

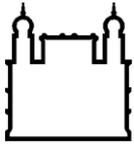
Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**VINTE E CINCO ANOS DE DENV-1 NO BRASIL:
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS ISOLADAS
ENTRE 1986 E 2011**

FERNANDA DE BRUYCKER NOGUEIRA

Rio de Janeiro
Novembro de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

FERNANDA DE BRUYCKER NOGUEIRA

Vinte e cinco anos de DENV-1 no Brasil: Epidemiologia Molecular de Cepas Isoladas entre 1986 e 2011

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira

RIO DE JANEIRO
Novembro de 2013

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

N778 Nogueira, Fernanda de Bruycker

Vinte e cinco anos de DENV-1 no Brasil: epidemiologia molecular de cepas isoladas entre 1986 e 2011 / Fernanda de Bruycker Nogueira. – Rio de Janeiro, 2013.

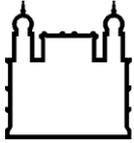
xxii, 135 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 90-101

1. DENV-1. 2. Brasil. 3. Epidemiologia Molecular. 4. Genótipo V. 5. Linhagens. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: FERNANDA DE BRUYCKER NOGUEIRA

**VINTE E CINCO ANOS DE DENV-1 NO BRASIL: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR
DE CEPAS ISOLADAS ENTRE 1986 E 2011**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Rita Maria Ribeiro Nogueira

Aprovada em: 29/11/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Edson Elias da Silva – IOC/FIOCRUZ - Presidente

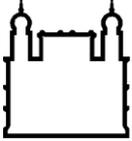
Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo - UFRN/RN

Prof. Dr. Davis Fernandes Ferreira – UFRJ/RJ

Prof. Dr. Marcos César Lima de Mendonça – IOC/FIOCRUZ

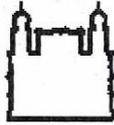
Prof. Dr. Fernando Couto Motta – IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que Fernanda de Bruycker Nogueira, sob orientação de Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira, foi aprovada em 29/11/2013, em sua defesa de dissertação de mestrado intitulada: **“Vinte e cinco anos de DENV-1 no Brasil: Epidemiologia Molecular de Cepas Isoladas entre 1986 e 2011”**, área de concentração: Biologia Celular e Molecular, na linha de pesquisa: Caracterização bioquímica, molecular, genética ou estrutural de agentes infecciosos e seus hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Edson Elias da Silva – IOC/Fiocruz (presidente), Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo – UFRN e Dr. Davis Fernandes Ferreira – UFRJ; e como suplentes Dr. Marcos César Lima de Mendonça – IOC/Fiocruz e Dr. Fernando Couto Motta – IOC/Fiocruz.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria n° 694, de 13 de junho de 1995, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 6 (seis) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, a **liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa dura (2 cópias), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2013.


Coordenação do Programa de Pós-graduação
Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz

*Este trabalho é dedicado:
Ao meu grandioso Deus.
Aos meus pais Fernando e Selma Nogueira.
A Vinícius, meu irmão.
A Moacir, meu futuro esposo.*

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dr^a Rita Maria Ribeiro Nogueira, por ter proporcionado a minha inserção no mundo da pesquisa me acolhendo no Laboratório de Flavivírus durante a Iniciação Científica, e ter acreditado no meu potencial e incentivado o meu crescimento profissional. Obrigada pela paciência, carinho, compreensão e palavras sábias que fizeram parte do êmbolo propulsor na minha carreira.

À Dr^a Flávia Barreto dos Santos, pela amizade, dedicação, preocupação, companheirismo, incentivo, por sempre acreditar no potencial dos alunos (seus ou não) e estar sempre disposta a ajudar. Muito obrigada por compartilhar seu conhecimento sobre biologia molecular e auxiliar na orientação dos projetos relacionados à caracterização molecular e filogenia.

À Dr^a Ana Maria Bispo de Filippis, pelo apoio, incentivo e ter sido a minha porta de entrada no laboratório durante a entrevista de estágio. Obrigada por confiar em mim!

Ao Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr (*in memoriam*) pelo eterno carinho com a equipe, desde pessoal de apoio até pesquisadores. Por sua simplicidade, simpatia, grande sabedoria e acreditar no potencial dos alunos. Muito obrigada pelos inúmeros esclarecimentos sobre cultivo celular e isolamento viral.

À grande família Flavivirus pelo apoio e agradável companhia: Dinair Couto (Assistente de Pesquisa); Eliane Saraiva, Simone Sampaio e Marcos César Mendonça (Tecnologistas); Alex Pauvolid (Doutor); Jaqueline Bastos Santos Simões (Bióloga); Nieli Rodrigues da Costa Faria, Monique da Rocha Queiroz Lima, Manoela Heringer e Bianca Di Santis (Doutorandas); Priscila Conrado Guerra Nunes (Mestre); Thaís Chouin Carneiro (Mestranda); Cintia Damasceno e Liliane Conteville (Iniciação Científica); José da Costa Farias Filho, Leda Maria dos Santos e Ana Lúcia Bastos (Técnicos), e Solange Conceição (Secretária). Muito obrigada pela contribuição de todos!

Aos amigos da Entomologia, Dr^a Márcia Gonçalves de Castro (Pesquisadora) e Anielly Alves Ferreira (Técnica em Biologia Parasitária) pela torcida desde a preparação para a seleção do mestrado até agora, a etapa final.

Àqueles que um dia fizeram parte da família Flavivírus: Joyce Pereira (Assessora técnica OPAS na CGLAB); Juliana Eymara Barbosa (Doutoranda da UFF); Francisco Lima (Técnico em Biologia Parasitária); Gerusa Fernandes (Farmacêutica da UFJF); Gleicy Amorim (Doutoranda); Denilde Ferreira (Secretária Executiva); Clarice Rodrigues e Carla Santos (Biomédicas, ex-bolsistas de Iniciação Científica).

Ao Dr. Josélio Galvão de Araújo (Professor Adjunto da UFRN) pelo desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e por aceitar o convite para ser o revisor e membro da banca avaliadora deste trabalho.

A todos os membros da banca por terem aceitado o convite.

À coordenação da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC/FIOCRUZ, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de estudo.

À plataforma de Sequenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ, pela contribuição na eletroforese capilar das amostras analisadas e suporte técnico, em especial às funcionárias Aline dos Santos Moreira e Renata Almeida de Sá.

Ao Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo (LVRS), chefia Dr^a Marilda Siqueira, por permitir, na falta da plataforma PDTIS/FIOCRUZ, o uso do seqüenciador automático do laboratório.

Aos amigos dos Laboratórios de Imunologia Viral (LIV) e Hantavíroses e Rickettsioses (LHR) pelo apoio, e suporte técnico quando necessário.

Ao Dr. Tatsuya Nagata pela ajuda com o programa de recombinação.

A Alvaro Fajardo, pelo auxílio nos programas para modelagem de proteína.

Aos amigos conquistados durante o mestrado em cada disciplina realizada. Obrigada pelos risos e companheirismo. Aos coordenadores de cada disciplina cursada. Nada teria conquistado sozinha.

Em especial aos entes queridos:

À minha amada família Nogueira e Machado, que sem ressalva, tios e primos torceram e torcem pelas minhas conquistas. Obrigada por compreenderem minha ausência em diversos momentos que não pude compartilhar com vocês devido à minha dedicação aos estudos, desde a Universidade.

Aos meus avós paternos, Francisco Nogueira Filho e Carmen Lúcia de Bruycker Nogueira pelo incentivo, apoio e oração. E aos meus avós maternos Maria Amélia Correa Machado (*in memorian*) e Permíndio de Souza Machado (*in memorian*), pelo eterno carinho.

Aos meus exemplos de vida, Fernando de Bruycker Nogueira, meu pai, e minha mãe Selma de Souza Machado Nogueira, que sempre apostaram, apoiaram, e dedicaram suas vidas para a construção da minha e do meu irmão. Que se enchem de orgulho pelos meus objetivos alcançados, seja ele qual for. Ao meu irmão Vinícius de Bruycker Nogueira, pelo apoio, amizade e por sempre me fazer rir com sua frase “trabalhar com quatro letras é fácil, quero ver com o alfabeto inteiro”. Sei que posso contar sempre com todos. Minha família, meu orgulho, amo vocês!

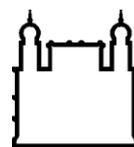
À Stefany, minha cunhada, por lembrar que doce, chocolate e biscoito servem de combustível para minha mente. Muito obrigada pela força e torcida!

Ao meu amado Moacir, pelo estímulo desde a pré-seleção tensa do mestrado até a preparação para a defesa da dissertação. Obrigada pelo companheirismo, paciência, calma, muita calma, amor e dedicação. As muitas ausências serão recompensadas.

A Deus, autor e consumidor da minha fé! Sem Ele nada seria e teria realizado. Obrigada Senhor por me sustentar em todos os momentos, sem exceção.

*“Agora estou prestes a ir pelo caminho de toda a terra.
Vocês sabem, lá no fundo do coração e da alma,
que nenhuma das boas promessas que o Senhor,
o seu Deus, fez deixou de cumprir-se.
Todas se cumpriram; nenhuma delas falhou”*

*Josué 23:14
Bíblia Sagrada*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

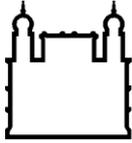
VINTE E CINCO ANOS DE DENV-1 NO BRASIL: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE CEPAS ISOLADAS ENTRE 1986 E 2011

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Fernanda de Bruycker Nogueira

Este estudo apresenta a filogenia e caracterização molecular baseados na análise do gene do envelope (E) (1.485 nucleotídeos) dos DENV-1 (n=48) e na região codificante completa (10.176 nucleotídeos) de seis representantes dentre as 48 amostras analisadas, isolados durante as epidemias ocorridas desde a introdução do sorotipo em 1986 até 2011. Possíveis eventos de recombinação genômica também foram analisados. Os resultados baseados na análise do gene E demonstraram que os DENV-1 isolados dos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Alagoas, Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte pertencem ao genótipo V (América/África), mas agrupam-se em *clades* distintos. Três grupos foram identificados, um datando entre 1986-2002 (linhagem 1a), um segundo grupo representado por vírus isolados entre 2009 e 2011 e uma cepa isolada representativa do ano de 2002 (linhagem 2) e um grupo de cepas isoladas em 2010 e 2011 (linhagem 1b). A linhagem 2 apresentou um alto suporte de *bootstrap* garantindo a sua separação das outras linhagens. As linhagens 1a e 1b, apesar de se agruparem em ramos distintos, foram caracterizadas no mesmo grupo, com *bootstrap* acima de 75%. Além disso, as linhagens 1a e 1b foram mais relacionadas com as cepas americanas e a linhagem 2 com as cepas asiáticas. As substituições de aminoácidos (aa) foram observadas nos ectodomínios I e III da proteína E e foram associadas à separação das linhagens. Uma substituição em E₂₉₇ diferenciou a linhagem 1a das linhagens 1b e 2. As alterações observadas em E₃₃₈, E₃₉₄ (ectodomínio III), E₄₂₈ e E₄₃₀ (região “stem”) diferenciaram as linhagens 1a, 1b e 2. A análise da região codificante completa apresentou um elevado número de substituições de aa (n=82), distribuídas entre as seis cepas estudadas, no entanto a cepa representante da linhagem 2 apresentou aproximadamente 50% do total observado. Com exceção do gene C, todos os outros genes analisados (prM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) permitiram a classificação genotípica dos DENV-1. Os genes NS3 e NS5 permitiram a separação das linhagens 1 e 2, no entanto, apenas o gene E e a região codificante completa foram capazes de distinguir as linhagens em 1a, 1b e 2. Nenhum evento recombinante foi detectado dentre as amostras do estudo quando comparadas com amostras de referência disponíveis do Genbank, porém uma cepa da linhagem 1a, isolada no estado do Rio de Janeiro em 1988 foi considerada mais relacionada com uma cepa possivelmente recombinante isolada no estado do Paraná no ano de 2001 (amostra de referência AF513110/BR/2001).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TWENTY-FIVE YEARS OF DENV-1 IN BRAZIL: MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF STRAINS ISOLATED FROM 1986 TO 2011.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

