volume final de 50 µL). A reação foi incubada a 98°C por 30 segundos (1 ciclo), 94°C por 15 segundos (3 ciclos), 50°C por 20 segundos (3 ciclos), 68°C por 1 minuto e 30 segundos (3 ciclos) e 68°C por 10 minutos.

Uma alíquota do produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) para checar a especificidade (tamanho) e quantidade dos produtos amplificados.

4.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para purificação dos fragmentos desejados, foram utilizados 42 µL do produto da PCR. A esse volume foi adicionado à mistura acetato de sódio 3M, etanol

absoluto gelado. Após a mistura a solução foi incubada por 1 hora a - 80°C. Após 1 hora a mistura foi ambientalizada em geladeira, centrifugada a 13200 rpm, e lavada com etanol gelado a 70%. Foi novamente centrifugado a 13200 rpm e seco em temperatura ambiente. O sedimento foi solubilizado em 20 µL de água Milli-Q e estocado a - 20°C.

4.6 SEQUENCIAMENTO

Inicialmente o produto purificado foi submetido a uma reação de sequenciamento utilizando-se 1 µL do produto de PCR purificado e o Kit “*BigDye Terminator Kit V.3.0* (Applied Biosystems®, EUA), conforme instruções do fabricante. Para o sequenciamento da proteína E foram utilizados 8 iniciadores diferentes (TABELA 2) e para o sequenciamento da região NS5 foram utilizados os mesmos oligos utilizados na reação de RT-PCR. Após a reação de sequenciamento, foi realizado a precipitação da reação de marcação fluorescente (*BigDye*) com etanol/EDTA, onde 20 µL do produto purificado foram utilizados na reação de sequenciamento, acrescentando-se EDTA 125mM e etanol absoluto gelado. A solução foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi centrifugada a 13000 rpm a 4°C, descartado o sobrenadante e adicionado etanol a 70% gelado, para lavagem. Foi novamente centrifugado e descartado o sobrenadante, por inversão dos tubos. A secagem se deu em temperatura ambiente por cerca de 16 a 18 horas. O produto foi estocado a 4°C até a realização do sequenciamento, onde foi solubilizado com formamida.

O sequenciamento dos produtos de PCR foi realizado através do ABI 3730 *DNA Analyser*, um sistema de análise de DNA de 48 capilares (Applied Biosystems®). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit conforme descrito anteriormente. As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o software Base Caller KB.

Tabela 2 – Iniciadores desenhados com base na sequência do DENV-1 isolado brasileiro DENV-1/BR/BID-V3490/2008, utilizados para sequenciamento completo dos fragmentos genômicos sobrepostos

Iniciadores	Sequência (5'→3')	Posição*
d1s3	AAACGTTCCGTSGCACTGGC	682 – 702
d1s4	TGTGTGTCGMCGAACGTT	1182 - 1199
d1s5	GCAATGCACACYGCGTTG	1757 - 1704
d1s6	GGYTCTATAGGAGGRGTGTTTAC	1178 - 2201
d1a17	CCAATGGCYGCTGAYAGTCT	2518 - 2537
d1a18	AAAGGTGGYTCYGYTCAAT	2011 - 2030
d1a19	GTTTGTGGACRAGCCATGATT	1523 - 1543
d1a20	CGTCTTCAAGAGTTCAATGTCC	1035 - 1056

* Posição no genoma estabelecida após comparação com a sequência do genoma completo do DENV-1 depositada no *GenBank* (*Dengue vírus 1 isolate DENV-1/BR/BID-V3490/2008, complete genome*, número de acesso GU131863.1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gun131863.1>)

pb: pares de base

Iniciadores desenhados pelo Laboratório de Pesquisas em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Famerp)

4.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA E EVOLUTIVA

As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank*, utilizando os programas BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). As sequências de nucleotídeos relativas às regiões analisadas dos genomas dos vírus encontrados foram obtidas do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e no estudo de Drumond et al. (2012), para realização das análises comparativas. Foram obtidas sequências de DENV relativas aos diferentes genótipos de cada tipo viral estudado. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados com o auxílio dos programas *Clustal W* versão 1.6, implementado no pacote MEGA5 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994; KUMAR et al., 2008). Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente, quando necessário. Os alinhamentos também foram utilizados para construção de árvores filogenéticas.

A eleição do modelo de evolução foi realizada utilizando-se o programa Modeltest, que compara os escores (*Likelihood*) entre diferentes modelos de substituição de DNA ligados hierarquicamente, fazendo busca e encontrando o modelo que melhor se enquadra para o conjunto de dados em questão (POSADA;

CRANDAL, 1998). Previamente às análises filogenéticas, o modelo de substituição de nucleotídeos foi selecionado usando o programa MEGA5 e as árvores filogenéticas foram construídas por Máxima Verossimilhança, com busca heurística, partindo de uma árvore construída pelo método de *Neighbor-Joining* (FELSENSTEIN, 1981). Testes de *bootstrap* (1000 replicatas) foram realizados de forma a checar a confiabilidade dos ramos. Perturbações foram feitas na árvore, com o objetivo de se encontrar a melhor árvore, usando o algoritmo TBR ("*tree bisection and reconnection*").

Para análise de filogeografia, diferentes genótipos de DENV-1 disponíveis no *GenBank* foram recuperados, perfazendo um total de 95 sequências, que foram alinhadas usando o programa *Clustal W*, implementado na plataforma MEGA5.05 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994; KUMAR et al., 2008). Em seguida, foi feita a análise para seleção do modelo de substituição de nucleotídeos [Tamura-Nei (TN93 + G)], utilizado para reconstrução de árvores filogenéticas por Máxima Verossimilhança, com 1000 réplicas de *bootstrap* para testar a confiabilidade dos padrões de agrupamento da árvore, usando o programa MEGA5.05 (FELSENSTEIN, 1981; KUMAR et al., 2008; TAMURA et al., 2011).

As árvores filogenéticas também foram reconstruídas, através de análise *Bayesiana*, usando o pacote BEAST versão 1.6.1 (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). Os arquivos de entrada para BEAST foram criados com a interface gráfica BEAUTI versão 1.6.1 (DRUMMOND; RAMBAUT; XIE, 2002-2010). Realizou-se também, uma análise de coalescência, onde foram estimadas as datas prováveis dos ancestrais comuns mais recentes de algumas amostras de DENV-1, usando como ponto de calibração, o ano em que cada amostra foi obtida. As corridas foram realizadas usando o modelo "*Bayesian Skyline*", com relógio molecular relaxado e taxa estimada de $7,50 \times 10^{-4}$ substituições por site, por ano, como descrito anteriormente (COSTA; VOLOCH; SCHRAGO, 2012). Duzentos milhões de cadeias foram executadas, sendo os primeiros 20 milhões de passos descartados. A convergência dos parâmetros foi verificada com o programa Tracer versão 1.5.0 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2003-2009). As árvores foram amostradas a cada 10.000, resultando em 18 mil árvores, que foram anotadas em uma árvore máxima de credibilidade clade usando TreeAnnotator versão 1.6.1 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2002-2010). A árvore final foi visualizada no programa FigTree versão 1.3.1 (RAMBAUT, 2006-2009).

A estimativa de origem de algumas amostras de DENV foi realizada através de análise filogeográfica, utilizando uma cadeia padrão de Markov (*standard continuous-time Markov chain* (CTMC)) e através de uma pesquisa estocástica (*Bayesian stochastic search variable selection* (BSSVS)), que é um procedimento onde se identifica os processos de difusão mais parcimoniosos (LEMEY et al., 2009). A localização geográfica foi atribuída a cada uma das amostras de DENV-1 (país de origem e no caso de amostras brasileiras, a região de origem no Brasil) (DRUMMOND; RAMBAUT, 2007). A distribuição posterior dos estados de localização ancestrais foi resumida usando o TreeAnnotator versão 1.6.1 e visualizada usando o FigTree versão 1.3.1 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2002-2010; RAMBAUT, 2006-2009).

4.8 INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO DOS ANIMAIS INFECTADOS

Camundongos Swiss de cerca de 6 semanas de idade foram infectados com 1×10^4 pfu de DENV-1, isolado neste estudo, por via intraperitoneal conforme descrito por Gonçalves e colaboradores (2012). Após 7 dias de infecção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e o fígado retirado para estudos histopatológicos. Os órgãos foram fixados em solução salina tamponada, contendo 10% de formol por no mínimo 24 horas. O órgão foi incluso em parafina e secções de 5 μ m foram obtidas com auxílio de um micrótomo. As Lâminas foram coradas através da técnica de hematoxilina-eosina e analisadas para a identificação das alterações histopatológicas descritas nestes modelos (BARTH et al., 2006; PAES et al., 2005; PAES et al., 2009).

5 RESULTADOS

Para iniciar o processo de isolamento viral, culturas de células C6/36 foram infectadas com o soro diluído na razão de 1/10, 1/50 e 1/100. As culturas infectadas com diluições menores do soro (1/10 e 1/50) apresentaram elevada citotoxicidade após 5 dias de infecção, permanecendo viável apenas a cultura infectada com a diluição 1/100. Após 10 dias de infecção, observou-se a presença de sincícios pequenos e isolados, indicando a presença de vírus na amostra de soro. Para favorecer o isolamento do vírus e produção do mesmo em alta quantidade, foram realizadas várias passagens e após a quarta passagem foi observada um intenso efeito citopático (Figura 8).

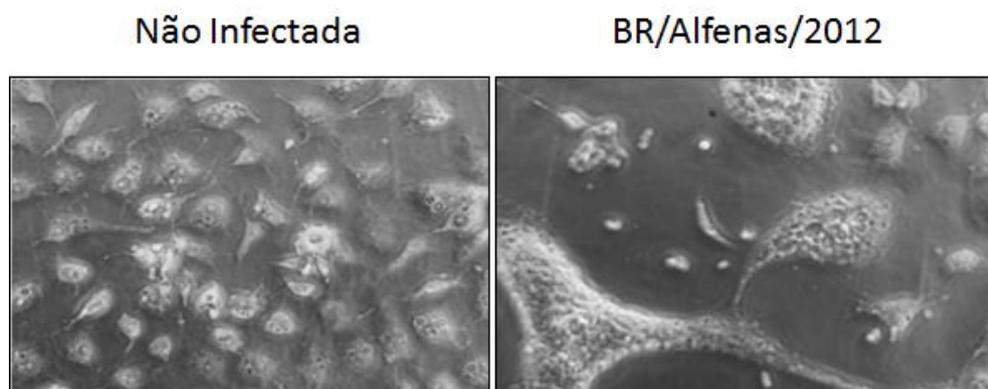


Figura 8 - Imagens demonstrando a formação de sincícios em culturas de células C6/36 infectadas com sobrenadante de 5^o passagem do DENV isolado de paciente com FHD

Fonte: do autor.

Para confirmar se o vírus isolado pertencia à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, o sobrenadante foi coletado e submetido à extração de RNA e a reação de RT-PCR para a região NS5. Conforme demonstrado na figura 9, houve a amplificação de um fragmento com tamanho próximo de 800 pb, confirmando, assim, que o vírus isolado é um *Flavivirus*.

O produto de PCR foi enviado para sequenciamento de DNA, e através do sequenciamento foi possível obter um *contig* (fragmento) de 789 pares de base (QUADRO 1), que apresentou alta similaridade com sequências de DENV-1 depositadas no *GenBank* (APÊNDICE A) após a análise pela ferramenta BLASTN (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

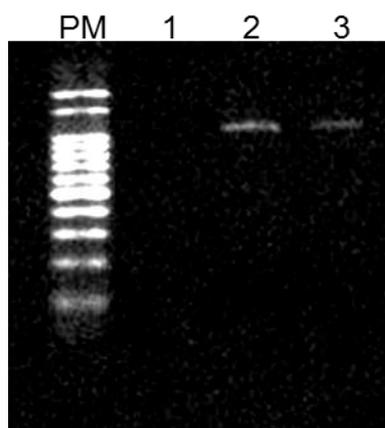


FIGURA 9 - RT-PCR para amplificação da região NS5

O sobrenadante de 4ª passagem foi submetido à extração de RNA, e esse utilizado em reações de RT-PCR para região NS5

Legenda: PM: padrão de peso molecular (Ludwig Biotecnologia); 1: controle negativo; 2: sobrenadante de 4ª passagem; 3: controle positivo (DENV-1)

Fonte: do autor.