Fernanda de Bruycker Nogueira

This study presents the phylogeny and molecular characterization based on envelope gene (E) analysis of DENV-1 ($n=48$) isolated during epidemics occurred since this serotype introduction in 1986 to 2011. From those strains, six were fully sequenced (coding region) and possible genomic recombination events were analyzed. The results of the phylogenetic analysis based on the E gene showed that DENV-1 isolates from the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Alagoas, Ceará, Piauí and Rio Grande do Norte belong to genotype V (America/Africa), but grouping in distinct clades. Three groups were identified, one dating from 1986 to 2002 (lineage 1a), a second group isolated between 2009 and 2011 and a representative strain isolated in 2002 (lineage 2) and a group of strains isolated in 2010 and 2011 (lineage 1b). Lineage 2 has a high bootstrap support ensuring their separation from the other lineages. The lineages 1a and 1b, despite in distinct branches, were characterized in a same group supported by a bootstrap of 75%. Furthermore, the lineages 1a and 1b were more closely related to the American strains, while lineage 2 to the Asian strains. Amino acids (aa) substitutions were observed in the ectodomains I and III of the E protein and were associated to the lineages separation. A substitution on E₂₉₇ differentiated the lineage 1a from the lineages 1b and 2. Changes observed in E₃₃₈, E₃₉₄ (ectodomain III), E₄₂₈ and E₄₃₀ (stem region) differentiated lineages 1a, 1b and 2. The complete coding region analysis showed a large number of specific aa changes ($n=82$) distributed among the six strains studied, however lineage 2 presented approximately 50% of the total detected. With the exception of the C gene, all the others genes analyzed allowed the DENV-1 classification into the distinct genotypes. However, only the E gene and the entire coding region were able to group those into the distinct lineages. No recombinant event was detected but a sample belonging to lineage 1a was closely related to the known recombinant strain AF513110/BR/2001.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da Dengue.....	1
1.2 Vírus dengue (DENV)	4
1.3 Origem e evolução dos vírus dengue (DENV).....	9
1.4 Variabilidade genética e filogenia dos DENV.....	12
1.5 Recombinação nos DENV.....	14
1.6 Replicação dos DENV	15
1.7 Ciclo de transmissão dos DENV	17
1.8 Epidemiologia da dengue	20
1.8.1 Dengue nas Américas.....	21
1.8.2 Dengue no Brasil	25
1.9 Manifestações clínica e classificação da dengue.....	29
1.9.1 Dengue clássica (DC).....	30
1.9.2 Febre Hemorrágica da Dengue (FHD).....	30
1.9.3 Dengue com complicações (DCC).....	31
1.9.4 Nova classificação proposta pela OMS (2009)	31
1.10 Diagnóstico laboratorial	32
1.11 Vacinas contra os DENV	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Cepas virais	39
4.2 Isolamento viral	39
4.3 Extração do RNA viral.....	40
4.4 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)	40
4.5 Eletroforese em gel de agarose	42

4.6	Caracterização molecular	43
4.6.1	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento.....	43
4.6.2	Purificação do DNA	45
4.6.3	Quantificação do DNA	45
4.6.4	Reação de sequenciamento	45
4.6.5	Análise das sequências	46
4.6.6	Localização das substituições de aminoácidos na proteína do envelope (E)	47
4.7	Análise de recombinação genômica.....	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Confirmação de cepas de DENV-1	48
5.2	Caracterização molecular	48
5.2.1	Caracterização molecular de cepas de DENV-1 baseada na análise do gene E	50
5.2.2	Caracterização molecular baseada na sequência da região codificante completa (C→NS5).....	57
5.3	Análise de recombinação de cepas de DENV-1 baseada na análise da região codificante completa do genoma viral	75
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	87
8	PERSPECTIVAS	89
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
10	ANEXO	102
10.1	Nome e abreviatura dos aminoácidos	102
10.2	Matriz de porcentagem da identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada no gene E das linhagens dos DENV-1.....	102
11	APÊNDICE	106
11.1	First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil (publicado em Virol J. 2011 Aug 3;8:387).	106

11.2 Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance (publicado em Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Nov;107(7):940-5).....	106
11.3 Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil (publicado em Virol J. 2013 Jan 2;10:3).....	106
11.4 Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010 (publicado em PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2095).	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura do DENV.....	5
Figura 1.2 Estrutura da proteína do envelope (E).....	7
Figura 1.3 Estrutura das partículas virais dos Flavivírus.....	7
Figura 1.4 Ciclo de replicação dos DENV.....	16
Figura 1.5 Montagem da partícula viral dos DENV.....	17
Figura 1.6 Ciclo de transmissão do vírus da dengue (DENV).....	19
Figura 1.7 Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011 (WHO, 2013).....	20
Figura 1.8 Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS e de países com casos de dengue, 1955–2011 (WHO, 2013).....	21
Figura 1.9 Número de casos de dengue no Brasil, 1986-2013.....	28
Figura 1.10 Classificação dos casos de dengue e níveis de gravidade (OMS, 2009).....	32
Figura 4.1 Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti <i>et al.</i> , 1992.....	42
Figura 4.2 Estratégia de amplificação parcial (C/prM/M/E) e completo do genoma do DENV-1 por RT-PCR.....	44
Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti, 1992) para confirmação dos isolados com DENV-1 (fragmento com 482pb).....	48

Figura 5.2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os quatro primeiros pares de <i>primers</i> para o DENV-1 (regiões C/prM/M/E).....	49
Figura 5.3 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os 16 pares de <i>primers</i> para o DENV-1 (genoma completo).....	49
Figura 5.4 Quantificação por eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os 16 pares de <i>primers</i> para o DENV-1 (genoma completo).....	49
Figura 5.5 Árvore filogenética baseada no gene E dos 48 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	54
Figura 5.6 Árvore filogenética baseada na sequência codificante para o domínio III do gene E dos DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	55
Figura 5.7 Estrutura tridimensional do ectodomínio da proteína E do DENV-1.....	56
Figura 5.8 Árvore filogenética baseada na região codificante completa dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	59
Figura 5.9 Árvore filogenética baseada no gene C (capsídeo) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011)	60
Figura 5.10 Árvore filogenética baseada no gene prM/M (pré-membrana/membrana) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	61
Figura 5.11 Árvore filogenética baseada no gene E (envelope) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	62

Figura 5.12 Árvore filogenética baseada no gene NS1 (não estrutural 1) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	63
Figura 5.13 Árvore filogenética baseada no gene NS2A (não estrutural 2A) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	64
Figura 5.14 Árvore filogenética baseada no gene NS2B (não estrutural 2B) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	65
Figura 5.15 Árvore filogenética baseada no gene NS3 (não estrutural 3) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	66
Figura 5.16 Árvore filogenética baseada no gene NS4A (não estrutural 4A) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	67
Figura 5.17 Árvore filogenética baseada no gene NS4B (não estrutural 4B) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	68
Figura 5.18 Árvore filogenética baseada no gene NS5 (não estrutural 5) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011).....	69
Figura 5.19 Detecção de evento de recombinação em sequência genômica codificante completa pelo método RDP.....	76
Figura 5.20 Detecção de evento de recombinação em sequência genômica codificante completa pelo método BootScan.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.....	41
Tabela 4.2 Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	42
Tabela 4.3 Reagentes utilizados na RT-PCR para o sequenciamento.....	44
Tabela 4.4 Desenho de <i>primers</i> a partir do programa “primerexpress” para sequenciamento completo do genoma dos DENV1, de acordo com AF513110 (DENV-1). Produto amplificado de ~900pb por região (com ~200pb de sobreposição entre regiões).....	44
Tabela 4.5 Parâmetros de termociclagem da RT-PCR para sequenciamento.....	45
Tabela 4.6 Parâmetros de termociclagem para a Reação de Sequenciamento.....	46
Tabela 5.1 Cepas de DENV-1 isoladas de casos humanos de 1986 a 2011 no Brasil.....	52
Tabela 5.2 Substituições de aminoácidos que predizem a diferenciação dos vírus dengue 1 (DENV-1) em diferentes linhagens baseada na análise do gene do envelope (E).....	53
Tabela 5.3 Substituições de aminoácidos nos genes C, prM, M e NS1 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com amostra de referência AF226685.2/BR/90.....	70

Tabela 5.4 Substituições de aminoácidos nos genes NS2A, NS2B, NS3 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com a amostra de referência AF226685.2/BR/90.....71

Tabela 5.5 Substituições de aminoácidos nos genes NS4A, NS4B, NS5 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com a amostra de referência AF226685.2/BR/90.....72

Tabela 5.6 Matriz de porcentagem* da identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) das linhagens dos DENV-1.....73

Tabela 5.7 Matriz de porcentagem* da divergência nucleotídica e de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) das linhagens dos DENV-1.....74

Tabela 5.8 Evento de recombinação em potencial determinado por dois métodos utilizados pelo RDP3.....77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	sinal de porcentagem
~	aproximadamente
µL	microlitro
aa	aminoácido
Ae.	<i>Aedes</i>
AL	Alagoas
BR	Brasil
C	proteína do capsídeo
C6/36	cultura celular de <i>Ae. albopictus</i> clone 6 passagem 36
cDNA	DNA complementar
CE	Ceará
CR	complexo de replicação
d.C.	depois de Cristo
D1	iniciador <i>sense</i> D1
D2	iniciador <i>anti-sense</i> D2
DC	dengue clássico
DCC	dengue com complicação
DCSA	dengue com sinais de alerta
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DG	dengue grave
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSSA	dengue sem sinais de alerta
E	proteína do envelope
ECP	efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático indireto
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FA	Vírus da febre amarela

FD	febre da dengue
FHD	febre hemorrágica da dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FR	forma replicativa
h	hora
HI	Inibição da hemaglutinação
IgG	imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IR	intermediário replicativo
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
L-15	Leibovitz-15
LABFLA	Laboratório de Flavivírus
M	proteína de membrana
MAC ELISA	ensaio imunoenzimático indireto de captura de anticorpo M (do inglês: <i>IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
mg	miligrama
MG	Minas Gerais
mL	mililitro
MS	Mato Grosso do Sul
MS	Ministério da Saúde
MV	Máxima Verossimilhança
NC	não codificante
NS	proteína não-estrutural
NS1	proteína não-estrutural 1
NS2A	proteína não-estrutural 2A
NS2B	proteína não-estrutural 2B
NS3	proteína não-estrutural 3
NS4A	proteína não-estrutural 4A
NS4B	proteína não-estrutural 4B
NS5	proteína não-estrutural 5
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização PanAmericana de Saúde

ORF	Fase aberta de leitura (do inglês: <i>open reading frame</i>)
PAHO	PanAmerican Health Organization
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Piauí
Poli-A	poli-adenilada
prM	proteína da pré-membrana
RE	retículo endoplasmático
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RNA	ácido ribonucléico
RNA(-)	RNA polaridade negativa
RNA(+)	RNA polaridade positiva
RNA _{df}	RNA dupla fita
RNA _{fs}	RNA fita simples
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
SCD	síndrome do choque por dengue
SESDEC	Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil
SFB	soro fetal bovino
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
TS1	iniciador tipo-específico para DENV-1
TS2	iniciador tipo-específico para DENV-2
TS3	iniciador tipo-específico para DENV-3
TS4	iniciador tipo-específico para DENV-4
TTO	transmissão transovariana
UV	luz ultravioleta
V	Volts
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Dengue

Os primeiros relatos de grandes epidemias de doença febril compatível com os sintomas da dengue ocorreram em 1779 e 1780, nos continentes Asiático, Africano e Norte Americano. Porém, estes sintomas já haviam sido descritos em uma Enciclopédia Chinesa de sintomas e remédios em 265 a 420 d.C. durante a Dinastia Chin que foi formalmente editada em 610 d.C. (Dinastia Tang) e posteriormente em 992 d.C. (Dinastia Norte Sung), sendo chamada de “veneno da água” devido a associação dos insetos voadores com a água (Gubler, 1997; 1998). A doença foi caracterizada por *rash*, febre, dor nos olhos, artralgia, mialgia e manifestações hemorrágicas, incluindo sangramento de orofaringe, gengiva, intestinal e vaginal (Gubler, 1997). Surtos de doenças nas Antilhas Francesas em 1635 e no Panamá em 1699 também poderiam ter sido dengue (Gubler, 1997; 1998).

A dengue ou doença muito semelhante teve uma ampla distribuição geográfica antes do século XVIII, quando foram descritas as primeiras pandemias (Gubler, 1998). Contudo, ainda hoje existe a dificuldade em confirmar a doença considerando apenas dados clínicos devido aos sinais e sintomas compartilhados com outras doenças tropicais (Vasilakis et al., 2010).

Durante os séculos XVIII e XIX a febre do dengue dispersou na América do Norte, América do Sul, Bacia do Caribe, Ásia e Austrália. Nas Américas, a grande propagação foi devido às repetidas introduções do vetor *Stegomyia (St.) aegypti* (*Aedes aegypti*), que foram introduzidos através dos navios negreiros e de outros navios comerciais que atravessaram o oceano Atlântico partindo da África (Rodriguez-Roche & Gould, 2013).

A primeira descrição clínica detalhada seguramente da dengue foi realizada por Benjamin Rush, quando descreveu uma epidemia de “febre remitente biliar” e apresentou o nome “febre quebra ossos” para descrever a epidemia de 1780 na Filadélfia (Rush, 1789 *apud* Vasilakis et al., 2010). Este termo foi usado em San Juan, Porto Rico em 1763 sugerindo que a dengue já era bem conhecida no Caribe. Na mesma época, David Bylon descreveu uma epidemia em 1779 em Jakarta,

Indonésia, que se chamava “*Knokkel-koorts*” ou febre das articulações e ambos os médicos enfatizaram a gravidade das dores, a erupção e a tendência a recaídas (Bylon, 1780 *apud* Vasilakis et al., 2010).

A origem do nome dengue é controversa. Sugere-se que o termo “dengue” tenha sido usado pela primeira vez em Cuba. Porém, em 1801, a rainha da Espanha, Maria Luisa, se referiu a uma doença que teve como dengue. Em cartas ao Palácio Real datada de 12 de junho de 1801, ela disse: “Eu estava doente com uma doença chamada “dengue” e, desde ontem, tinha sangramento” (Soler et al., 1949 *apud* Gubler 1997). Entretanto, a origem mais provável da palavra dengue é de Swahili. Em ambas as epidemias relacionadas com doença semelhante à dengue, em Zanzibar (1823) e na Costa Leste Africana (1870), a enfermidade já era chamada de *Ki-Dinga Pepo*, descrita por Christie como “uma doença caracterizada por uma câibra, como um ataque súbito, causado por um espírito maligno”. Durante a epidemia em Cuba no ano de 1828, a doença foi inicialmente chamada de Dunga, mas depois mudou para dengue, termo pelo qual tem sido conhecida desde então (Christie, 1881 *apud* Gubler, 1997; Munoz, 1828 *apud* Gubler, 1997). No Brasil, entre 1845 e 1849 a doença era conhecida como “*Polka fever*” (Gubler, 1997).

O termo dengue foi introduzido na literatura médica inglesa durante a epidemia do Caribe em 1827-1828. Em 1869, foi estabelecido pelo “London Royal College of Physicians” a denominação desta enfermidade, até então referida na literatura como “febre articular”, “febre quebra ossos”, “dinga”, “polka”, entre outros (Siler et al., 1926 *apud* Halstead, 1974; Halstead, 1980).

A constatação de que mosquitos eram os vetores de transmissão da dengue ocorreu no início da década de 1900, a partir de estudos conduzidos por Graham (1903) e Bancroft (1906), sendo o último a apresentar conclusões de que o *Aedes. aegypti* poderia transmitir a doença. Os estudos realizados em Taiwan, Filipinas e no Pacífico demonstraram que *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes. scutellaris*, poderiam ser eficientes vetores dos DENV (Gubler, 1997).

Segundo os registros históricos, entre 1823 e 1916, houve uma segunda série de pandemias da dengue percorrendo o mundo, da África para a Índia e da Oceania para as Américas, com duração de 3 a 7 anos. Embora não seja possível identificar o sorotipo envolvido, estes surtos foram causados provavelmente pelo

mesmo sorotipo e foram transportados entre as regiões geográficas através do tráfico de escravos e do comércio (Gubler, 1997; Weaver & Vasilakis, 2009).

Leichtenstern (1896) foi o primeiro a reconhecer a dengue com uma doença dos portos marítimos das regiões costeiras que poderia se dispersar pelo interior ao longo dos rios, como o Ganges e o Indo na Índia, ou do Mississippi nos Estados Unidos. A invasão dos trópicos pelo mosquito vetor *Aedes aegypti* africano, provavelmente devido à circulação de pessoas e o armazenamento de águas nos veleiros foram fatores que mudaram radicalmente o comportamento da dengue no Sudeste Asiático, Subcontinente Indiano e Filipinas que resultou no súbito aparecimento de epidemias urbanas (Weaver & Vasilakis, 2009).

Durante a Segunda Guerra Mundial, no período de 1944 e 1945, pesquisadores japoneses (Hotta, 1952) e americanos (Sabin, 1952) isolaram as primeiras cepas do vírus dengue, sendo os sorotipos 1 e 2 identificados. Seguindo na década de 1950 com o isolamento dos sorotipos 3 e 4 na Tailândia e Filipinas (Hammon et al, 1960).

Nas Américas, durante os anos 1960 e 1970, houve a circulação de um único sorotipo num determinado momento dentro de uma dada região. No entanto, após este período, um aumento significativo da doença foi observado no mundo, em outras regiões tropicais, com uma série de epidemias associadas a um aumento na gravidade dos sintomas apresentados. Ao final deste período, era evidente a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus em todo o Sudeste da Ásia e Subcontinente Indiano (Weaver & Vasilakis, 2009).

Na década de 1990 e início do século XXI, a expansão populacional urbana, o aumento da densidade vetorial devido à insustentabilidade dos programas de controle, aumento do transporte comercial aéreo facilitando a movimentação rápida de pessoas levaram à distribuição global de todos os sorotipos, favorecendo a reemergência rápida de casos graves da doença ao longo dos trópicos (Weaver & Vasilakis, 2009).

Atualmente, os quatro sorotipos do vírus circulam na África, Sul e Sudeste da Ásia, Regiões do Pacífico Ocidental, Bacia do Caribe, e Américas Central e do Sul. Frequentes introduções no sudeste da América do Norte também são regularmente reportadas (Rodriguez-Roche & Gould, 2013).

1.2 Vírus dengue (DENV)

Os vírus dengue (DENV) estão taxonomicamente classificados na família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que reúne mais de 70 espécies em oito grupos sorologicamente relacionados, e um grupo de vírus que não se classifica dentro destes sorogrupos onde se inclui o vírus da febre amarela (FA) (Westaway et al, 1985; Burke & Monath, 2001).

Devido as suas propriedades antigênicas distintas, os DENV apresentam quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Sabin, 1952; Hammon et al, 1960; Westaway et al, 1985). Estudos recentes indicam o isolamento e a caracterização de um novo sorotipo de dengue de transmissão silvestre em Sarawak, Malásia, onde este novo e emergente sorotipo foi detectado em humanos, associado inclusive a casos graves da doença (Vasilakis et al., 2013).

Do ponto de vista epidemiológico, os DENV são classificados como arbovírus, pois a sua manutenção na natureza ocorre através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e artrópodos hematófagos (Gubler, 1998). O mosquito vetor da espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762 *apud* Knight & Stone, 1977), devido aos seus hábitos domésticos, é considerado o mais importante na transmissão do vírus ao homem, estando associado a epidemias explosivas de dengue clássico (DC) e febre hemorrágica da dengue (FHD) (Halstead, 1984).

Os DENV são esféricos, envelopados e com cerca de 40 a 50 nanômetros de diâmetro. O virion consiste de RNA de fita simples (RNAfs) de polaridade positiva de aproximadamente 11 kb, envolto por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica. O RNAfs funciona como o próprio RNA mensageiro (RNAm) e é traduzido a partir da maquinaria da célula hospedeira para uma poliproteína única imediatamente após a infecção, e posteriormente clivada em 3 proteínas estruturais – capsídeo (C), pré-membrana (prM), envelope (E) – e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Chambers et al., 1990; Miller et. al., 2010) (Figura 1.1). As proteínas estruturais são componentes da partícula viral madura e as proteínas NS são expressas somente na célula hospedeira infectada e não são empacotadas em níveis detectáveis nas partículas maduras (Miller et. al., 2010).

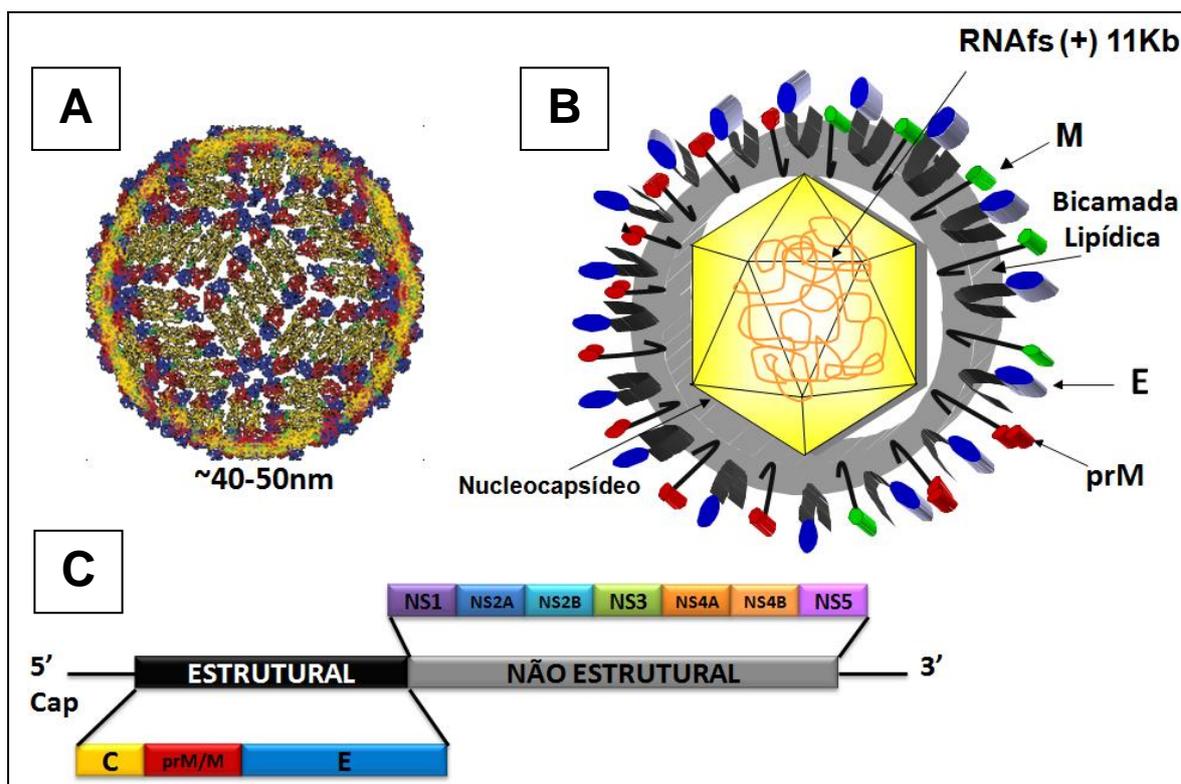


Figura 1.1 Estrutura do DENV. **A:** Estrutura do DENV apresentando os dímeros da proteína E (Kuhn *et al*, 2002) **B:** Diagrama esquemático dos DENV (adaptado de Heinz & Allison, 2001). **C:** Organização do genoma dos DENV (adaptado de Chambers *et al.*, 1990).

A proteína C, a primeira a ser sintetizada (PM ~11kDa), é carregada positivamente e responsável por formar o componente estrutural do nucleocapsídeo, consiste na proteína C e RNA genômico. Em condições de alta salinidade o nucleocapsídeo torna-se instável, tornando as proteínas C em dímeros (Lindenbach *et al*, 2007).

O precursor prM é uma proteína de 22 kDa, que ao sofrer uma clivagem proteolítica específica durante a maturação viral, dá origem à proteína M com cerca de 8 kDa, que está envolvida no aumento da infectividade do vírus e na organização da estrutura viral (Randolph *et al.*, 1990).