O alinhamento da sequência de nucleotídeos, com a amostra por nós isolada, denominado BR/Alfenas/2012, com outras sequências de DENV-1, disponíveis no *GenBank*, foi utilizado para construção da árvore filogenética, pelo método *Neighbor-Joining*. O fragmento NS5 foi alinhado com o genoma completo de outros DENV isolados, devido à falta de sequências de NS5 de amostras brasileiras. A árvore filogenética construída, a partir desse fragmento, indica que a amostra BR/Alfenas/2012, foi agrupada no sorotipo 1, genótipo V, dentro da linhagem L1, ficando próximo ao isolado BID_V2401_2008 (proveniente do Norte do Brasil) e outros isolados provenientes da Venezuela e Colômbia (FIGURA 10).

Quadro 1 - Região NS5 amplificada (*contig*) BR/Alfenas/2012

1	TCCGAGCCACATGTACCATATTGCACGACTTCCTTTTGCCTTTCCAAACT	50
51	CTCCTAATTTTTTCTCTCTCTTCCCCATCATGTTGTAGACACACGTGGCA	100
101	CATTTTCCCTGTTTATGAAGCTCCCTCTCTCTGTGCACAAGATCCCCAAA	150
151	CCTTTCGTCTTCCACTGCTTCTTTTGCTGAGTTCCATTGGTTTTTCATCAA	200
201	CGAACACCGCTCCTATTGCCGCGTTTGACCTAACCTTTCTTGTGAACTCC	250
251	TCTCTTGTGCAGATTCTGGGTTTTTTGTTTCTGGAAAGGAAACCCATAA	300
301	CCACTTGGCTGTACCTCCATAATCTGCGTTGTGCCTCGTTTTGCTCTTG	350
351	GTGTGCGCGTGTCAACTTTCTCTTTAAACACTCTCTGTTGTCCAAAGGGT	400
401	GTGGTATCAGTCATAGCTATTTGTGTGACCATGGGGATAACATCCCATGG	450
451	TTTTGTGAGCAATCTCACCACTCCATTACCATAGATGAGGCTGATCCTG	500
501	ATGGCTTGACCTCATATGATCCATGATAGGCCCATGTTTTGTATGGATTG	550
551	TCCTCATCATAATGCCATGTTGACTTGTGTTTATTTTTATATTCTCTAT	600
601	CCTCTGGCCAATGATATCTAGGTTGGCTACCTCTGGTTCCACTGCCACAT	650
651	GTCTTGTTCCAGCGCCTAAGTCCACGTCTTTTCATATGTTGGCTTCCTG	700
701	TGAGCCATTGTGAATCGGTTTCAGTAACATTCTGGATGTCATGTTCACTGC	750
751	CGACACAATGTTTCCTGTTCCACATGAAACCCAATACAT	789

Fonte: do autor.

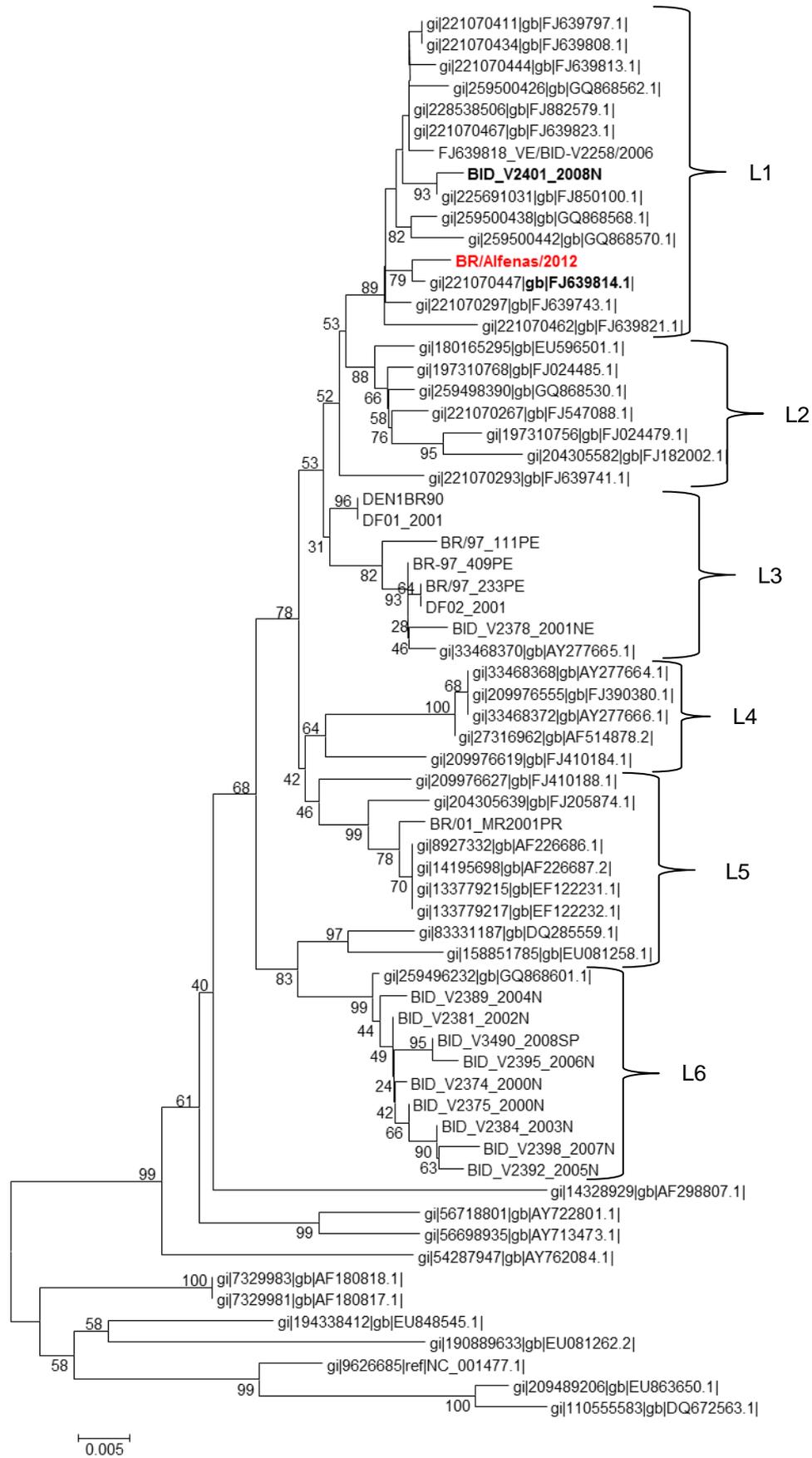


Figura 10 - Análise filogenética do isolado BR/Alfenas/2012, baseada na região NS5
 Fonte: do autor.

Uma vez que a região NS5 é conservada entre os sorotipos/genótipos de DENV, faz-se necessário utilizar regiões mais variáveis, onde é possível avaliar com melhor eficácia divergências existentes entre os genótipos de DENV isolados. A região codificadora da proteína E vem sendo largamente utilizada, como ressaltado por Klungthong et al. (2008) nos estudos de filogenia molecular. Com isso, realizou-se uma RT-PCR para amplificação dessa região (FIGURA 11). O produto de PCR foi purificado e sequenciado, obtendo-se um *contig* de 1485 pares de base.

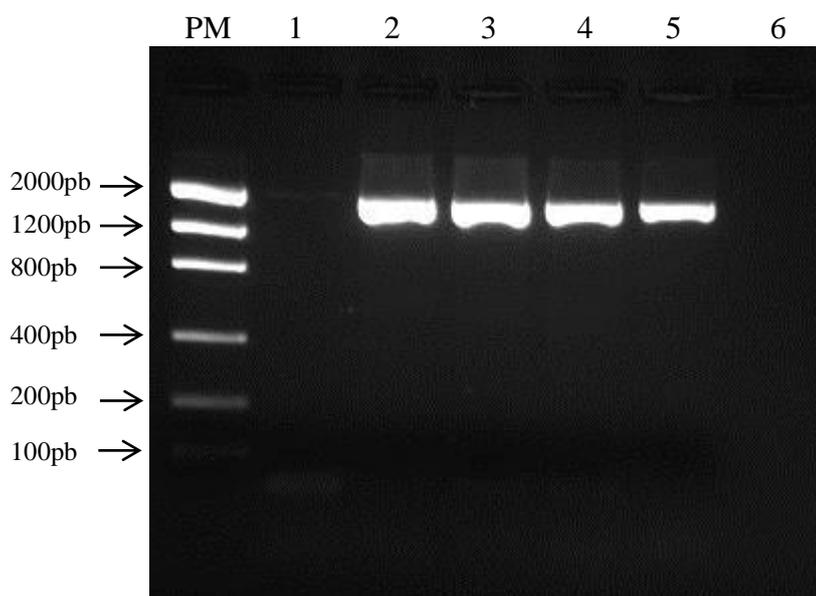


FIGURA 11 - RT-PCR para amplificação da região codificadora da proteína E
 PM: padrão molecular (Low DNA Mass Ladder); 1: soro do paciente; 2 e 3 sobrenadante de 4^a passagem; 4 e 5 sobrenadante de 5^a passagem; 6: controle negativo

Fonte: do autor.

A partir desse *contig*, foi realizado o alinhamento da sequência de nucleotídeos da amostra BR/Alfenas/2012 com outras sequências de DENV-1, disponíveis no *GenBank*, para a construção da árvore filogenética, pelo método *Maximum Likelihood*. A árvore filogenética construída a partir do fragmento E do DENV-1, confirma o agrupamento desse isolado dentro do genótipo V, linhagem L1, ficando muito próximo aos isolados 0122_2011/BR/RJ/2011 e 15_2010/BR/RJ/2010, provenientes do Rio de Janeiro, bem como se encontra no mesmo braço do isolado BID_V2401_2008 (proveniente do Norte do Brasil) e outros isolados provenientes da Venezuela e Colômbia (FIGURA 12).

Quadro 2 - Região da proteína codificadora E amplificada (*contig*) BR/Alfenas/2012

1	ATGCGATGCGTGGGAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGG	50
51	AGCAACGTGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCA	100
101	TGGCAAAAAACAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTC	150
151	ACGAACCCTGCCGTCTTGCGCAAACCTGTGCATCGAAGCTAAAAATATCAA	200
201	CACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGG	250
251	AAGAACAAGACGCGAACTTTGTGTGTGTCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGC	300
301	TGGGGTAATGGCTGTGGACTATTTCGAAAAGGGAAGTCTATTGACGTGTGC	350
351	CAAGTTCAAGTGTGTGACAAAACCTAGAGGGAAAAGATAGTTCAATATGAAA	400
401	ACTTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAG	450
451	GTGGGAAACGAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCA	500
501	AGCTCCCACGTCCGAAATACAGCTGACCGACTACGGAGCCCTCACACTGG	550
551	ACTGCTCACCTAGAACAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTCTATTGACA	600
601	ATGAAAGAAAATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTTCTAGACTTACC	650
651	ACTGCCATGGACTACGGGAGCTTCAACATCCCAAGAGACCTGGAACAGAC	700
701	AAGATTTGCTGGTCACATTCAGACAGCTCATGCAAAGAAACAGGAAGTA	750
751	GTCGTA CTGGGATCACAGGAAGGAGCAATGCACACAGCGTTGACTGGGGC	800
801	GACAGAAATCCAGACGTCAGGAACGACAACAATCTTTGCGGGACACCTGA	850
851	AATGCAGACTAAAAATGGATAAACTGACCTTAAAAGGGATGTCATATGTG	900
901	ATGTGCACAGGCTCATCTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCA	950
951	TGGAACGTCTCTAGTGCAGGTTAAATATGAAGGAACAGATGCACCATGCA	1000
1001	AGATCCCTTTCTCGACCCAAGATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGA	1050
1051	TTGATAACAGCCAATCCCATAGTTACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACAT	1100
1101	TGAGACAGAACCACCTTTTGGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGGCAGGCG	1150
1151	AAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAA	1200
1201	ATGTTCGAAGCAACCGCCCGAGGAGCACGAAGGATGGCTATCCTGGGAGA	1250
1251	CACTGCATGGGACTTCGGTCTATAGGAGGAGTGTTTACATCTGTGGGAA	1300
1301	AATTGGTACATCAGGTTTTTGGAAACCGCATATGGGGTTCTGTTTAGCGGT	1350
1351	GTTTCTTGACCATGAAAATAGGAATAGGGATTCTGCTGACATGGTTGGG	1400
1401	ATTAAATTCAAGGAGCACGTCACCTTTCGATGACGTGCATTGCAGTTGGCA	1450
1451	TGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCAAGCG	1485

Fonte: do autor.