O envelope (E) é o maior constituinte da superfície dos DENV (53 kDa), sendo formado por proteínas pertencentes a classe II N-glicosilada das proteínas diméricas de fusão que medeiam a ligação e fusão do vírus com a membrana celular. É responsável por atividades biológicas do ciclo viral, além de ser o principal indutor de anticorpos neutralizantes e apresentar atividade hemaglutinante (Chambers *et al.*, 1990; Heinz & Allison, 2001; Weaver & Vasilakis, 2009). Possui

495 aminoácidos (aa), distribuídos em três domínios (I, II, III). Esses domínios são regiões distintas presentes nas duas subunidades idênticas do complexo dimérico da estrutura tridimensional da proteína E. O domínio I, região central da molécula, contendo o radical amino terminal, é responsável pela organização estrutural da partícula viral; domínio II contém a maior parte dos contatos do dímero, está relacionado com a fusão da partícula viral, tem a estrutura composta por um par de alças descontínuas das qual uma é altamente conservada entre todos os flavivírus, funcionando como um peptídeo interno de fusão, estabilizado por três pontes dissulfeto; e o domínio III, localizado na superfície lateral externa do dímero, inclui o C terminal e tem relação com a virulência de determinadas cepas virais, sendo um componente altamente imunogênico. Acredita-se que o domínio III dos flavivírus interajam com receptores celulares para a entrada dos vírus (Figueiredo, 1999; Nayak et al., 2009; Weaver & Vasilakis, 2009) (Figura 1.2).

As partículas maduras dos DENV exibem uma superfície exterior relativamente lisa, com os dímeros da proteína E ligada paralelamente à bicamada lipídica da membrana. O envelope apresenta 90 dímeros da proteína E bem ajustados em padrão de espinha de peixe incomum de simetria icosaédrica, sugerindo que tais dímeros podem sofrer rearranjos de rotação em torno do eixo de simetria 3 e 5 formando complexos triméricos fusogênicos. Esta mudança ocorre em ambiente com baixo pH. Já as partículas virais imaturas são maiores e exibem 60 picos cada um composto por três monômeros da proteína E em torno de um trímero de prM. O arranjo das glicoproteínas virais nas partículas virais maduras e imaturas é muito diferente. A proteína M, produzida durante a maturação das partículas de vírus dentro da via de secreção, é um pequeno fragmento proteolítico da proteína precursora prM. A prM liga-se ao peptídeo de fusão localizado do domínio II da proteína E, e após clivagem ocorre a liberação do peptídeo pr e os 60 trímeros são dissociados girando e rearranjando em 90 dímeros antiparalelos, configurando a superfície da glicoproteína do envelope em partículas virais maduras (Lindenbach et al., 2007) (Figura 1.3).

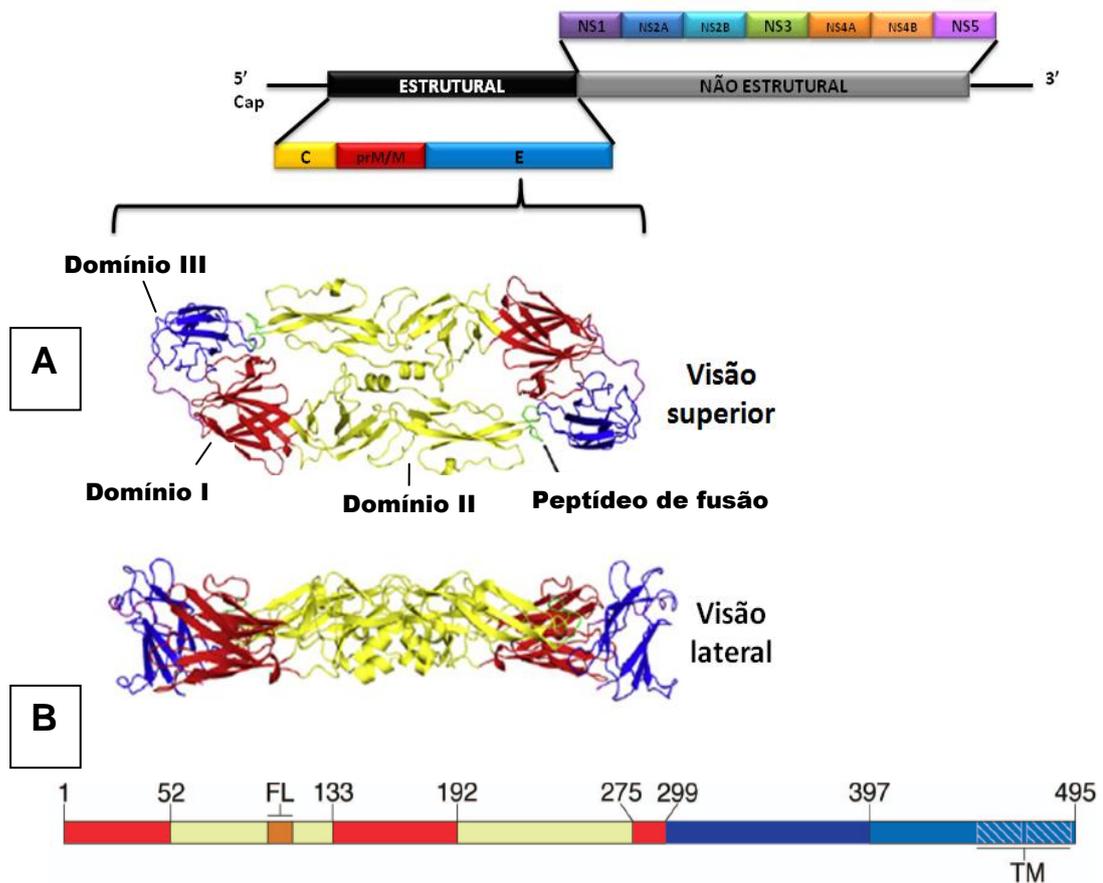


Figura 1.2 Estrutura da proteína do envelope (E). Diagrama em fita da estrutura cristalina da proteína do envelope (E) mostrando o domínio I (vermelho), domínio II (amarelo), domínio III (azul) e o peptídeo de fusão (verde) apresentados no painel A (adaptado de Heinz & Stiasny, 2012). E no painel B a estrutura da proteína do envelope apresentando os segmentos dos domínios I (vermelho), II (amarelo), III (azul), peptídeo de fusão (FL – *fusion loop*) (laranja). Região “stem” (turquesa) liga o ectodomínio a uma âncora transmembrana C-terminal dupla-hélice (TM) (adaptado de Nayak et al., 2009).

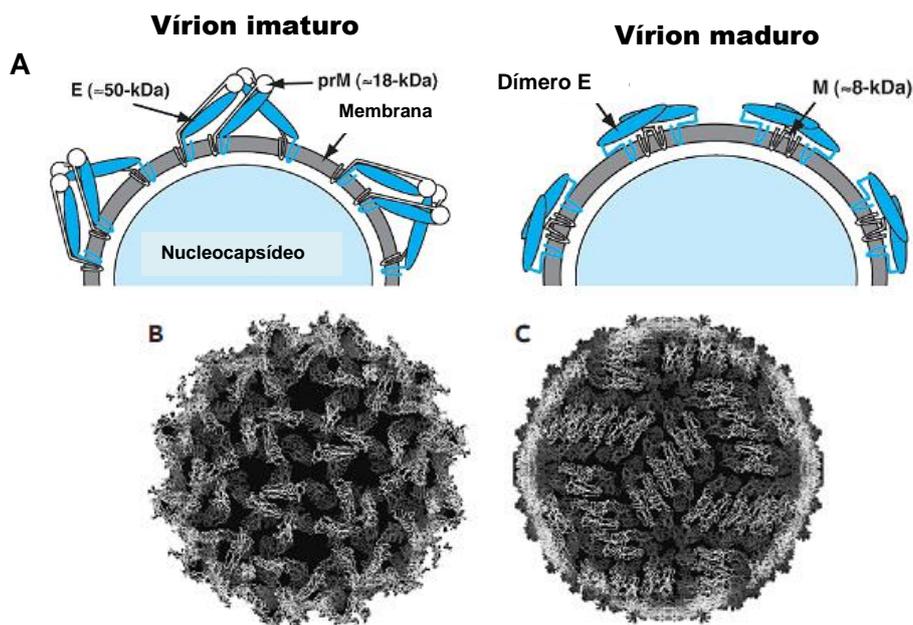


Figura 1.3 Estrutura das partículas virais dos Flavivírus. A: proteína do envelope de vírions maduros e imaturos. Reconstrução da partícula viral do dengue imatura (B) e madura (C) (adaptado de Lindenbach et al., 2007).

A proteína NS1 (PM ~ 48 kDa) está envolvida na morfogênese da partícula viral (Mason et al., 1987; Muylaert et al., 1997). Apresenta-se em três formas: retidas no interior das células infectadas, localizadas na superfície celular e secretada. Ela é translocada para o retículo endoplasmático (RE) e clivada na extremidade C-terminal da proteína E por uma peptidase sinal do hospedeiro e na junção NS1/NS2A por enzimas presentes no RE (Lindenbach et al., 2007). A NS1 atua como um co-fator no processo de replicação viral e tem sido demonstrado que se co-localiza com RNA dupla fita e outros componentes dos complexos de replicação (CR) (Muller & Young, 2013).

A NS2A é uma proteína hidrofóbica, relativamente pequena (~22kDa). Sua extremidade N-terminal é gerada através da clivagem na junção NS1/NS2A por enzimas do RE. A clivagem na junção NS2A/NS2B é realizada por uma serina protease NS2B-NS3. A NS2A participa do processo de montagem da partícula viral e do complexo de replicação do RNA, interagindo com as proteínas NS3 e NS5. A NS2B também é uma pequena proteína (~14kDa), associada à membrana. Forma um complexo estável com a NS3 e atua como um co-fator para a serina protease NS2B-NS3 (Lindenbach et al, 2007).

A proteína NS3 é altamente conservada entre os Flavivírus, apresentando atividade de protease e helicase (Henchal & Putnak, 1990). É uma grande proteína multifuncional (70kDa), contendo diversas atividades necessárias para o processamento da poliproteína e replicação do RNA. A extremidade N-terminal da proteína é o domínio catalítico do complexo de serina protease da NS2B-NS3. Além da clivagem da NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, a protease gera as extremidades C-terminal da proteína C madura e NS4A, podendo decompor a NS2A e NS3 internamente (Lindenbach et al., 2007).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas (16 kDa e 27 kDa, respectivamente). A NS4A apresenta interação genética com NS1, estando envolvida na replicação do RNA, como um dos componentes do CR. A NS4B está localizada com a NS3 e o RNAdf nas estruturas membranosas derivadas do RE, possivelmente o sítio de replicação do RNA (Lindenbach & Rice, 1999).

A NS5 é uma proteína grande com ~103kDa, e assim como a NS3, é muito conservada entre os Flavivírus e multifuncional com função metiltransferase e RNA polimerase RNA-dependente (RpRd) (Henchal & Putnak, 1990). Junto com a NS3 participa do processo de replicação viral, sendo um dos componentes do CR.

Forma um complexo com NS3 e pode estimular tanto atividade NTPase e RTPase (Lindenbach et al, 2007).

Nas extremidades do genoma existem as regiões não codificantes identificadas como 5'NC e 3'NC com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento (Mandl et al., 1998; Shurtleff et al., 2001; Mutebi et al., 2004)

1.3 Origem e evolução dos vírus dengue (DENV)

A origem geográfica dos DENV tem sido objeto de especulação por décadas. As primeiras hipóteses para a origem destes vírus apontam para a África, principalmente porque muitos dos flavivírus transmitidos por mosquitos circulam exclusivamente no continente africano e por vezes infectam os primatas, o que sugere que este grupo como um todo se originou neste local. Além disso, acredita-se que o *Ae. aegypti* tenha se originado na África, embora esta espécie tenha sido adotada como um vetor para a transmissão em humanos em um passado recente (Gubler, 1997). Em contrapartida, a presença de todos os quatro sorotipos, tanto em humanos quanto em macacos na Ásia, além da profunda similaridade filogenética das cepas asiáticas silvestres em particular, sugere que o vírus tenha origem asiática, em vez de uma origem africana (Vasilakis et al., 2010; Holmes & Twiddy, 2003).

Até a década de 1940 a informação sobre o causador da dengue era apenas de um agente filtrável. Foi durante a Segunda Guerra Mundial que as primeiras cepas virais foram isoladas. Hotta e Kimura foram os primeiros a isolar o vírus em 1943, através de inoculação de soro de pacientes com doença aguda em camundongos lactentes (Gubler, 1997), mas infelizmente, este trabalho foi publicado em uma revista japonesa pouco conhecida. No verão de 1943, o Dr. Hotta conseguiu o isolamento de uma cepa de vírus da dengue (sorotipo 1) a partir do sangue de um paciente chamado Mochizuki, em Nagasaki, Japão. Naquela época, em um país em guerra, preservar cepas de vírus isolados era difícil, pois não possuíam gelo seco e os freezers eram inúteis por causa das freqüentes falhas de energia. Por isso a cepa

de DENV-1 foi mantida através de passagens em camundongos. Mas, em um momento em que a oferta de camundongos foi baixa, a manutenção da cepa viral Mochizuki foi realizada por inoculação na própria mãe (Konishi & Kuno, 2013). Na mesma época, em 1944, Sabin e seus colaboradores isolaram o vírus de soldados americanos na Índia, Nova Guiné e Havaí. Utilizando teste de inibição da hemaglutinação, foi possível demonstrar que algumas cepas virais das três regiões geográficas eram antigenicamente similares. Este vírus foi chamado de dengue tipo 1 (DENV-1), sendo a cepa havaiana designada como protótipo (Haw-DEN-1). Outra cepa viral antigenicamente distinta proveniente da Nova Guiné foi nomeada de dengue tipo 2 (DENV-2), sendo o protótipo chamado de Nova Guiné C (NG" C"-DEN-2). O vírus de origem japonesa isolado por Hotta e Kimura (1952) foi posteriormente confirmado como DENV-1. Mais dois sorotipos, dengue tipo 3 (DENV-3) e dengue tipo 4 (DENV-4), foram isolados subsequentemente de pacientes com doença hemorrágica numa epidemia em Manila, nas Filipinas, em 1956 (Hammon et al., 1960; Gubler, 1997).

Embora estudos antigênicos tenham demonstrado que os DENV se classificam como flavivírus, estudos filogenéticos tornam-se cada vez mais necessários para o entendimento da história evolutiva destes vírus (Zanotto et al., 1996; Kuno et al., 1998; Holmes & Twiddy, 2003). A filogenia baseada em sequências do gene NS5 de 70 flavivirus, incluindo os DENV caracterizou grupos de vírus transmitidos por carrapatos, transmitidos por mosquitos e vírus com vetor desconhecido. Embora que ramo contendo os quatro sorotipos do DENV tenha sido bem suportado dentro do *clade* dos vírus transmitidos por mosquitos, os grupos relacionados aos DENV não puderam ser identificados com certeza, devido ao fraco suporte de *bootstrap* (Holmes & Twiddy, 2003). As análises filogenéticas tanto do gene NS5 (Holmes & Twiddy, 2003) quanto do gene E (Zanotto et al., 1996) demonstraram a mesma ordem de ramificação entre os quatro sorotipos do DENV, com o DENV-4 divergindo primeiramente, seguido do DENV-2 e por último a separação do DENV-1 e DENV-3.

Ideias sobre a história do DENV pode também ser obtida através da reconstrução de uma escala de tempo molecular da sua evolução. Isto foi alcançado pelas taxas de estimativa de substituição de nucleotídeos usando um método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) que analisa a quantidade de mudança evolutiva ocorrida entre os vírus amostrados em momentos diferentes

(Rambaut, 2000). Utilizando este método em um grande número de sequências do gene E revelou-se que a evolução dos DENV segue um relógio molecular, embora tenham sido observadas taxas diferentes em linhagens específicas (Holmes & Twiddy, 2003).

A principal taxa de substituição (em todas as posições) variou de 4.55×10^{-4} (DENV-1) a 9.01×10^{-4} substituições por sítio, por ano (DENV-3) (Twiddy et al., 2003). Estas taxas são similares às descritas para os vírus RNA transmitidos por vetor, embora ligeiramente inferiores às dos vírus RNA que possuem outros mecanismos de transmissão, possivelmente relacionado com a seletividade inerente ao replicar em hospedeiros tão divergentes como insetos e mamíferos (Holmes & Twiddy, 2003). Usando estas taxas de substituição, a divergência dos quatro sorotipos do DENV foi datada como recente, cerca de 1000 anos atrás (Twiddy et al., 2003), e portanto, corresponde aproximadamente aos primeiros relatos de doença semelhante a dengue. Além disso, as datas de transmissão entre espécies de macacos para os seres humanos só ocorreu ~320 (DENV-2) e ~125 (DENV-1) anos atrás considerando as cepas atuais, e de acordo com a diversidade genética atualmente reconhecida estima-se que cada sorotipo surgiu quase simultaneamente e apenas durante o século passado (Holmes & Twiddy, 2003).

A evolução do vírus da dengue tem tido um impacto importante sobre a sua virulência para os seres humanos e epidemiologia da doença em todo o mundo. Embora diferenças antigênicas e genéticas nas cepas virais sejam evidentes, a falta de modelo animal da doença dificulta a detecção da virulência dos DENV. Entretanto, estudos filogenéticos permitem a correlação entre genótipos específicos (dentro dos sorotipos) e gravidade da doença. Atualmente, os DENV podem ser classificados como sendo de baixo, médio ou alto impacto epidemiológico. Alguns vírus podem permanecer em ciclos silvestres de pequena ou baixa transmissibilidade para humanos, outros causam somente FD, e alguns genótipos têm sido associados como causador da FHD e SCD. Apesar do complexo conjunto de fatores que contribuem para a epidemiologia, estudos têm sugerido que estruturas virais específicas podem contribuir para o aumento da replicação nas células-alvo humanas e intensificar a transmissão pelo mosquito vetor. Entretanto, o estado imunológico e possivelmente características genéticas do hospedeiro também são determinantes de virulência ou manifestação da doença (Rico-Hesse, 2003).

1.4 Variabilidade genética e filogenia dos DENV

Os vírus RNA apresentam variabilidade genética devido ao alto grau de mutação associado com a RNA polimerase RNA-dependente e às suas rápidas taxas de replicação. Nos DENV, esta variabilidade genética resulta na existência dos quatro sorotipos antigenicamente distintos. Antes mesmo de se conhecer a sequência dos genes já se sabia que variações genéticas existiam dentro de cada sorotipo (Holmes & Twiddy, 2003). A evidência de cepas diferentes entre os DENV foi primeiramente detectada sorologicamente usando anticorpos produzidos por inoculação em animais de laboratório (Sabin, 1952; Rico-Hesse, 2003).

As primeiras evidências genéticas para diferenças entre os sorotipos dos DENV foram determinadas através da técnica RNA *fingerprinting*, utilizando enzimas para digestão da fita do RNA, com o número e tamanho das fitas variando de acordo como tamanho da sequência do vírus, agrupando os vírus em topotipos (Rico-Hesse, 2003; Chen & Vasilakis, 2011;).

Porém, com o aprimoramento das técnicas moleculares, sequências genômicas inteiras puderam ser geradas a partir da transcrição reversa do RNA viral em um DNA complementar (cDNA), posteriormente amplificado em inúmeras cópias pela técnica de Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (Rico-Hesse, 2003). O sequenciamento do genoma viral permitiu, com maior eficiência e exatidão, a caracterização das cepas dos DENV e permitiu delinear as relações evolutivas entre sorotipos. O termo "genótipo" foi definido como o agrupamento de DENV com divergência nucleotídica $\geq 6\%$ para uma determinada região do genoma (Rico-Hesse, 1990; Chen & Vasilakis, 2011).

Para o DENV-1 análises filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas da junção E/NS1 ou do gene E completo indicam a divisão do sorotipo em cinco genótipos: (1) genótipo I, representando cepas do Sudeste Asiático, China e Leste da África; (2) genótipo II, representando linhagens da Tailândia coletados na década de 1950 e 1960; (3) genótipo III, representando a cepa selvagem coletada na Malásia; (4) genótipo IV, representando cepas das ilhas do oeste do Pacífico e da Austrália; e o (5) genótipo V, representando todas as cepas derivadas das Américas, África Ocidental, e um número limitado de cepas da Ásia (Rico-Hesse, 1990; Vasilakis & Weaver, 2008).

Análises filogenéticas baseadas em sequências de nucleotídeos do gene E caracterizou cinco genótipos para o DENV-2: (1) genótipo asiático, consistindo em genótipo asiático 1, representado por cepas da Malásia e Tailândia e genótipo asiático 2, representado por cepas do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; (2) genótipo cosmopolita, incluindo cepas de ampla distribuição geográfica, possuindo cepas da Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Oceano Índico e Pacífico, Subcontinente Indiano e do Oriente Médio; (3) genótipo americano, com representantes da América Latina e cepas mais antigas do Caribe, Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico das décadas de 1950 e 1960; (4) genótipo Sudeste Asiático/Americano, incluindo cepas da Tailândia, do Vietnã e coletadas nas Américas nas duas últimas décadas, aproximadamente; e (5) genótipo silvestre, representando cepas de humanos, mosquitos silvestres, ou macacos sentinela no Oeste da África e Sudeste da Ásia (Rico-Hesse et al, 1997; Twiddy et al., 2002; Vasilakis & Weaver, 2008).

Inicialmente foram caracterizadas cinco genótipos para o DENV-3 pela técnica de *fingerprinting*, mas as análises subsequentes baseadas nas sequências correspondentes aos genes prM/E, e posteriormente, sequências do genoma completo caracterizaram quatro genótipos para este sorotipo: (1) genótipo I, representando cepas da Indonésia, Malásia, Filipinas e recentes isolados das ilhas do Pacífico Sul; (2) genótipo II, representando cepas da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; (3) genótipo III, com cepas da Sri Lanka, Índia, África e Samoa, e uma cepa da Tailândia de 1962; e (4) genótipo IV representando cepas de Porto Rico, América Latina e Central e uma cepa antiga do Tahiti, de 1965. Embora cepas silvestres de DENV-3 não tenham sido isoladas, acredita-se que estas existam na Malásia, com base na soroconversão de macacos sentinelas (Vasilakis & Weaver, 2008).

Para o DENV-4, as análises filogenéticas baseadas no gene E e no genoma completo caracterizaram quatro genótipos distintos: (1) genótipo I, é representado por cepas da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e do Japão (importados para o Japão a partir do Sudeste Asiático); (2) genótipo II, é representado por cepas da Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e Américas; (3) genótipo III, com amostras tailandesas recentes que são diferentes de outras cepas da Tailândia. E (4) o genótipo IV, representando as cepas silvestres da Malásia (Weaver & Vasilakis, 2009; Vasilakis & Weaver, 2008).

1.5 Recombinação nos DENV

A função da recombinação na evolução dos DENV ainda se encontra controverso (Weaver & Vasilakis, 2009). Dentre outros fatores, populações de DENV de uma localidade em particular podem evoluir ou alterar rapidamente devido à pressão seletiva causada pela introdução de cepas de vírus exóticos, assim como através de recombinação intra-sorotípica (Aaskov et al., 2007).

Métodos filogenéticos têm sido utilizados para identificar a recombinação entre os sorotipos de DENV. Para os DENV-1 a evidência mais expressiva deriva da amostra de um paciente da Nova Caledônia que foi infectado com ambos os genótipos I e II, assim como com uma cepa recombinante (Aaskov et al, 2007; Weaver & Vasilakis, 2009). Outros estudos têm relatado evidências de recombinação para o DENV-1. Em um cepa originária da China foram identificadas três regiões recombinantes nas sequências da junção prM/E, NS1 e NS3 (Chen et al., 2008) e em amostras brasileiras (dos Santos et al., 2002; Carvalho et al., 2010).