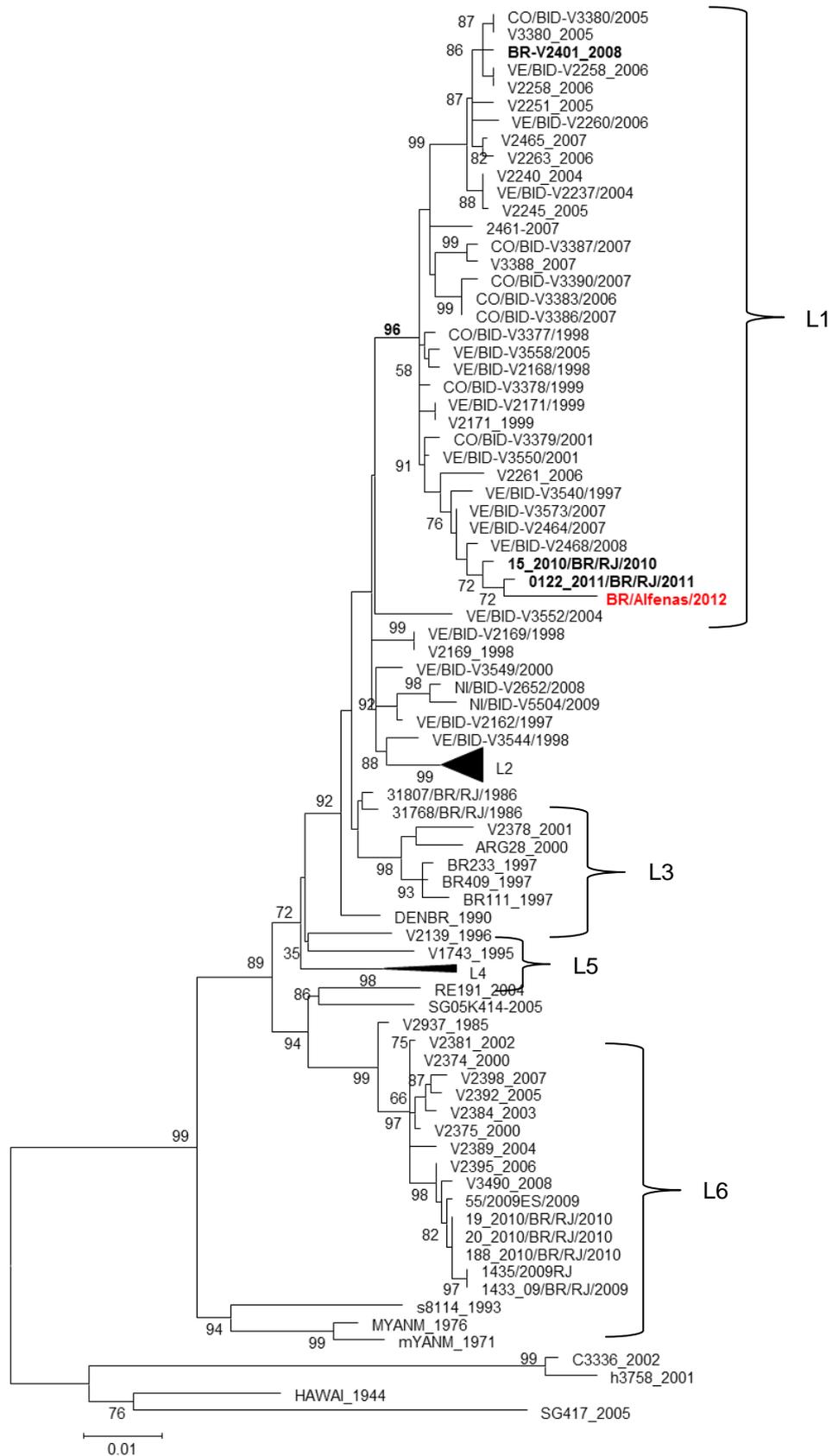


Figura 12 - Árvore filogenética com história evolucionária inferida pelo método *Maximum Likelihood*, a partir do envelope do DENV-1. Agrupamento na linhagem L1, semelhante a amostras isoladas no Rio de Janeiro em 2010 e 2011, Norte do Brasil em 2008, e outros isolados provenientes da Venezuela e Colômbia

Fonte: do autor.

Utilizando a mesma sequência codificadora da proteína E, realizou-se também a estimativa de origem do isolado BR/Alfenas/2012 através de análise filogeográfica (FIGURA 13). No detalhe, a amostra BR/Alfenas/2012 também se agrupa com duas amostras do Rio de Janeiro. Pela análise de filogeografia, provavelmente o isolado BR/Alfenas/2012 foi introduzido em Alfenas a partir de algum outro isolado da região Sudeste do país. É Provavel que exista um ancestral comum entre os isolados do Rio de Janeiro/RJ e de Alfenas/MG, e que este, provavelmente, tenha vindo da Venezuela. Desse modo, podemos observar que após a introdução deste vírus no Brasil, possivelmente no Rio de Janeiro (o que é evidenciado pela análise filogeográfica), ele se disseminou para Minas Gerais (Alfenas), onde teve uma evolução local, o que pode ser visto pela distância maior da amostra de Alfenas/MG em relação às amostras do Rio de Janeiro/RJ.

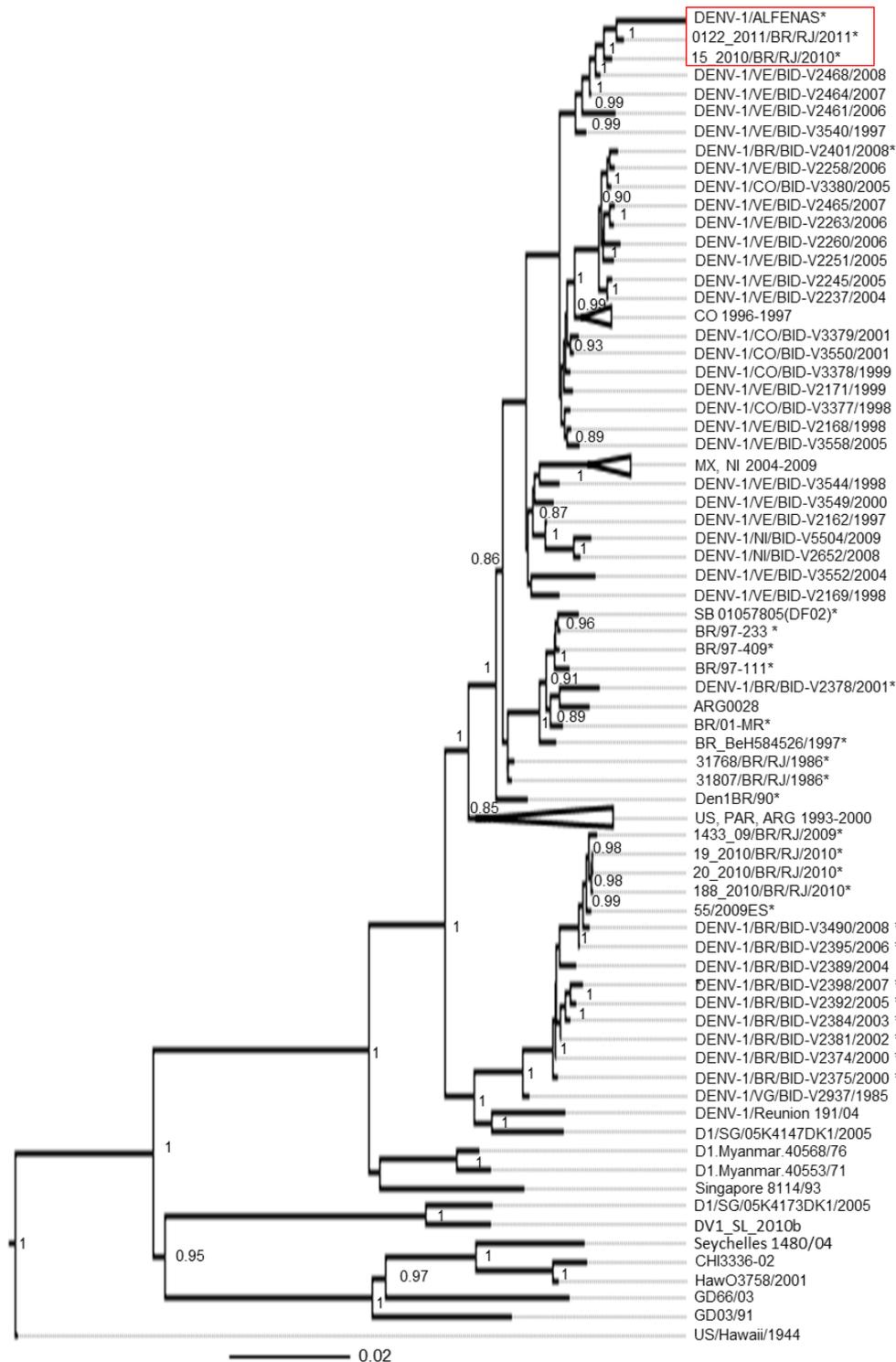


Figura 13 - Análise filogenética de DENV-1 baseada no gene que codifica a proteína E. A árvore foi inferida através de análise Bayesiana, usando o modelo Tamura-Nei, com distribuição Gama. A árvore está em escala com tamanho dos ramos medidos em número de substituições por sítio. Os valores de probabilidade posterior acima de 0,85 estão apresentados nos respectivos nós. Por motivos de clareza, algumas amostras foram agrupadas: amostras obtidas na Colômbia entre 1996 e 1997 (CO 1996-1997), amostras provenientes da Nicarágua e México, isoladas de 2004 a 2009 (MX, NI 2004-2009) e amostras provenientes da Argentina, Paraguai e Porto Rico, isoladas de 1993 a 2000 (US, PAR, ARG 1993-2000)

Fonte: do autor.

Para avaliar a presença de mutações na sequência codificadora da proteína do envelope, do isolado BR/Alfenas/2012, realizou-se um alinhamento entre a sequência de nucleotídeos deste isolado com outros isolados de DENV-1 pertencentes a este genótipo/linhagem, através do software MEGA5. A figura 14 apresenta as diferenças de nucleotídeos na proteína E entre o isolado BR/Alfenas/2012 e outros isolados do DENV-1 pertencentes ao mesmo genótipo e linhagem.

```

1                               8                               25 26
#Den1BR/90                      ATG CGA TGC GTG GGA ATA GGC AAC AGA GAC TTC GTT GAA GGA CTG TCA GGA GCA ACG TGG GTG GAC GTG GTA TTG GAG
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..
#15_2010/BR/RJ/2010            ... ..
#0122_2011/BR/RJ/2011          ... ..
#BR/Alfenas/2012                ... ..T...C...

27                               52
#Den1BR/90                      CAT GGA AGC TGC GTC ACC ACC ATG GCA AAA AAT AAA CCA ACA TTG GAC ATT GAA CTC TTG AAG ACG GAG GTC ACG AAC
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..
#15_2010/BR/RJ/2010            ... ..
#0122_2011/BR/RJ/2011          ... ..T...C...
#BR/Alfenas/2012                ... ..C...

53                               61                               78
#Den1BR/90                      CCT GCC GTC TTG CGC AAA CTA TGC ATT GAA GCT AAA ATA TCA AAC ACC ACC ACC GAT TCA AGA TGT CCA ACA CAA GGA
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..G...
#15_2010/BR/RJ/2010            ... ..A...G...
#0122_2011/BR/RJ/2011          ... ..G...
#BR/Alfenas/2012                ... ..G...C...

79                               104
#Den1BR/90                      GAG GCT ACA CTG GTG GAA GAA CAA GAC GCG AAC TTT GTG TGT CGA CGA ACG TTT GTG GAC AGA GGC TGG GGT AAT GGC
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..C...
#15_2010/BR/RJ/2010            ... ..C...
#0122_2011/BR/RJ/2011          ... ..C...
#BR/Alfenas/2012                ... ..C...

105                               130
#Den1BR/90                      TGC GGA CTA TTT GGA AAA GGA AGC CTA TTG ACG TGT GCC AAG TTT AAG TGT GTG ACA AAA CTA GAA GGA AAG ATA GTT
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..C...G...T...C...
#15_2010/BR/RJ/2010            ..T...C...G...T...C...G...
#0122_2011/BR/RJ/2011          ..T...C...G...T...C...G...
#BR/Alfenas/2012                ..T...C...G...T...C...G...

131                               156
#Den1BR/90                      CAA TAT GAA AAC TTA AAA TAT TCA GTG ATA GTC ACT GTC CAC ACT GGG GAC CAA CAC CAG GTG GGA AAC GAG ACT ACA
#DENV-1/BR/BID-V2401/2008      ... ..G...T...C...C...G...T...G...G...C...
#15_2010/BR/RJ/2010            ... ..G...G...G...G...G...C...
#0122_2011/BR/RJ/2011          ... ..G...G...G...G...G...C...
#BR/Alfenas/2012                ... ..G...G...G...G...G...C...

```

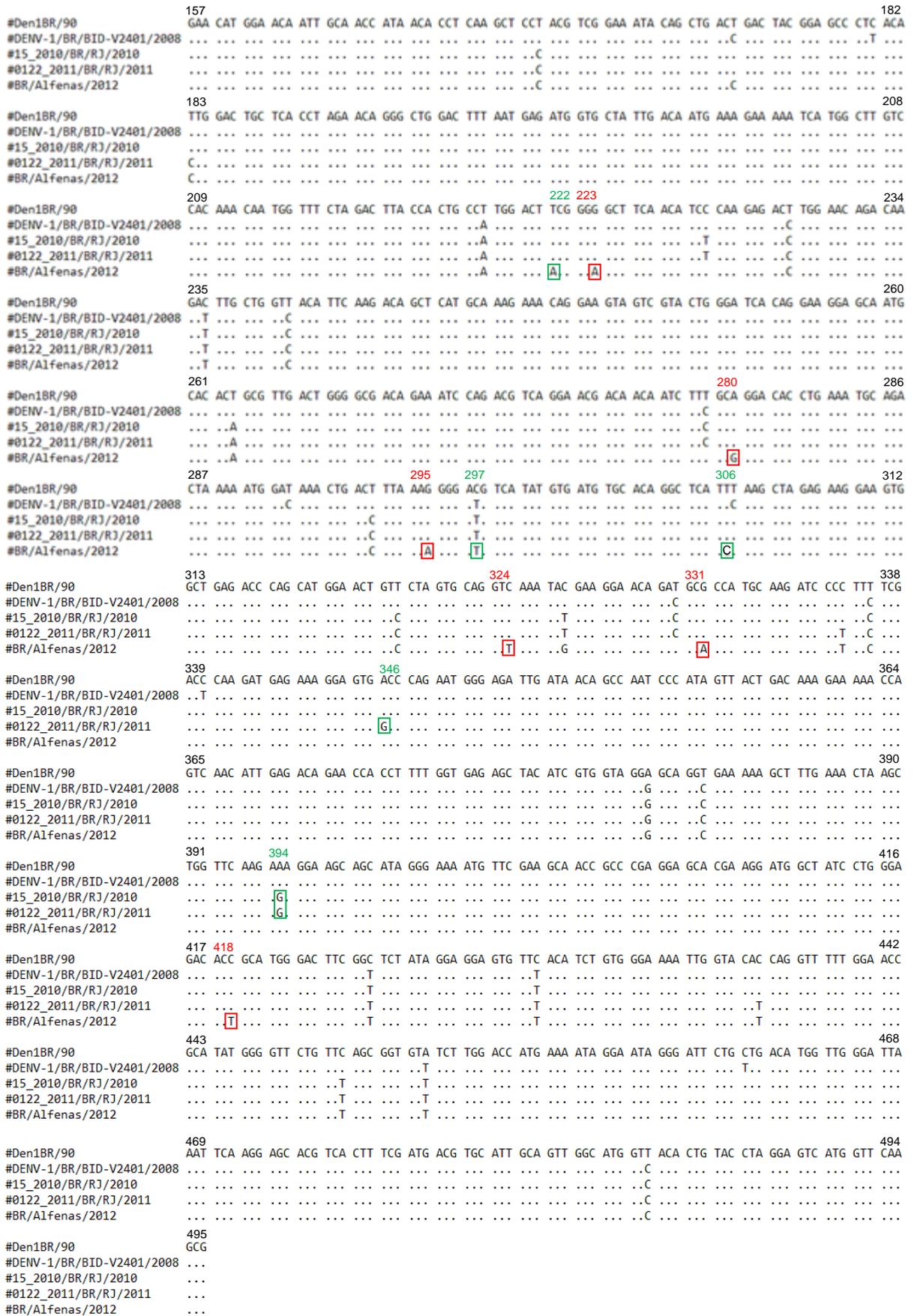


Figura 14 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos inferidas entre os isolados pertencentes ao genótipo V, linhagem L1, através do *software* MEGA5

Legenda: os números representam os aminoácidos da proteína E (1 a 495).

- mutações sinônimas (n=9)
- mutações não sinônimas (n=5)

Fonte: do autor.

Entre as mutações sinônimas, pode-se observar uma diferença de nove bases nitrogenadas, quando se compara a proteína E do isolado BR/Alfenas/2012, com outros isolados pertencentes à mesma linhagem.

Com relação aos aminoácidos, observou-se que dos 495 aminoácidos que compõem a proteína do envelope do DENV-1, houve divergência de cinco aminoácidos entre os isolados analisados, pertencentes à linhagem L1 do DENV-1 (FIGURA 14, TABELA 3).

Tabela 3 – Diferenças de aminoácidos na proteína E entre isolados brasileiros do *Dengue virus* tipo 1

Linhagem	Isolado	Posição e localização do aminoácido na proteína E				
		222 DII	297 DIII	306 DIII	346 DIII	394 DIII
	Den1BR90	S	T	F	T	K
	BR/BID-V2401/2008	S	M	F	T	K
L1	15_2010/BR/RJ/2010	S	M	F	T	R
	0122_2011/BR/RJ/2011	S	M	F	A	R
	BR/Alfenas/2012	T	M	S	T	K

Legenda: S: serina; T: treonina; M: metionina; F: fenilalanina; A: alanina; K: lisina; R: arginina
Fonte: do autor.

Comparando-se os aminoácidos que apresentaram divergência, observou-se que o isolado BR/Alfenas/2012 apresentou mudança de serina para treonina na posição 222 do domínio II. As outras substituições de aminoácido se deram no domínio III da proteína E, onde se observou presença de uma substituição de fenilalanina para serina, na posição 306; a mudança de treonina para metionina na posição 297, a mudança de alanina para treonina na posição 346 e na posição 394 foi detectada a substituição de arginina para lisina. Estas três últimas substituições já foram observadas em isolamentos anteriores desse genótipo/linhagem.

A tabela 4 mostra o número de substituições de bases por local entre as sequências selecionadas. As análises foram realizadas utilizando o modelo *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). Há um distanciamento maior entre o isolado BR/Alfenas/2012 e o isolado Den1_BR/90, e uma menor divergência entre o isolado BR/Alfenas/2012 e os isolados 15_2010/BR/RJ/2010 e 0122_2011/BR/RJ/2011.

Além das mudanças de aminoácidos (mutações não-sinônimas), ocorridas entre as amostras comparadas, também se observou mutações sinônimas, onde o aminoácido permanece o mesmo. Na tabela 5 demonstramos as mutações sinônimas ocorridas no isolado BR/Alfenas/2012 comparado com outros isolados da mesma linhagem.

Tabela 4 – Estimativas de divergência evolucionária entre as sequências de nucleotídeos da proteína E do DENV-1 amostra BR/Alfenas/2012 e outras amostras pertencentes à mesma linhagem

Isolados	Divergências entre as sequências em %				
	Alfenas/2012	Den1BR/90	RJ/2010	RJ/2011	
BR/Alfenas/2012	--				
Den1BR/90	3,02	--			
DENV-1/BR/BID-V2401/2008	2,58	2,50	--		
15_2010/BR/RJ/2010	1,51	2,22	1,79	--	
0122_2011/BR/RJ/2011	1,24	2,65	2,07	0,54	--

Fonte: do autor.

Tabela 5 – Mutações sinônimas presentes no isolado BR/Alfenas/2012 em comparação com outros isolados da linhagem L1

Aminoácido	Mudança de base na base nitrogenada		Posição na proteína E
	BR/Alfenas/2012	Outros isolados L1	
Asn	AAT	AAC	8
Val	CTG	TTG	25
Ile	ATC	ATT	61
Gli	GGA	GGG	223
Ala	GCG	GCA	280
Lis	AAA	AAG	295
Val	GTT	GTC	324
Ala	GCA	GCG	331
Tre	ACT	ACC	418

Legenda: Asn: asparagina; Val: valina; Ile: isoleucina; Gli: glicina; Ala: alanina; Lis: lisina; Ter: treonina
Fonte: do autor.

Para verificar o potencial de virulência do isolado BR/Alfenas/2012, camundongos Swiss foram infectados com 1×10^4 unidades formadoras de placa (n=5) e o fígado destes animais foram retirados após sete dias de infecção. Animais não infectados (n=5) foram utilizados como controles. Conforme observado na figura 15, nos animais infectados foi observada a presença de infiltrado inflamatório ao

redor das veias centrais. Além desta alteração, foram detectados também pontos focais de edema, hemorragia, esteatose e necrose dos hepatócitos.

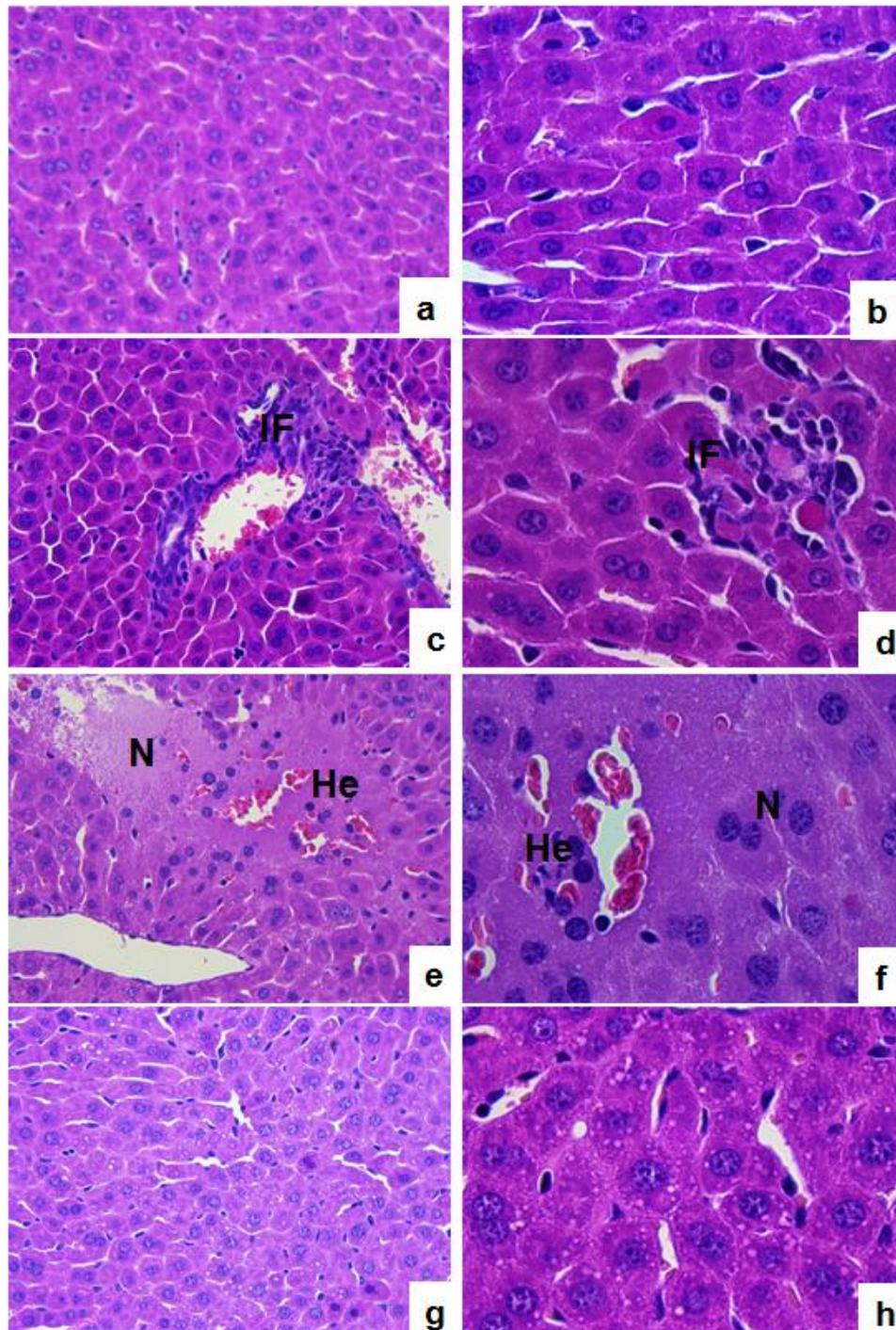


Figura 15 - Análise histopatológica do fígado de animais infectados com o isolado BR/Alfenas/2012. (a-b) Fígado dos camundongos não infectados nos aumentos de 400 e 1000X respectivamente; (c-d) Fígado dos animais infectados com BR/Alfenas/2012 demonstrando a presença de infiltrado inflamatório; (e-f) pontos de hemorragia, edema e necrose e (g-h) esteatose hepática

Legenda: IF: infiltrado inflamatório; N: necrose; He: hemorragia

Fonte: do autor.