Ainda não foi possível alcançar experimentalmente a recombinação nos flavivirus, portanto deve-se ter cuidado ao inferir conclusões sobre eventos de recombinação. Para tal, algumas condições são necessárias para confirmar a transmissão de uma cepa recombinante natural: a transmissão do recombinante deve ser demonstrada em um único fragmento amplificado por PCR após a clonagem para assegurar que ocorre em uma única molécula de cDNA, a recombinação deve ser demonstrada repetidamente em populações de clones de vírus viáveis e o recombinante deve ser mantido durante a evolução pós-recombinação (Weaver & Vasilakis, 2009).

As condições ecológicas facilitam a recombinação nos DENV, envolvendo a co-circulação de múltiplas populações virais, incluindo distintos genótipos, permitindo ao mosquito vetor ingerir múltiplas variantes por se alimentar em diferentes hospedeiros, ou pelo fato do hospedeiro ter se infectado simultaneamente por vetores infectados com diferentes vírus. Locais onde há presença de múltiplos genótipos são considerados altamente oportunos para a ocorrência de infecções mistas com diferentes cepas do DENV (Aaskov et al., 2007).

1.6 Replicação dos DENV

A partícula viral se liga às células hospedeiras por meio de receptores celulares específicos para a proteína do envelope viral. O vírion é então endocitado e dentro do endossomo, o pH baixo induz a fusão do envelope viral com as membranas celulares. O nucleocapsídeo é desencapsulado permitindo a liberação do RNA genômico no citoplasma (Lindenbach et al., 2007).

A replicação dos DENV ocorre no citoplasma das células infectadas, nas estruturas de membranas induzidas pelo vírus. Essas membranas rearranjadas, que contém proteínas específicas do DENV, RNA viral, e alguns fatores da célula hospedeira envolvidos na produção do RNA progênico, são chamadas de complexo de replicação (CR). Este ambiente permite uma eficiente síntese de RNA e morfogênese viral. Aparentemente, após a infecção por DENV, o RNA genômico se associa com os ribossomos no RE durante a tradução viral. Embora a replicação dos DENV e de outros membros da família *Flaviviridae* seja estudada extensivamente, a arquitetura exata do CR do DENV bem como a sua biogênese não é bem conhecida (Lindenbach et al., 2007; Welsch et al., 2009; Miller et al., 2010; Alcaraz-Estrada et al., 2010) (Figura 1.4).

Um pré-requisito para a replicação do genoma viral é a expressão e processamento da poliproteína viral, uma vez que a célula hospedeira não codifica todos os fatores necessários para a replicação dos DENV. Durante a replicação viral o RNA(+) serve como molde para a produção da cadeia de RNA(-), que é usado para a geração das novas fitas de RNA(+) (progênie). Além do RNA(+) mais dois tipos de RNA são encontrados dentro da célula infectada. O RNA dupla fita (RNA_{df}) RNase-resistente são os chamados RNA da forma replicativa (FR) e os RNA parcialmente RNase-resistente são os intermediário replicativo (IR), ambos precursores do RNA(+) genômico. No atual modelo de replicação dos DENV assume-se que durante a replicação, o novo RNA(-) sintetizado faz o pareamento de bases com o RNA(+) molde formando a FR. Os FR atuam como molde para gerações de múltiplas fitas de RNA⁺ via o IR, que contém regiões duplas assim como fita livre para a ação da replicase viral. O RNA viral é sintetizado de forma semi-conservativa e assimétrica, com fitas positivas acumulando aproximadamente 10 vezes mais do que as fitas negativas. A nova fita de RNA(+) produzido é liberada

do IR e segue para os ribossomos iniciando o ciclo de tradução ou é empacotado na partícula viral recém-gerada (Miller, 2010) (Figura 1.4).

A montagem do CR necessita inicialmente da proliferação e invaginações das membranas do RE. Presumivelmente, este processo é induzido pela NS4A e NS3, em conjunto com outras proteínas celular e viral. Acredita-se que oligômeros da proteína NS4A se intercalem na membrana do RE, formando as invaginações. Essas invaginações dão origem a vesículas membranosas que tem sido descritos como o local para a replicação viral, uma vez que as proteínas NS e RNAfd são localizados nessas estruturas membranosas. A proteína estrutural do capsídeo (C) se acumula em torno de gotículas lipídicas derivadas do RE que contém um núcleo lipídico neutro delimitado por uma monocamada de fosfolípidos. A proteína C associada com as gotículas lipídicas é direcionada para o RE durante a morfogênese viral. Após a formação do nucleocapsídeo, o envelope viral é adquirido por brotamento no lúmen do RE. Os vírus são depois liberados através da via secretora do hospedeiro, via complexo de Golgi, lançado na superfície celular. (Lindenbach et al., 2007; Welsch et al., 2009; Alcaraz-Estrada et al., 2010) (Figura 1.5).

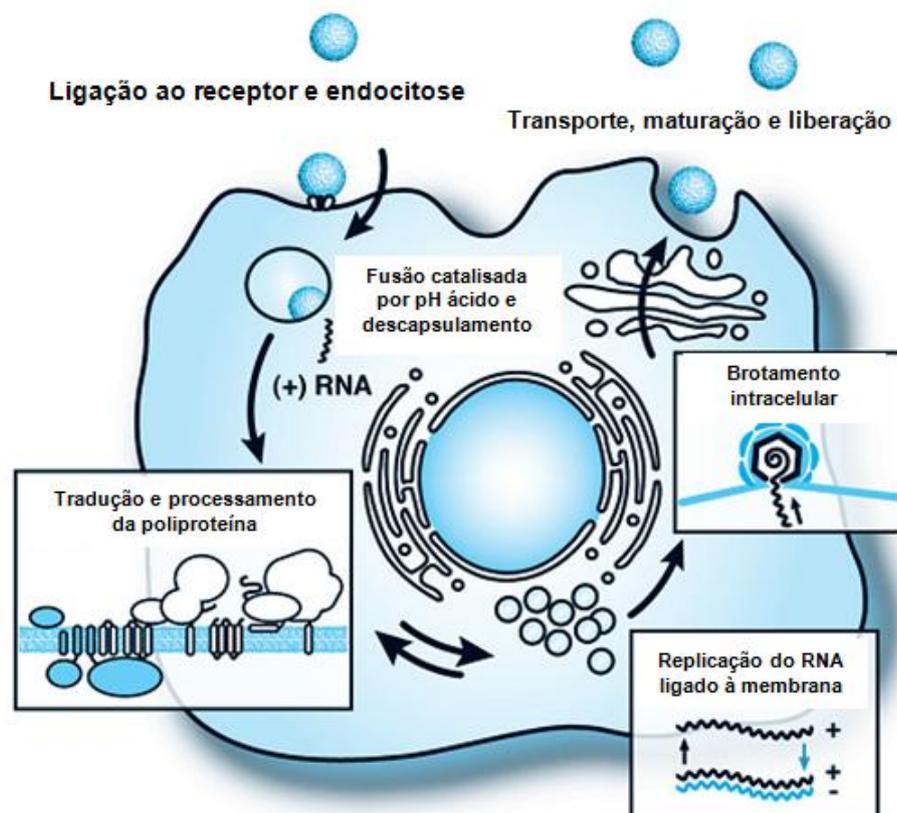


Figura 1.4 Ciclo de replicação dos DENV (adaptado de Lindenbach et al., 2007).

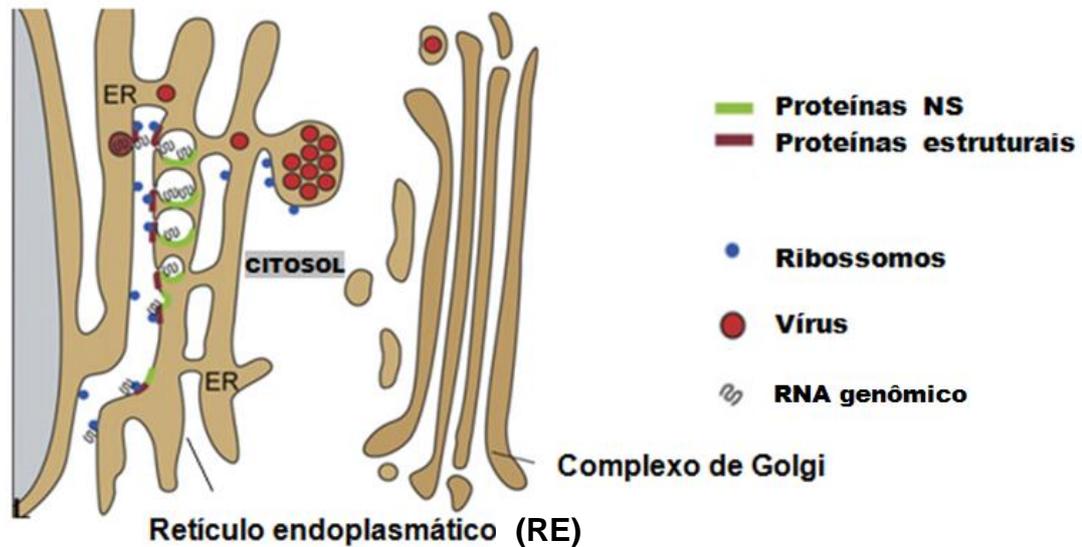


Figura 1.5 Montagem da partícula viral dos DENV (adaptado de Welsch et al., 2009).

1.7 Ciclo de transmissão dos DENV

Os quatro sorotipos do DENV são mantidos na natureza por dois ciclos distintos: silvestre e humano (Figura 1.6). O ciclo silvestre é ecologicamente e evolutivamente distinto do ciclo de transmissão em humano. Neste ciclo, a transmissão é mediada por *Aedes* spp. arborícolas e primatas não-humanos, parecendo este ser o único hospedeiro amplificador. Na África os principais vetores são o *Ae. (Stegomyia) luteocephalus*, *Ae. (Diceromyia) furcifer* e *Ae. (Diceromyia) taylori*. Apesar de *Ae. furcifer* serem mosquitos enzoóticos arborícolas, eles são conhecidos por descer ao nível do solo para se alimentar em seres humanos. O mosquito ancestral arbóreo, *Ae. aegypti formosus*, principal vetor doméstico de transmissão do DENV é imune à infecção pelo DENV silvestre (Kyle & Harris, 2008; Weaver & Vasilakis, 2009; Chen & Vasilakis, 2011). Os hospedeiros primatas na África incluem o macaco Patas (*Erythrocebus pernas*), macaco verde africano (*Chlorocebus sabaeus*), Babuínos Guiné (*Papio papio*) e espécies possivelmente relacionados como: *Papio anubis*, *Papio ursinus* e *Papio cynocephalus*. Na Ásia, os principais vetores incluem os mosquitos primatófilos do complexo *Ae. (Finlaya) niveus* sl., um grupo que inclui *Ae. pseudoniveus*, *Ae. subniveus*, *Ae. vanus*, *Ae.*

albolateralis, *Ae. niveoides* e *Ae. novoniveus*. Estas espécies são também conhecidas por descer das árvores até o solo para se alimentar em humanos. Os hospedeiros primatas asiáticos incluem: macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*), macacos de rabo de porco do sul (*Macaca nemestrina*) e macacos folhas prateadas (*Presbytis cristata*) e, possivelmente, macacos folha verde - mitrados (*Presbytis melaphos*). Apesar de apenas dois focos documentados de transmissão do DENV silvestre ter sido reconhecido, quando se considera a extensão da distribuição geográfica dos vetores e reservatórios primatas, é provável que ocorra a transmissão do DENV silvestre, ainda não descrito, em outros locais de África tropical e da Ásia. Até o momento não há nenhuma evidência concreta da existência da transmissão do ciclo silvestre nas Américas (Chen & Vasilakis, 2011).

O comportamento alimentar oportunista dos mosquitos vetores arbóreos poderia facilitar a transferência de DENV silvestre das florestas para ambientes peridomiciliares. Por certo, em áreas rurais da África e Ásia, onde os vetores atingem altas densidades, muitas vezes, o DENV é detectado entre primatas não-humanos e humanos. As savanas úmidas que circundam ambientes silvestres em áreas rurais da África e Ásia são definidas como "zona de emergência" (Chen & Vasilakis, 2011).

Na Ásia, estudos demonstraram que vetores *Ae. niveus* descem ao solo para se alimentar em seres humanos, onde *Ae. albopictus* também são abundantes, permitindo a transferência dos vírus em hábitat humano. Este cenário paralelo que tem sido observado nas áreas rurais adjacentes às florestas da África Ocidental, onde *Ae. furcifer* é, provavelmente, a ligação do principal vetor entre a floresta e hábitat humano (Chen & Vasilakis, 2011).