6 DISCUSSÃO

As análises dos dados do genoma tem se tornado o centro dos estudos sobre a evolução do DENV, e de sua epidemiologia. Sabe-se que cada um dos quatro sorotipos do DENV abriga uma extensa diversidade genética, sob a forma de aglomerados filogeneticamente diferentes, denominados genótipos, e dentro dos genótipos é possível ainda realizar o agrupamento em diferentes linhagens ou clados (RICO-HESSE, 2003; HOLMES; TWIDDY, 2003).

Estudos evolutivos têm mostrado que a diversidade genética do DENV está aumentando, e que as mutações e recombinações são responsáveis por isso. Existe a possibilidade de diferentes genótipos de um mesmo sorotipo viral co-infectar a mesma pessoa, formando uma molécula de RNA híbrido. Infecção simultânea de *Aedes aegypti* por vírus diferentes durante surtos e epidemias resulta em uma alta taxa de replicação viral, favorecendo o surgimento de alterações genéticas (BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012).

No Brasil, vários estudos vêm retratando a diversidade genotípica entre os diferentes sorotipos do DENV. O DENV-1, do qual o isolado BR/Alfenas/2012 faz parte, foi isolado de 2009 a 2010 no estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo; nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Roraima, Tocantins, Ceará, Maranhão, Piauí, Rio Grande do Norte, Mato Grosso e Minas Gerais, de epidemias ocorridas no país de 1994 a 2011; na cidade de São José do Rio Preto de 2004 a 2007; em Pernambuco de 1995 a 2003; no estado do Paraná (cidades de Assaí, Planaltina do Paraná, Sertanópolis, Pato Bragado, Realeza, São Miguel do Iguaçu, Nova Aurora e Foz do Iguaçu) em 2010 (DOS SANTOS et al., 2011; CARNEIRO et al., 2012; DRUMOND et al., 2012; CORDEIRO et al., 2007; BONA; TWERDOCHLIB; NAVARRO-SILVA, 2012). Estudos ainda verificaram a presença de DENV-1, genótipo I, na cidade de Barretos (São Paulo) em 2001 (SANTOS, et al., 2003).

O município de Alfenas possui um elevado índice de infestação predial (cerca de 3,8%), sendo classificado como de médio risco de transmissão do DENV, porém a quantidade de casos notificados é pequena, o que dificulta a obtenção de amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue (ALFENAS, 2011). Em 2012, foi encaminhado ao Laboratório de Vacinas da Unifal-MG uma amostra de um paciente com suspeita de dengue. Os exames laboratoriais e manifestações clínicas

o classificam como FHD grau II. Os exames sorológicos confirmaram a presença de IgM e IgG anti-dengue.

Os estudos histopatológicos, no fígado dos animais infectados com este isolado, indicam a presença de inúmeras alterações, já anteriormente descritas em outros estudos, reforçando o potencial virulento deste isolado, uma vez que ele foi originado de um caso autoctone de FHD (BARTH et al., 2006; PAES et al., 2005; PAES et al., 2009).

O isolamento viral ocorreu de forma satisfatória, sendo que os sobrenadantes de 4^o e 5^o passagem apresentaram alta quantidade de sincícios formados a partir do 5^o dia de infecção (FIGURA 8). O RT-PCR da região NS5 demonstrou se tratar de um *Flavivirus*, utilizando-se o protocolo proposto por Maher-Sturgess et al. (2008) de detecção de *Flavivirus* (FIGURA 9). A árvore construída agrupou o isolado BR/Alfenas/2012 no sorotipo 1, genótipo V, que segundo Gonçalves et al. (2002) e Rico-Hesse (1990) é representado por todas os isolados coletadas nas Américas, isolados da África Ocidental e um número limitado de isolados coletados da Ásia.

Através do sequenciamento da proteína E obteve-se um *contig* de 1485 pares de base (QUADRO 2), onde a construção da árvore filogenética pelo método *Maximum Likelihood* (FIGURA 12), confirmou o agrupamento encontrado através da árvore criada com o fragmento NS5. Devido a existência de maior número de isolados com sequenciamento da proteína E do DENV depositados no *GenBak*, foi possível construir uma árvore filogenética com maior detalhamento. As análises realizadas, a partir da proteína E, permitiu observar que o isolado BR/Alfenas/2012 possui um forte agrupamento (*bootstrap* 96%) com outros isolados de DENV-1/genótipo V/linhagem L1, muito provavelmente descendente de isolados provenientes da Colômbia (CO/BID-V3379/2001) e Venezuela (VE/BID-V3550/2001) (*bootstrap* 91%), bem como outros isolados pertencentes a esta linhagem, como os isolados 0122_2011/BR/RJ/2011 e 15_2010/BR/RJ/2010 (*bootstrap* 72%), encontradas no Estado do Rio de Janeiro e ficando no mesmo braço do isolado BID_V2401_2008 (*bootstrap* 86%), proveniente do Norte do Brasil, e outros isolados provenientes da Venezuela e Colômbia.

Já a análise filogeográfica permitiu estimar a origem do isolado BR/Alfenas/2012. A partir desta análise pode-se inferir que este isolado é descendente direto de amostras do Rio de Janeiro/RJ (0122_2011/BR/RJ/2011 e 15_2010/BR/RJ/2010), onde provavelmente se deu a entrada deste vírus no Brasil.

Também foi possível identificar o ancestral comum das amostras brasileiras pertencentes a este mesmo genótipo/linhagem. Trata-se do isolado DENV-1/VE/BID-V2468/2008, uma amostra venezuelana de 2008. Portanto, provavelmente, o isolado descrito neste estudo é descendente do DENV-1 introduzido no Rio de Janeiro. Porém, o isolado BR/Alfenas/2012 apresentou uma evolução local, o que pode ser visto pela distância maior da amostra de Alfenas/MG em relação às amostras do Rio de Janeiro/RJ.

Sabe-se que a proteína E possui uma estrutura com 3 domínios, sendo o DI o domínio central que é flanqueado em um dos lados por um alongado domínio de dimerização, o DII, e pelo outro lado por um domínio semelhante a imunoglobulina, o DIII (MODIS et al., 2003). Chambers et al. (1990) observaram que as substituições dos aminoácidos são observadas principalmente na região da proteína E. Essa proteína está localizada na superfície do DENV e é o antígeno viral dominante, exibindo propriedades de hemaglutinina. O DIII da proteína E possui uma região compreendendo os resíduos 299 a 397, que formam a extremidade C-terminal da proteína E. Este domínio está envolvido na ligação ao receptor, com os resíduos expostos na superfície do vírus, sendo responsável pela determinação da especificidade do receptor, tipo de vetor e hospedeiro e tropismo de células (CHEN et al. 1997; MANDL et al. 2000; CRILL; ROHRIG, 2001; NAYAK et al. 2009).

O domínio III da proteína E, quando inibido em estudos experimentais, é capaz de inibir a infecção pelo DENV e induzir anticorpos neutralizantes. O DIII é muito importante na interação de receptores celulares, tanto de células humanas como nas células do inseto vetor (LU et al., 2008; CHIN; CHU; NG, 2007). Muitos estudos têm demonstrado que as mutações que afetam a proteína E, podem alterar a virulência do DENV, pois estas mutações podem modificar a interação da partícula viral com receptores na superfície da célula hospedeira ou ainda interferir com o processo de fusão do DENV com a membrana celular do hospedeiro (CHEN; MAGUIRE; MARKS, 1996; HUERTA et al. 2008; STIASNY et al., 2011; WAHALA et al., 2009).

O alinhamento da proteína E do isolado BR/Alfenas/2012 com os isolados Den1BR/90, DENV-1/BR/BID-V2401/2008, 15_2010/BR/RJ/2010 e 0122_2011/BR/RJ/2011 indica a presença de duas trocas de aminoácidos que só ocorrem no isolado BR/Alfenas/2012, onde se observa a substituição de serina para treonina, na posição 222 do DII, e de fenilalanina para serina, na posição 306 do DIII (TABELA 3). Como observado em nosso estudo, no resíduo 297 da proteína E,

houve substituição de aminoácido, que segundo Rey et al. (1995), está situada na interface entre DI e DII, da proteína E, o qual pode influenciar a patogenicidade dos *Flavivirus*. Substituições de aminoácidos nesse domínio têm sido descritos por vários estudos (CARNEIRO et al., 2012; DESPRÉS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993; GONÇALVEZ et al., 2002, BARRERO et al., 2004).

Em toda proteína E observa-se um número maior de mutações sinônimas (n=09) em relação às substituições não sinônimas (n=05). Gonçalvez et al. (2002) demonstraram a evolução do gene E do DENV-1, através de um relógio molecular onde observaram mutações que foram medidas na posição do terceiro códon. Esse tipo de mutação leva principalmente a substituições sinônimas e, como tal, é menos influenciada por uma pressão de seleção positiva ou purificadora. Seguindo o modelo do relógio molecular, foi constatado que as diferentes linhagens genéticas do DENV-1 evoluem a uma taxa constante, apesar do fato destas linhagens estarem associadas a uma dispersão geográfica mundial, com diferentes situações epidemiológicas envolvidas, com longos períodos de epidemia ou transmissões endêmicas.

Com relação à divergência entre os isolados da mesma linhagem, observa-se que houve uma pequena divergência entre o grupo analisado (TABELA 4), onde o maior distanciamento observado foi entre o isolado BR/Alfenas/2012 e o isolado Den1 BR/90 (3,02% de divergência), e menor divergência entre o isolado BR/Alfenas/2012 e os isolados 15_2010/BR/RJ/2010 e 0122_2011/BR/RJ/2011, que foram de 1,51% e 1,24% respectivamente.

Com base na estimativa da taxa de evolução, estudos de cladogênese com isolados de DENV-1, revelaram que a transferência zoonótica do DENV silvestre (de macacos) para humanos, se deu a partir de uma linhagem ancestral de aproximadamente 121,5 anos atrás (TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT, 2003; GONÇALVES et al., 2002). Portanto, pode-se considerar que os DENV-1 circulantes no Brasil se originaram a partir de um ancestral comum compartilhado por isolados da África no final do século 19 e início do século 20, sendo que o ancestral que deu origem ao genótipo V, encontrado nas Américas e na África Ocidental, divergiram cerca de 70,48 anos atrás, entre os anos 1940 e 1945 (CARNEIRO et al., 2012).

Dados cronológicos de um estudo realizado por Guzman e Kouri (2002) sugerem que a linhagem ancestral que deu origem ao genótipo V encontrado circulando nas Américas surgiu entre 1940 a 1945. Esse período foi precedido por

surtos de dengue em alguns países da América, incluindo os Estados Unidos (Texas, 1922) e alguns países do Caribe (1934). Nas décadas seguintes, a doença foi disseminada para outros países, como o Panamá, Porto Rico, Venezuela e Cuba. Estudos realizados por Gubler (1998) e Guzman e Kouri (2002), revelam que o ancestral comum, que deu origem aos isolados brasileiros surgiu entre 1965 a 1970.

Dos Santos et al. (2011) realizaram um estudo para avaliar a circulação do DENV-1 no Brasil e observaram um baixo percentual de identificação dos vírus isolados recentemente com os isolados introduzidos pela primeira vez, na década de 80, sugerindo uma re-emergência do DENV-1, o qual não evoluiu localmente, mas ocorreu, provavelmente, devido a introduções de novas linhagens no país.

A análise com base nas sequências da proteína E de isolados de DENV-1 isoladas na região Norte do Brasil de 2000 a 2008, disponíveis no *GenBank*, confirmam a hipótese de que esses vírus poderiam ter sido predominantes anteriormente e sua baixa ou silenciosa circulação poderiam ser devido a prevalente circulação do DENV-3 ou DENV-2 durante esse período. A circulação de mais de uma linhagem do DENV-1 foi descrito na Ásia (KUKRETI et al., 2009) e na América (MENDEZ et al., 2010). Outro estudo realizado por Carrillo-Valenzo et al. (2010) relata a introdução atual de várias linhagens virais de cada sorotipo do DENV no México, com substituições frequentes de linhagem. De fato, as substituições das linhagens parecem ser uma observação mais comum do que a persistência em longo prazo de uma determinada linhagem (BENNETT et al., 2003).

Também dos Santos et al. (2011), baseados em análises da sequência genética da proteína E, observaram que os isolados de DENV-1 isolados durante 2009 e 2010, no Rio de Janeiro e um isolado do Estado do Espírito Santo, utilizado para fins de comparação, ainda pertenciam ao genótipo V (América/África) previamente detectado no país, mas foram agrupados em um clado distinto (linhagem II), diferentes dos isolados de DENV-1 brasileiros isolados anteriormente (linhagem I). Constatou-se que o DENV-1 re-emergente estava mais estritamente relacionado com isolados em Singapura, em 1990 e em 2005, o que sugere uma provável origem Asiática. A existência de linhagens com relações geográficas e temporais distintas foi sugerida pelo trabalho realizado na Colômbia com DENV-1 (MENDEZ et al., 2010).

Portanto, surtos associados com o ressurgimento de DENV-1 no Brasil, que vem ocorrendo desde 2009, podem ser devido a substituições de linhagem. No

entanto, outros fatores, tais como um grupo de novas pessoas susceptíveis deve ser considerado, porque o DENV-1 foi o primeiro sorotipo a ser introduzido no país desde 1982. A circulação maciça nos primeiros anos endêmicos (1980) foi seguida por uma baixa circulação (CARNEIRO et al., 2012). Desse modo, a substituição de linhagem ocorre quando um subtipo viral, que persiste em uma dada localidade particular por um período de tempo, não é evidente em uma amostragem subsequente, indicando que diminuiu drasticamente sua frequência, ou mesmo sendo extinta, e por vezes substituída por um novo subtipo do vírus (ZHANG et al., 2005). Os processos evolutivos que controlam estes acontecimentos não são completamente compreendidos. Sugere-se que, apesar da endemicidade de um sorotipo em particular, de uma região geográfica específica durante um longo período, diferentes clados/subtipos virais podem estar envolvidos nesse período (RAGHWANI et al., 2011).

Sabe-se que a introdução de novos sorotipos DENV/genótipos/linhagens é um importante fator de risco para epidemia de dengue. De 2009 a 2010 houve uma epidemia causada pelo DENV-1 na maioria dos estados brasileiros. Porém, não está claro se essa epidemia foi devido à substituição de linhagem. A suscetibilidade da população a este sorotipo, e a ocorrência de infecções secundárias em um país hiperendêmico, também pode ter desempenhado um papel importante na epidemiologia da doença. Nesse cenário, o monitoramento do DENV é de grande relevância para se observar a propagação de isolados potencialmente virulentos, bem como para avaliar o seu impacto sobre a população durante um surto/epidemia. Devido à geografia do Brasil e a epidemiologia da dengue, junto com o fato de que o país tem regiões turísticas muito importantes, sugere-se uma análise maior, para melhor caracterizar esses eventos de substituição e introduções de linhagem no país (DOS SANTOS et al., 2011).

7 CONCLUSÃO

Estudos que monitoram a sequência dos sorotipos circulantes são importantes para manter o controle desses eventos genéticos, a fim de diagnosticar as grandes epidemias e a migração geográfica desses isolados. O aumento da diversidade genética do DENV pode ter consequências graves, como por exemplo a geração de vírus com amplas propriedades patogênicas e o aumento da transmissibilidade e virulência.

A histopatologia hepática identificou a presença de inúmeras alterações, evidenciando o potencial virulento deste isolado.

Este trabalho relata o primeiro isolamento e estudo filogenético de um isolado de DENV na região sul do Estado de Minas Gerais. As análises filogenéticas mostraram, que o isolado analisado (BR/Alfenas/2012) foi classificado como DENV-1, pertencente ao genótipo V e linhagem L1. A análise da região codificadora da proteína E revelou que algumas mutações presentes neste isolado, levam a substituições não-sinônimas de aminoácidos se comparada à outros isolados de DENV-1 pertencentes ao mesmo genótipo/linhagem.

A análise filogeográfica permitiu estimar a origem do isolado BR/Alfenas/2012, que é um descendente direto de amostras do Rio de Janeiro/RJ, bem como identificar o ancestral comum das amostras brasileiras pertencentes a este mesmo genótipo/linhagem. O isolado DENV-1/VE/BID-V2468/2008, uma amostra venezuelana de 2008.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS. Secretaria Municipal de Saúde. **Plano de contingência para enfrentamento de epidemias de dengue**. 2011. Disponível Em:< http://epidemiologia.alfenas.mg.gov.br/news/arquivos/plano_cont_alfenas_2012.pdf> . Acesso em: 10 ago. 2012.
- ALLISON, S. L. et al. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. **Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 695-700, Feb. 1995.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- AVIRUTNAN, P. et al.. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 207, n. 4, p. 793-806, Apr. 2010.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, n. 8, p. 1078-88, Apr. 2006.
- BARRERO, P. R.; MISTCHENKO, A. S. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. **Virus Research**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 135-145 May. 2004.
- BARTH; O. M. **Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis**. 3. ed.. Rio de Janeiro: s.n, 2000. Revised online edition 2010. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/ioc/media/2010%20Atlas%20completo%20rede.pdf>>. Acesso em: 20 marc. 2013.
- BARTH; O. M. et al. Morphological studies in a model for dengue-2 virus infection in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 905-915, Dec. 2006.
- BENNETT, S. N. et al. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. **Molecular Biology Evolution**, Chicago, v. 20, n. 10, p. 1650-8, Oct. 2003.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr. 2013.
- BLACKSELL, S. D. et al. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and Vaccine Immunology**, Whashington DC, v. 18, n. 12, p. 2095-101, Dec. 2011.
- BONA, A. C.; TWERDOCHILB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment

of the capsid/premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, N. 3, P. 297-300, Jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Balanco Dengue: Semana Epidemiológica 26 de junho a 02 de julho de 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_072011.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Saúde Brasil 2009: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 368 p. cap. 9.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009, 160 p.

BRINTON, M. A. The molecular biology of West Nile virus: A new invader of the western hemisphere. **Annual Review Microbiology**, Atlanta (USA), v. 56, p. 371-402, 2002.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. et al. (editors). *Fields Virology*. 4th. ed. Philadelphia: Lippincot, Williams & Wilkins, 2001, v. 1, p. 1043-1125.

BURKE, D. S et al. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 1, p. 172-180, Jan. 1988.

CANEIRO, A. R. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 805-812, Sep. 2012.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, Oct. 1990.

CARRILLO-VALENZO, E. et al. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. **Archives of Virology**, Wien, v. 155, n. 9, p. 1401-1412, Sep. 2010.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue homepage. Clinical guidance. 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/clinicalLab/clinical.html>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

CHAKRAVARTI, A.; ARORA, R; LUXEMBURGER, C. Fifty years of dengue in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v. 106, n. 5, p. 273-282, May. 2012.

- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 155-166, Jul. 2006.
- CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 8, Aug. 1997.
- CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 70, n. 12, p. 8765-8772, Dec. 1996.
- CHIN, J. F.; CHU, J. J.; NG, M. L. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. **Microbes and infection**, Paris, v. 9, n. 1, p. 1-6, Jan. 2007.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 23, p. 11418-31, dec. 2006.
- CORDEIRO, M. T. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 6, p. 605-611, nov./dez. 2007.
- COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue viruses serotypes. **Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 2, p. 309-314, Mar. 2012.
- CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 7769-7773, Aug. 2001.
- DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 6, p. 390-398, Dec. 2004.
- DESPRÉS, P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, New York, v. 196, n. 1, p. 209-219. Sep. 1993.
- DOS SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology jornal**, London, v. 8, p. 387, 2011.
- DOS SANTOS, C. L. et al. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 11-16, Jan./Feb. 2003.
- DRUMOND, B. P. et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of virology**, Wien, v. 157, n. 11, Nov. 2012.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; XIE, W. BEAUTI - Bayesian Evolutionary Analysis Utility Version v1.6.1 (2002-2010). [Desenvolvido por BEAST Software]. 2002-2010. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 214, p. 1-8, Nov. 2007.

ENDY, T. P. et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 156, n. 1, p. 40-51, jul. 2002.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T. et al. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 64, n. 4, p. 469-72, Oct. 2004.

FOSTER, J. E. et al. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the caribbean. **Virology**, New York, v. 306, n. 1, p. 126-34, Feb. 2003.

GONÇALVES, D. et al. Immunocompetent mice model for dengue virus infection. **The Scientific World Journal**, Boyton Beach, v. 2012, p. 525947, 2012.

GONÇALVEZ, A. P. et al. Monoclonal antibody-mediated enhancement of Dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 22, p. 9422-9427, May. 2007.

GONÇALVEZ, A. P. et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, New York, v. 303, n. 1, p. 110-119, Nov. 2002.

GUBLER, D. J. Cities spawn epidemic dengue viruses. **Nature Medicine**, New York, v. 10, n. 2, p. 129-30, Feb. 2004.

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

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

GUBLER, D. J. et al. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 581-589, May. 1978.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 12 Suppl., p. S7-16, Dec. 2010

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar. 2004.

GUZMÁN, M. G. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington DC, v. 11, n. 4, p. 223-227, Apr. 2002.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus–mosquito interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, 2008.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, New York, v. 60, p. 421-467, 2003.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, New York, v. 239, n. 4839, p. 476-481, Jan. 1988.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 146, n. 1, p. 201-217, Jul. 1977.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct. 1990.

HOLMES, E. C. RNA virus genomics: a world of possibilities. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 119, n. 9, p. 2488-2495, Sep. 2009.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 19-28, May. 2003.

HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p.74-7, Feb. 2000.

HUERTA, V. et al. Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. **Virus Research**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 225-234, Nov. 2008.

JESSIE, K. et al. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 8, p. 1411-1418, Apr. 2004.

KAKKAR, M. Dengue fever is massively under-reported in India, hampering our response. **British Medical Journal**, London, v. 345, p. e8574, Dec. 2012.

KLIKS, S. C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 38, n. 2, p. 411-419, Marc. 1988.

KLUNGTHONG, C. et al. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 154, n. 1-2, p. 175-181, Dec. 2008.

KLUNGTHONG, C. et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. **Virology**, New York, v. 329, n. 1, p. 168-179, Nov. 2004.

KNIPE, D. M. et al. **Fields Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, v. 1, 2001.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 5, p. 717-725, Mar. 2002.

KUKRETI, H. et al. Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. **Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 1-9.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, London, v. 9, n. 4, p. 299-306, Jul. 2008.

KURANE, I. et al. T-cell responses to dengue virus in humans. **Tropical medicine and health**, Nagasaki, v. 39 (4 Suppl), p. 45-51, Dec. 2011.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 5-6, p. 329-340, Sep. 2007.

LAI, C. Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6631-6643, Jul. 2008.

LEMEY, P. et al. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e1000520, Sep. 2009.

LEWIS, J. A. et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, New York, v. 197, n. 1, p. 216-224, Nov. 1993.

LI, X. Q. et al. Evaluation and analysis of dengue virus enhancing and neutralizing activities using simple high-throughput assays. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 14, p. 6503-6511, Jul. 2013.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, New York, v. 59, p. 23-61, 2003.

- LU, P. et al. Recombinant envelope glycoprotein domain III of dengue virus inhibit virus infection. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, Beijing, v. 22, n. 3, p. 177-179, Jun. 2008.
- MAHER-STURGESS, S. L. et al. Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. **Virology Journal**, London, v. 5, n. 16. Jan. 2008.
- MALAVIGE, G. N. et al. Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e50387, 2012.
- MANDL, C. W. et al. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, n. 20, p. 9601-9609, Oct. 2000.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, Whashington DC, v. 22, n. 4, p. 564-581, Oct. 2009.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 225, p. 300-313, Oct 2008.
- MENDEZ, J. A. et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, London, v. 7, n. 226, p. 1-12.
- MINAS GERAIS. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Informe epidemiológico – Dengue 13/11/13**. 2013. Disponível em: <
<http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/5307-informe-epidemiologico-da-dengue-13-11-13> >. Acesso em: 27 nov. 2013.
- MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, Jun. 2003.
- MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, n. 6, p. 3821-3829, Mar. 2006.
- MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 7, p. 921-927, Jul. 2003.
- MOTA, J. et al. Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses. **Salud pública de México**, Mexico, v. 44, n. 3, p. 228-236, May./Jun. 2002.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan. 2005.