Atualmente, quase todas as infecções humanas são devidas a circulação do DENV exclusivamente em ambientes domésticos e peridomiciliares ao longo dos trópicos, onde o homem serve como único reservatório de amplificação. Neste ciclo humano, *Ae. aegypti aegypti* é o principal vetor que transmite o DENV, enquanto outros *Aedes* spp. (por exemplo, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*) servem como vetores secundários. Embora o *Ae. albopictus* possa ter sido o vetor original para transmissão humana, o DENV têm explorado o elevado hábito antropofílico do *Ae. aegypti aegypti* para sustentar a transmissão em humanos (Chen & Vasilakis, 2011).

A transmissão transovariana (TTO) também tem sido sugerida como um mecanismo de manutenção dos DENV em ambos os ciclos de transmissão (Figura 1.6), especialmente durante períodos interepidêmicos ou períodos prolongados de seca. O envolvimento da TTO na manutenção dos DENV na natureza foi demonstrado com o isolamento do DENV-2 presumidamente silvestre a partir de um *pool* de *Ae. taylori* em 1980 na Côte d' Ivoire, e um ano depois no Senegal a partir de um *pool* de mosquitos *Ae. furcifer*. Em *Ae. aegypti aegypti* coletados em diversas localizações geográficas e estágios de desenvolvimento também foi demonstrada a TTO, bem como em *Ae. albopictus*, *Ae. mediovittatus*, e vários membros do grupo *Ae. (Stegomyia) scutellaris*, que desempenham um papel importante na transmissão do DENV no Arquipélago da Indonésia e na Polinésia (Chen & Vasilakis, 2011). Evidências demonstram que o *Ae. albopictus* é mais eficiente na TTO do que o *Ae. aegypti*, podendo ser um candidato para manutenção do DENV durante períodos interepidêmicos. Dado o elevado número de casos assintomáticos de dengue, também é possível que a transmissão silenciosa em humanos por um número reduzido de vetores mantenha a transmissão do DENV entre epidemias (Kyle & Harris, 2008).

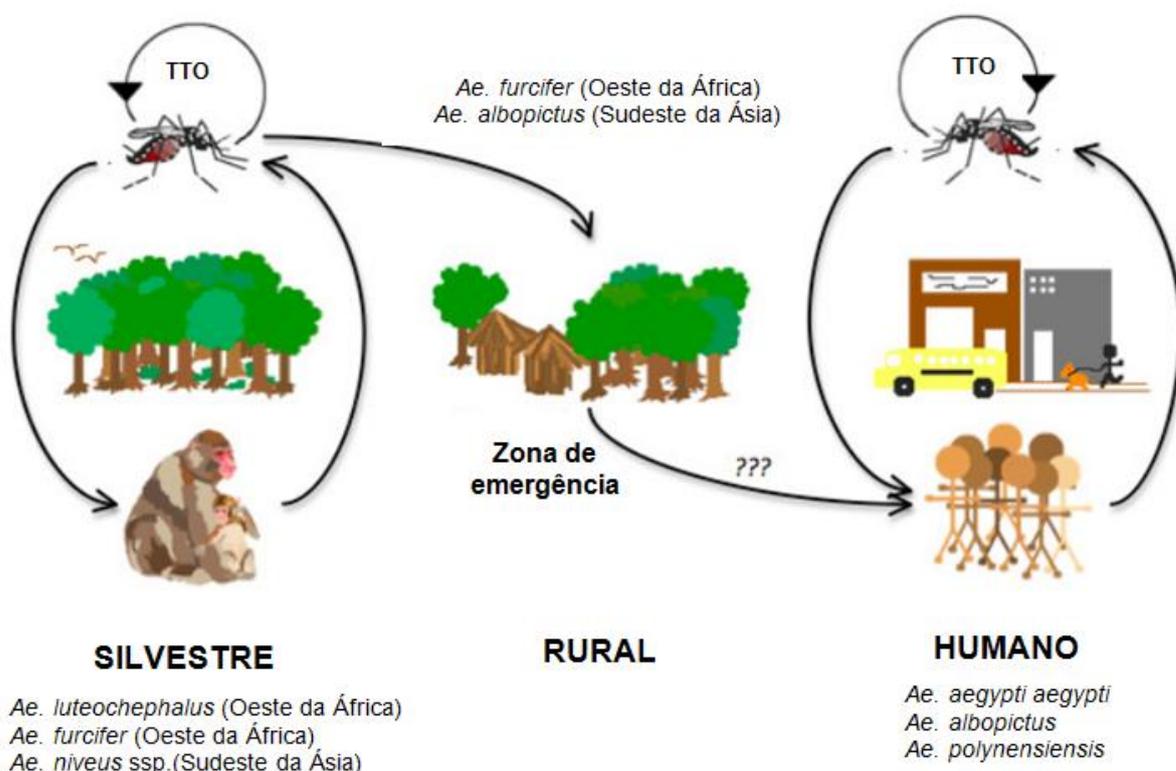


Figura 1.6 Ciclo de transmissão do vírus da dengue (DENV) (adaptado de Chen & Vasilakis, 2011).

1.8 Epidemiologia da dengue

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública, sendo a doença viral transmitida por mosquito que se espalha mais rápido no mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência tem elevado 30 vezes com o aumento da expansão geográfica para novos países. Em 2012, a distribuição geográfica da dengue incluiu mais de 125 países. Esse aumento reforça a necessidade da implementação de programas para prevenção sustentável e intervenções de controle. O surgimento e disseminação dos quatro sorotipos na África, Américas, Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental representa uma ameaça de pandemia (WHO, 2013) (Figura 1.7).

Estima-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos (WHO, 2009). Entre os anos de 1955-2011 houve um aumento constante no número de casos de dengue e dengue grave (WHO, 2013) (Figura 1.8).

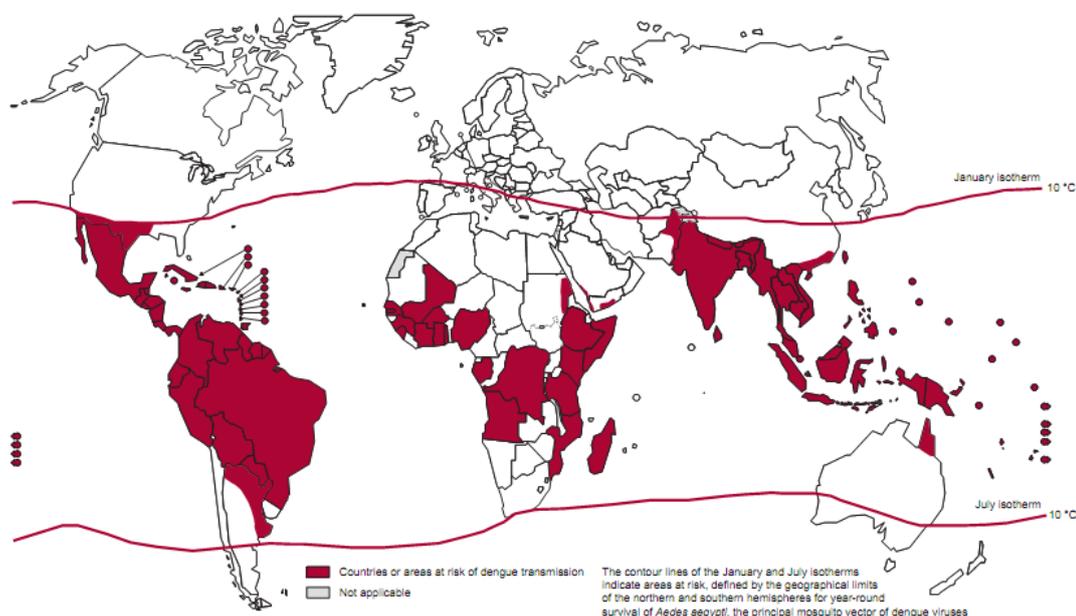


Figura 1.7 Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011 (WHO, 2013).

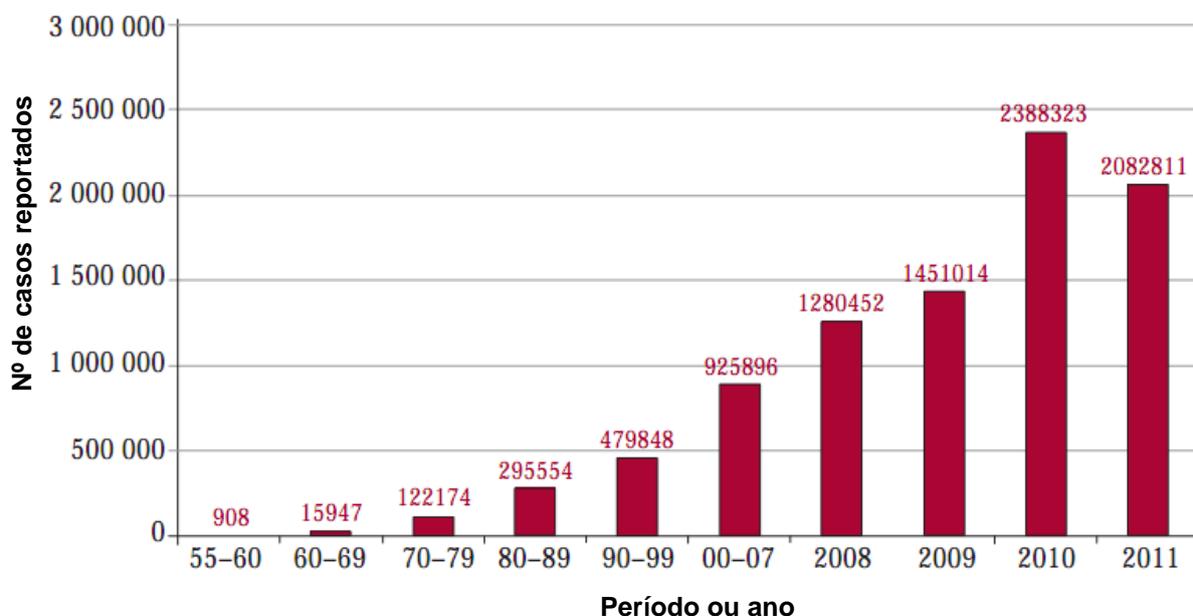


Figura 1.8 Média anual de casos de dengue e dengue grave reportado pela OMS, 1955–2011 (WHO, 2013).

1.8.1 Dengue nas Américas

A dengue foi introduzida nas Américas no século XVII, quando surgiram os primeiros relatos de doença similar a dengue em 1635 na Martinica e Guadalupe, e em 1699 no Panamá. No século XIX surtos de dengue foram comuns em cidades portuárias do Caribe, Américas do Norte, Central e Sul, mais relacionadas a atividades comerciais. Em 1818, um surto de uma doença semelhante a dengue no Peru causou aproximadamente 50.000 casos. Entre 1827 e 1828, um surto envolvendo o Caribe e o Golfo do México também foi reportado. Este surto iniciou nas Ilhas Virgens e se expandiu para Cuba, Jamaica, Colômbia, Venezuela, algumas cidades portuárias dos Estados Unidos e México. Embora originalmente este surto tenha sido descrito como dengue, as características clínicas indicam que tenha sido causada pelo vírus chikungunya, sugerindo a entrada deste vírus nas Américas a partir dos navios negreiros africanos. Algumas evidências de doença semelhante a dengue foram relatadas em surtos ocorridos em Nova Orleans, Cuba e Brasil, entre os anos de 1845 a 1849. Em 1850, uma epidemia da dengue foi relatada em algumas cidades dos Estados Unidos e Havana, Cuba e em 1851, evidências de casos de dengue foram descritas em Lima, Peru. Nos anos seguintes, surtos

esporádicos foram relatados no Golfo e portos do Atlântico nos Estados Unidos, sendo o maior em 1873, em Nova Orleans, com 40 mil pessoas afetadas. Outra grande epidemia em várias cidades portuárias do sul dos Estados Unidos foi registrada entre 1879 e 1880 (Brathwaite Dick et al., 2012).