NAYAK, V. et al. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 83, n. 9, p. 4338-4344, May. 2009.

NIELSEN, D. G. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. **Virology Journal**, London, v. 6, n. 211, p. 1-7, Nov. 2009.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue Virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 9, p. 1376-1381, Sept. 2005.

OISHI, K. et al. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 125-133, Jun. 2007.

OSANAI, C. H. **A epidemia de dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981-1982**. 1984. 127f. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1984.

PAES, M. V. et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, Baltimore, v. 89, n. 10, p. 1140-1151, Oct. 2009.

PAES, M. V. et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. **Virology**, New York, v. 338, n. 2, p. 236-246, Aug. 2005.

PAHO – Organização Pan-Americana de Saúde. **Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion)**. Washington: Pan American Health Organization, 2008. Disponível em: <<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>>. Acesso em: 07 mai. 2013.

POSADA, D.; CRANDAL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

QI, R.; ZHANG, L.; CHI, C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, China, v. 40, n. 2, p. 91-101, Feb. 2008.

RAGHWANI, J. et al. Endemic dengue associated with the co-circulation of multiple viral lineages and localized density-dependent transmission. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 6, e1002064, Jun. 2011.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. Tracer: MCMC Trace Analysis Tool Version v1.5.0 (2003-2009). [Desenvolvido por BEAST Software]. 2003-2009. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. TreeAnnotator v1.6.1 (2002-2010). [Desenvolvido por BEAST Software]. 2002-2010. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

RAMBAUT, A. Tree Figure Drawing Tool Version 1.3.1 (2006-2009). [Desenvolvido por BEAST Software]. 2006-2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 20 abr. 2011.

REY, F.A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, London, v. 375, n. 6529, p. 291-298, May. 1995.

RICO-HESSE R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 338, p. 45-55, 2010.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315-341, New York, 2003.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v. 230, n. 2, p. 244-251, Apr. 1997.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, New York, v. 174, n. 2, p. 479-493, Feb. 1990.

RIGAU-PEREZ, J. G. et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 971-977, Sep. 1998.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, Aug. 2010.

ROSEN, L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. Suppl., p. 40-42, Oct. 1986.

ROSS, T. M. Dengue vírus. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 149-60, mar. 2010.

RUDNICK, A. The ecology of the dengue virus complex in Peninsular Malaysia. In: PANG, T.; PATHMANATHAN, R. (editors). **Proceedings of the International Conference on dengue/DHF**. Kuala Lumpur (Malaysia): University of Malaya Press, 1984.

RUSSELL, P. K.; NISALAK, A. Dengue vírus identification by the plaque reduction neutralization test. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 99, n. 2, p. 291-296, Aug. 1967.

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, New York, v. 37, n. 5, p. 507-513, May. 2005.

SHU, P. Y et al. Potential Application of Nonstructural Protein NS1 Serotype-Specific Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Seroepidemiologic Study of Dengue Virus Infection: Correlation of Results with Those of the Plaque

Reduction Neutralization Test. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 5, May. 2002, p. 1840–1844.

SIQUEIRA-JR., J. B. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 1, p. 48-53, Jan. 2005.

SITTISOMBUT, N. et al. Possible occurrence of a genetic bottleneck in dengue serotype 2 viruses between the 1980 and 1987 epidemic seasons in Bangkok, Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 100-108, Jul. 1997.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S. L. Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 67, n. 6, p. 618-625, Jun. 2008.

STEPHENS, H. A. et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, n. 4, p. 309-318, Oct. 2002.

STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 83, n. 4, p. 308-314, Apr. 2005.

STIASNY, K. et al. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**, Wien, v. 41, n. 5, p. 1159-1163, Nov. 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct. 2011.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, Jul. 2004.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, Sept./Oct. 2005.

TEIXEIRA, M. G; BARRETO; GUERRA I. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov. 1994.

THU, H.M., et al. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 4, p. 593-597, Apr. 2004.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 1, p. 122-129, Jan. 2003.

TWIDDY, S. S.; WOELK, C. H.; HOLMES, E. C. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. **The Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 7, p. 1679-1689, Jul. 2002.

VASILAKIS, N.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Sylvatic dengue virus type 2 activity in humans, Nigeria, 1966. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 3, p. 502-504, Mar. 2008.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 322-30, aug. 1997.

WAHALA, W. M. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, New York, v. 392, n. 1, p. 103-113, Sep. 2009.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 74, n. 7, p. 3227-3234, Apr. 2000.

WATTS, D. M. et al. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 143-152, Jan. 1987.

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**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 523-540, Jul. 2009.

WILDER-SMITH, A. et al. Dengue Tools: innovative tools and strategies for the surveillance and control of dengue. **Global Health Action**, Sweden, v. 5, n. 17273, p. 1-9, Mar. 2012.

WITTKER, V. et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, New York, v. 30, n. 1, p. 148-156, Sep. 2002.

WHO – World Health Organization. **Handbook for clinical management of dengue**. Geneva: WHO, 2012, 111p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/76887/1/9789241504713_eng.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2013.

WHO. **Dengue**: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition. Geneva: WHO. Cap. 2, p.25-54, 2009.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: Early recognition, diagnosis and hospital management – an audiovisual guide for health-care workers responding to outbreaks. **Weekly Epidemiological Record**, v. 81, n. 38, p. 362-3, sep. 2006.

WHO. **Guidelines for treatment of dengue fever/dengue haemorrhagic fever in small hospitals**. Regional Office for South-East Asia. New Delhi: WHO, 29p., 1999.

WHO. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization. 1997, cap 2, p. 2-23. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/012-23.pdf>>. Acesso em 01 de mai. 2013.

WU, S. J. L. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, New York, v. 6, n. 7, 816-820, Jul. 2000.

YU, I. M. et al. Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. **Science**, Washington DC, v. 319, n. 5871, 1834-1837, Mar. 2008

ZHANG, C. et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 24, p. 123-130, Dec. 2005.

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, London, v. 22, n. 11, p. 2604-2613, Jun. 2003.

APÊNDICE A – Alinhamento do fragmento NS5 com outros isolados de DENV-1 utilizando-se a ferramenta BLASTN para identificação de sequencias homólogas

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - YXJGPJGU01R](#)

[Formatting options](#)

[Download](#)

[Blast report description](#)

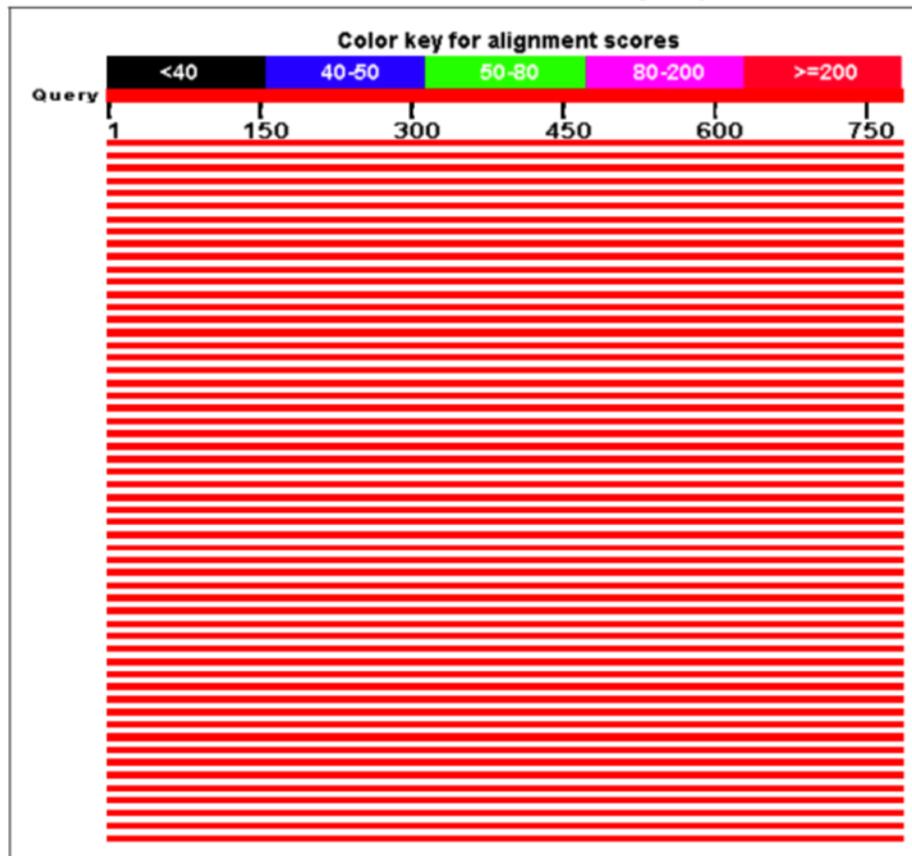
NS5 Amplificado Alfenas 2012

Query ID |cl|52917
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 789

Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.2.28+

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Dengue virus 1 isolate DENV-1/VE/BID-V2423/2004, complete genome

Sequence ID: [gb|JN819425.1](#) Length: 10485 Number of Matches: 1Range 1: 8200 to 8988 [GenBank](#) [Graphics](#)[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1441 bits(780)	0.0	786/789(99%)	0/789(0%)	Plus/Minus	
Query	1	TCCGAGCCACATGTACCATATTGCACGACTTCCTTTTGCCTTTCCAAACTCTCCTAATTT			60
Sbjct	8988	TCCCAGCCACATGTACCATATTGCACGACTTCCTTTTGCCTTTCCAAACTCTCCTAATTT			8929
Query	61	TTTCTCTCTCTTCCCCATCATGTTGTAGACACACGTGGCACATTTTCCCTGTTTATGAAG			120
Sbjct	8928	TTTCTCTCTCTTCCCCATCATGTTGTAGACACACGTGGCACATTTTCCCTGTTTATGAAG			8869
Query	121	CTCCCTCTCTCTGTGCACAAGATCCCAAAACCTTTTCGTCTTCCACTGCTTCTTTTGCTGA			180
Sbjct	8868	CTCCCTCTCTCTGTGCACAAGATCCCAAAACCTTTTCGTCTTCCACTGCTTCTTTTGCTGA			8809
Query	181	GTTCCATTGGTTTTTCATCAACGAACACCGCTCCTATTGCCGCGTTTGACCTAACCTTTCT			240
Sbjct	8808	GTTCCATTGGTTTTTCATCAACGAACACTGCTCCTATTGCCGCGTTTGACCTAACCTTTCT			8749
Query	241	TGTGAACTCCTCTCTTGTGCAGATTCTGGGTTTTTTGTTTCTGGAAAGGAAACCCATAA			300
Sbjct	8748	TGTGAACTCCTCTCTTGTGCAGATTCTGGGTTTTTTGTTTCTGGAAAGGAAACCCATAA			8689
Query	301	CCACTTGGCTGTCACTCCATAATCTGCGTTGTGCCTCGTTTTGCTCTTGGTGTGCGCGT			360
Sbjct	8688	CCACTTGGCTGTCACTCCATAATCTGTTGTGCCTCGTTTTGCTCTTGGTGTGCGCGT			8629
Query	361	GTCAACTTTCTCTTTAAACACTCTCTGTTGTCCAAAGGGTGTGGTATCAGTCATAGCTAT			420
Sbjct	8628	GTCAACTTTCTCTTTAAACACTCTCTGTTGTCCAAAGGGTGTGGTATCAGTCATAGCTAT			8569
Query	421	TTGTGTGACCATGGGGATAACATCCCATGGTTTTGTGAGCAATCTCACCCTCCATTAC			480
Sbjct	8568	TTGTGTGACCATGGGGATAACATCCCATGGTTTTGTGAGCAATCTCACCCTCCATTAC			8509
Query	481	CATAGATGAGGCTGATCCTGATGGCTTGACCTCATATGATCCATGATAGGCCCATGTTTT			540
Sbjct	8508	CATAGATGAGGCTGATCCTGATGGCTTGACCTCATATGATCCATGATAGGCCCATGTTTT			8449
Query	541	GTATGGATTGTCCTCATCATAATGCCATGTTGACTTGTGTTCAATTTTTATATTCTCTAT			600
Sbjct	8448	GTATGGATTGTCCTCATCATAATGCCATGTTGACTTGTGTTCAATTTTTATATTCTCTAT			8389
Query	601	CCTCTGGCCAATGATATCTAGGTTGGCTACCTCTGGTTCCACTGCCACATGTCTTGTTC			660
Sbjct	8388	CCTCTGGCCAATGATATCTAGGTTGGCTACCTCTGGTTCCACTGCCACATGTCTTGTTC			8329
Query	661	AGCGCCTAAGTCCACGCTCTTTTCATATGTTGGCTTCTGTGAGCCATTGTGAATCGGTT			720
Sbjct	8328	AGCGCCTAAGTCCACGCTCTTTTCATATGTTGGCTTCTGTGAGCCATTGTGAATCGGTT			8269
Query	721	CAGTAACATTCTGGATGTCATGTTCACTGCCGACACAATGTTTCTGTTCCACATGAAAC			780
Sbjct	8268	CAGTAACATTCTGGATGTCATGTTCACTGCCGACACAATGTTTCTGTTCCACATGAAAC			8209
Query	781	CCAATACAT	789		
Sbjct	8208	CCAATACAT	8200		

Fonte: do autor.

APÊNDICE B – Base de dados das sequências dos vírus DENV-1 coletados no GenBank, utilizados no estudo

Nº de acesso	Isolado	País	Ano
GQ868562.1	CO/BID-V3380/2005	Colômbia	2005
FJ850093.1	BR/BID-V2401/2008	Brasil	2008
FJ639818.1	VE/BID-V2258/2006	Venezuela	2006
FJ639813.1	VE/BID-V2251/2005	Venezuela	2005
FJ639820.1	VE/BID-V2260/2006	Venezuela	2006
FJ882579.1	VE/BID-V2465/2007	Venezuela	2007
FJ639823.1	VE/BID-V2263/2006	Venezuela	2006
FJ744701.1	VE/BID-V2237/2004	Venezuela	2004
FJ639808.1	VE/BID-V2245/2005	Venezuela	2005
ACO06204.	VE/BID-V2461/2007	Venezuela	2007
GQ868567.1	CO/BID-V3387/2007	Colômbia	2007
GQ868568.1	CO/BID-V3388/2007	Colômbia	2007
GQ868569.1	CO/BID-V3390/2007	Colômbia	2007
GU131949.1	CO/BID-V3383/2006	Colômbia	2006
GQ868566.1	CO/BID-V3386/2007	Colômbia	2007
GQ868560.1	CO/BID-V3377/1998	Colômbia	1998
GU131837.1	VE/BID-V3558/2005	Venezuela	2005
FJ639740.1	VE/BID-V2168/1998	Venezuela	1998
GQ868561.1	CO/BID-V3378/1999	Colômbia	1999
FJ639743.1	VE/BID-V2171/1999	Venezuela	1999
FJ639743.1	VE/BID-V2171/1999	Venezuela	1999
GU131948.1	CO/BID-V3379/2001	Colômbia	2001
GU131834.1	VE/BID-V3550/2001	Venezuela	2001
FJ639821.1	VE/BID-V2261/2006	Venezuela	2006
GU056029.1	VE/BID-V3540/1997	Venezuela	1997
GU131840.1	VE/BID-V3573/2007	Venezuela	2007
FJ850102.1	VE/BID-V2464/2007	Venezuela	2007
FJ850103.1	VE/BID-V2468/2008	Venezuela	2008
HQ696612.1	15_2010/BR/RJ/2010	Brasil	2010
JN122281.1	0122_2011/BR/RJ/2011	Brasil	2011
GU131835.1	VE/BID-V3552/2004	Venezuela	2004
FJ639741.1	VE/BID-V2169/1998	Venezuela	1998
FJ639741.1	VE/BID-V2169/1998	Venezuela	1998
GU131833.1	VE/BID-V3549/2000	Venezuela	2000
GQ199859.1	NI/BID-V2652/2008	Nicaragua	2008
JF937635.1	NI/BID-V5504/2009	Nicaragua	2009
FJ639735.1	VE/BID-V2162/1997	Venezuela	1997
GU056032.1	VE/BID-V3544/1998	Venezuela	1998
JN122280.1	31807/BR/RJ/1986	Brasil	1986
HQ026760.1	31768/BR/RJ/1986	Brasil	1986
FJ850073.1	BR/BID-V2378/2001	Brasil	2001
AY277665.1	ARG0028	Argentina	
AF311958.1	BR/97-233	Brasil	
AF311957.1	BR/97-409	Brasil	
AF311956.1	BR/97-111	Brasil	
AF226685.2	Den1BR/90	Brasil	1990
FJ410188.1	US/BID-V2139/1996	Estados Unidos: Porto Rico	1996
FJ205874.1	US/BID-V1743/1995	Estados Unidos: Porto Rico	1995
DQ285559.1	Reunion 191/04	Reunion	2004
EU081258.1	D1/SG/05K4147DK1/2005	Singapura	2005
GQ868601.1	VG/BID-V2937/1985	British Virgin Islands	1985
FJ850075.1	BR/BID-V2381/2002	Brasil	2002
FJ850070.1	BR/BID-V2374/2000	Brasil	2000
FJ850090.1	BR/BID-V2398/2007	Brasil	2007

FJ850084.1	BR/BID-V2392/2005	Brasil	2005
FJ850077.1	BR/BID-V2384/2003	Brasil	2003
FJ850071.1	BR/BID-V2375/2000	Brasil	2000
FJ850081.1	BR/BID-V2389/2004	Brasil	2004
FJ850087.1	BR/BID-V2395/2006	Brasil	2006
GU131863.1	BR/BID-V3490/2008	Brasil	2008
HM043709.1	55/2009ES/2009	Brasil	2009
HQ026762.1	19_2010/BR/RJ/2010	Brasil	2010
HQ696613.1	20_2010/BR/RJ/2010	Brasil	2010
HQ696614.1	188_2010/BR/RJ/2010	Brasil	2010
HM043710.1	1435/2009RJ	Brasil	2009
HQ026761.1	1433_09/BR/RJ/2009	Brasil	2009
AY762084.1	Singapore 8114/93	Singapura	
AY722801.1	D1.Myanmar.40568/76	Myanmar	1976
AY713473.1	D1.Myanmar.40553/71	Myanmar	1971
EU863650.1	CHI3336-02	Chile	2002
DQ672563.1	HawO3758	Estados Unidos: Hawaii	2001
EU848545.1	US/Hawaii/1944	Estados Unidos: Hawaii	1944
EU081262.2	SG/05K4173DK1/2005	Singapura	2005
FJ639797.1	VE/BID-V2230/2004	Venezuela	2004
GQ868570.1	DENV-1/CO/BID-V3391/2008	Colômbia	2008
FJ639814.1	VE/BID-V2254/2005	Venezuela	2005
EU596501.1	NI/BID-V653/2004	Nicaragua	2004
FJ024485.1	NI/BID-V629/2005	Nicaragua	2005
GQ868530.1	MX/BID-V3746/2008	México	2008
FJ547088.1	NI/BID-V2330/2008	Nicaragua	2008
FJ024479.1	NI/BID-V642/2006	Nicaragua	2006
FJ182002.1	NI/BID-V646/2005	Nicaragua	2005

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO EM PACIENTES COM DENGUE CLÁSSICA E FEBRE HEMORRÁGICA DO DENGUE

Pesquisador: Luís Gustavo da Silva Fagundes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08410912.9.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 276.660

Data da Relatoria: 05/02/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado em linguagem clara e objetiva. Constam os critérios de inclusão e exclusão dos voluntários. A metodologia laboratorial é pertinente aos objetivos propostos.

Objetivo da Pesquisa:

Traz como proposta a identificação de perfis diferenciais de metilação do DNA, a serem usados como biomarcadores associados a diferentes manifestações clínicas da Dengue (FD vs FHD). A metodologia laboratorial a ser adotada será MS-AP-PCR (Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O DNA genômico dos sujeitos da pesquisa será obtido de amostras de sangue proveniente de punção venosa. Embora mínimos, existem os riscos inerentes a tal procedimento.

Os benefícios advindos do estudo poderão atingir uma parcela considerável da população, uma vez que os biomarcadores poderão facilitar a execução de testes rápidos e precisos para o diagnóstico precoce da dengue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa proposta é parte integrante das exigências do curso de Mestrado em Biociências

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 276.660

Aplicadas à Saúde da Unifal-MG, no qual o pesquisador responsável é discente bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. O enfoque será dado ao estudo de possíveis biomarcadores de DNA associados a diferentes manifestações clínicas da dengue.

Como esta patologia ocorre predominantemente em locais com clima temperado, em regiões tropicais e subtropicais, e tem alta incidência associada às más condições de higiene e urbanização, constitui-se estudo de grande interesse para controlar a morbidade e mortalidade da patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE adequado

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atende a Resolução

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 20 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria Betânia Tinti de Andrade
(Coordenador)

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde



CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: **ANÁLISE DO PERFIL DIFERENCIAL DE METILAÇÃO EM PACIENTES COM DENGUE CLÁSSICA E FEBRE HEMORRÁGICA DO DENGUE**

Pesquisador Responsável: Luís Gustavo da Silva Fagundes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG

Telefones para contato: (35) 32922489 - (35) 88176566

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Análise do perfil diferencial de metilação em pacientes com dengue clássica e febre hemorrágica do dengue”, de responsabilidade do pesquisador Luís Gustavo da Silva Fagundes. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de Alfenas, com o certificado **CAAE**: 08410912.9.0000.5142.

Este estudo visa identificar regiões diferenciais de metilação em indivíduos susceptíveis para desenvolverem as formas graves do dengue, daqueles que apresentam apenas manifestações brandas da doença, e assim, contribuir para a elucidação de parte do processo que envolve a interação parasito/hospedeiro nos casos de dengue. Para tanto, colher-se-á sangue periférico de pessoas, após autorização dos mesmos, que tiveram dengue clássica e pessoas que tiveram febre hemorrágica do dengue. Os possíveis biomarcadores identificados neste projeto poderão nortear o desenvolvimento de um teste diagnóstico capaz de identificar com exatidão e rapidez pacientes com pré-disposição ao desenvolvimento da febre hemorrágica do dengue. De posse desta informação (susceptível ou não ao desenvolvimento da Febre Hemorrágica do Dengue) a equipe médica poderá diagnosticar com mais precisão a forma mais grave da dengue e, assim, prevenir ou intervir corretamente no quadro clínico, evitando-se possíveis óbitos. Os prováveis participantes deste estudo serão esclarecidos, antes da coleta do material (sangue), e será disponibilizado um contato do pesquisador, de modo que a pessoa possa desistir a qualquer momento de participar deste estudo. Portanto, a participação se dará de forma *voluntária*, com confidencialidade das informações geradas e privacidade do sujeito da pesquisa.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Alfenas, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Testemunha

ANEXO 3 - Símbolos e siglas dos aminoácidos

Letra	Sigla	Nomes dos aminoácidos	Caráter
A	Ala	alanina	Não polar
C	Cis	cisteína	Não polar
D	Asp	ácido aspártico	Ácido
E	Glu	ácido glutâmico	Ácido
F	Fen	fenilalanina	Não polar
G	Gli	glicina	Não polar
H	His	histidina	Básico
I	Ile	isoleucina	Não polar
K	Lis	lisina	Básico
L	Leu	leucina	Não polar
M	Met	metionina	Não polar
N	Asn	asparagina	Polar
P	Pro	prolina	Não polar
Q	Gln	glutamina	Polar
R	Arg	arginina	Básico
S	Ser	serina	Polar
T	Tre	treonina	Polar
V	Val	valina	Não polar
W	Trp	triptofano	Não polar
Y	Tir	tirosina	Polar

ANEXO 4 – Código genético padrão

Primeira base	Segunda base								Terceira base
	U		C		A		G		
U	UUU	Fen	UCU	Ser	UAU	Tir	UGU	Cis	U C A G
	UUC	Fen	UCC	Ser	UAC	Tir	UGC	Cis	
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Terminação	UGA	Terminação	
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Terminação	UGC	Trp	
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U C A G
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
A	AUU	Ile	ACU	Tre	AAU	Asn	AGU	Ser	U C A G
	AUC	Ile	ACC	Tre	AAC	Asn	AGC	Ser	
	AUA	Ile	ACA	Tre	AAA	Lis	AGA	Arg	
	AUG*	Met	ACG	Tre	AAG	Lis	AGG	Arg	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gli	U C A G
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gli	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gli	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gli	