No final do século XIX e início do século XX, uma ampla distribuição de doença semelhante a dengue foi descrita, incluindo países do norte, como o Estados Unidos até do sul, Chile e Argentina. Entre 1880 e 1912, os surtos foram notificados em Curitiba (Brasil); Iquique, Antofagasta, Tarapaca, Tacna e Arica (Chile); Texas e Flórida (Estados Unidos), Havana (Cuba); Bahamas, Bermuda, e Canal do Panamá. Nos anos seguintes, até 1916, epidemias foram reportadas nas Ilhas Virgens, Porto Rico, Rio Grande do Sul (Brasil) e na Argentina. Já em 1918, um surto foi relatado em Galveston, no Texas, seguido por outro de maior proporção em 1922, com uma estimativa de 30 mil casos de doença “tipo” dengue. No mesmo período um surto foi descrito em Niterói, Brasil. Em 1934, uma grande epidemia iniciou em Miami atingindo ~10% da população. Entre 1941 e 1946 a dengue continuou a dispersar com surtos no Texas (1941); na zona do canal do Panamá (1941-42); Havana, Cuba (1944); Porto Rico (1945); Caracas e Venezuela (1945-46); Bermudas, Bahamas e Sonora, no México (Brathwaite Dick et al., 2012).

Um programa de erradicação do *Ae. aegypti* iniciado pela Organização PanAmericana de Saúde (OPAS) nas décadas de 1940 e 1950 para prevenir epidemias urbanas de febre amarela resultou na diminuição significativa das epidemias de dengue nas Américas. O programa foi bem sucedido em vários países, alcançando a erradicação no México, Guatemala, Belize, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Peru, Chile, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai, Brasil, Ilhas Caiman e Bermudas. Porém, o mesmo não foi observado no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Ilhas Caribenhas e Estados Unidos. No entanto, a descontinuação do programa no início da década de 1970 e a falta de eliminação do vetor em algumas regiões resultou em reinfestação do vetor nas décadas subseqüentes e em 1995, o vetor já apresentava uma distribuição similar aquela da década de 1940 (Gubler, 1997).

Antes de 1977, somente o DENV-2 e 3 estavam presentes nas Américas, sendo o DENV-1 introduzido neste período, causando epidemias na Jamaica e Cuba e em 1978 em Porto Rico e Venezuela. Nos quatros anos subseqüentes, este sorotipo dispersou por todas as Ilhas do Caribe, México, Texas, América Central e

norte da América do Sul, causando grandes epidemias e surtos. Em 1981, o DENV-4 foi introduzido no leste das Ilhas do Caribe e dispersou rapidamente para outras regiões, muitas com recente relato de epidemias pelo DENV-1. Algumas dessas epidemias de DENV-4 foram associadas com casos esporádicos de FHD/SCD (Gubler, 1997; Guzman & Kouri, 2003).

Ainda em 1981 uma nova cepa de DENV-2 foi introduzida em Cuba proveniente do Sudeste Asiático, trazidas provavelmente dos soldados cubanos infectados no Vietnã entre os anos de 1977-1980, período de epidemias anual de dengue neste país (Rico-Hesse, 1990). A epidemia de DENV-2 em Cuba foi a primeira epidemia de FHD nas Américas, com uma estimativa de 10.000 casos de FHD/SCD (Gubler, 1997; Guzman & Kouri, 2003).

A segunda maior epidemia das Américas de FHD/SCD ocorreu na Venezuela em 1989-90 com mais de 6.000 casos e 73 óbitos, não se sabendo ao certo qual sorotipo foi o responsável, uma vez que o DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foram isolados (Gubler, 1997; Guzman & Kouri, 2003).

Em 1990-91, os primeiros casos de FHD foram registrados no Rio de Janeiro (Brasil) (Nogueira et al., 1991), causados pelo genótipo Sudeste Asiático do DENV-2 (Rico-Hesse, 2003; Faria et al., 2013), que circulou com o DENV-1 (Nogueira et al., 1988; 1993).

Em 1994, o DENV-3 foi reintroduzido no continente americano causando a maior epidemia de FD/FHD na Nicarágua e um pequeno surto associado a DC no Panamá. Esse vírus era geneticamente distinto do DENV-3, anteriormente circulante nas Américas, e foi demonstrado pertencer ao mesmo genótipo (III) que causou a epidemia de FHD na Sri Lanka e Índia, indicando a introdução da cepa asiática. Este DENV-3 se dispersou pela América Central e México em 1995 (Gubler, 1997; Guzman & Kouri, 2003; Brathwaite Dick et al., 2012) e em 1998 foi detectado em Porto Rico, e dispersou para outras ilhas caribenhas e América do Sul (Guzman & Kouri, 2003).

Em 1997 foi reportado um pequeno surto de DENV-2 em Santiago de Cuba, não sendo detectada transmissão autóctone para outros municípios da província ou país (Kourí et al., 1998; Guzman et al., 2000). Em 1998 um aumento considerável dos casos foi registrado no México, Venezuela, Colômbia e Brasil. No mesmo ano, epidemias foram registradas em alguns países como Argentina onde a doença não era detectada há 82 anos (Brathwaite Dick et al., 2012).

Em 2001 ocorreu uma epidemia no Peru, com 23.329 casos notificados, com os quatro sorotipos isolados e casos de FHD. Durante o ano de 2002, um número recorde de 1.015,420 casos foi registrado, incluindo 14.374 casos de FHD e 255 óbitos (Brathwaite Dick et al., 2012). Naquele ano, o Brasil foi responsável por mais de 75% do número total de casos (Nogueira et al., 2002)

No ano de 2005, na Costa Rica, ocorreu uma epidemia com aproximadamente 38.000 casos de dengue e 45 de FHD. Neste período, o DENV-2 foi reintroduzido no país, onde já estava circulando o DENV-1. Nos anos seguintes (2006-2007) ocorreu uma epidemia no Paraguai, com ~4.200 casos de dengue e circulação do DENV-3. No entanto, em 2007, mais de 28 mil casos de dengue, incluindo 52 casos de FHD e 13 óbitos foram registrados naquele país (Brathwaite Dick et al., 2012). No mesmo ano, 559.954 casos suspeitos de dengue foram registrados no Brasil, com 1.514 casos de FHD e 158 casos fatais por FHD (SVS/MS, 2008a). Em 2008, a reemergência do DENV-2 causou uma epidemia com mais de 700 mil casos suspeitos, mais de 4 mil casos confirmados de FHD e 223 óbitos, até a semana epidemiológica 48 (SVS/MS, 2008b).

Em 2009 várias epidemias na América do Sul foram identificadas. Na Bolívia houve uma epidemia fora do padrão para o país, com mais de 84.000 casos de dengue, com 198 casos FHD, 25 mortes, com a co-circulação do DENV-1, DENV-2 e DENV-3. No mesmo período, a Argentina relatou uma epidemia causada pelo DENV-1 com mais de 26 mil casos confirmados e cinco mortes por FHD e SCD. No México, mais de 250 mil casos foram registrados com a detecção dos quatro sorotipos. Naquele ano, a Nicarágua notificou mais de 17 mil casos de dengue, causados pelo DENV-3, DENV-1 e DENV-2 (Brathwaite Dick et al., 2012).

Em 2010, mais de 1,7 milhões de casos de dengue, 50.235 casos graves, e 1.185 casos fatais foram registrados, com uma incidência >200 casos/100.000 habitantes. Vários países sofreram surtos de dengue, com um total de casos que excederam os dados históricos conhecidos, incluindo a introdução da dengue em Key West, Flórida, EUA. No Brasil, o número de pessoas infectadas excedeu 1 milhão de casos, confirmando 17.489 casos de FHD e 678 casos fatais (Siqueira Júnior, 2011). Honduras, Caribe, Guadalupe, Martinica, República Dominicana e Porto Rico também registraram epidemias importantes (Brathwaite Dick et al., 2012).

No caso dos EUA, ambas as espécies de vetores de dengue são amplamente distribuídas nas regiões do sul do país, e um ou outro vetor da dengue

está presente em todos os territórios insular dos EUA. Viajar, especialmente por via aérea, já tem sido considerado um importante fator de risco para a disseminação rápida de patógenos e seus vetores de forma eficiente. Os EUA possuem centros importantes para viagem aérea, conseqüentemente, recebem um grande número de indivíduos potencialmente infectado com agentes patogênicos que causam doenças assintomáticas, incluindo vários arbovírus (como o vírus da dengue). Assim, existe um risco crescente de introdução de patógenos aos conglomerados urbanos onde mosquitos vetores estão presentes ou têm potencial para se estabelecer (Añez & Rios, 2013).

Nos EUA pela primeira vez, após várias décadas de ausência de dengue, um panorama preocupante é esperado. Esta preocupação tem sido relatada antes e após a reemergência da dengue na Flórida, em 2009. Tal preocupação é aumentada pelas condições climáticas e ecológicas que favorecem a sustentabilidade do vetor e pela alta ocorrência de viagens com posterior importação de casos. Os casos de dengue decorrentes de viagens para países da América Central, América do Sul e Caribe, destino muito procurados pelos turistas norte americanos, tem contribuído para o aumento da dengue nas últimas décadas (Añez & Rios, 2013).

Durante o ano de 2013 até a 21^a semana epidemiológica, 868.653 casos de dengue foram registrados nas Américas, sendo 8.406 casos de dengue grave e 346 casos fatais, com a co-circulação dos quatro sorotipos na região. No primeiro semestre de 2013, epidemias de dengue foram identificados no Brasil, Costa Rica, Colômbia, Paraguai e República Dominicana. No Peru, foram registrados casos em áreas onde não houve casos autóctones de dengue anteriormente. Dado o comportamento habitual da dengue na região, é esperado nos próximos meses um aumento de casos na América Central, México e Caribe, que coincide com a estação das chuvas nesses países (PAHO, 2013).

1.8.2 Dengue no Brasil

Em 1981, na cidade de Boa Vista, Roraima, ocorreu um surto de dengue onde as primeiras amostras de DENV-1 e DENV-4 foram isoladas e um total de sete mil casos da doença foram notificados (Osanai et al., 1983). Porém, a atividade dos

DENV têm crescido de modo significativo no Brasil após a introdução do vírus dengue tipo 1 (DENV-1) no estado do Rio de Janeiro, em Nova Iguaçu no ano de 1986 (Schatzmayr *et al.*, 1986; Dietz *et al.*, 1990; Miagostovich *et al.*, 1993; Figueiredo, 1996). A grande circulação de pessoas nesta região facilitou a rápida dispersão do vírus, causando uma epidemia explosiva, com 92 mil casos reportados durante os anos de 1986-1987 (Nogueira *et al.*, 1999; 2002). Após o Rio de Janeiro, o DENV-1 alcançou vários estados do nordeste, todos com infestação elevada do vetor, em especial Alagoas, Pernambuco e Ceará (Nogueira *et al.*, 1988; Schatzmayr & Cabral, 2012). Estima-se que mais de dois milhões de casos clínicos ocorreram principalmente ao longo da costa leste do Brasil, durante o ano seguinte aos primeiros isolamentos do vírus (Nogueira *et al.*, 1988) e o DENV-1 era o único sorotipo circulante no país até 1990, quando o DENV-2 foi introduzido (Nogueira *et al.*, 1990).

O DENV-2 foi isolado na cidade de Niterói, na Região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro no ano de 1990, e a situação do dengue no país se agravou a partir da introdução deste novo sorotipo, sendo, notificados os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira *et al.*, 1990; 1991; 1993).

Em 1995-1996, uma nova epidemia foi reconhecida no estado do Rio de Janeiro sendo os sorotipos isolados DENV-1 e DENV-2 (Nogueira *et al.*, 1999).

A introdução de um novo sorotipo (DENV-3) no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, no final de 2000 (Nogueira *et al.*, 2000), resultou no ano seguinte, na co-circulação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), e na maior e, até então, a mais grave epidemia do país, no ano de 2002 (De Simone *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2002; OPAS, 2002).

Desde a última epidemia em 2002, até o ano de 2007 o sorotipo predominante até a semana epidemiológica 48 no estado do Rio de Janeiro era o DENV-3 (SVS/MS, 2008b). Porém, o DENV-2 ressurgiu em 2007 ocasionando uma extensa epidemia no ano de 2008, com 657.818 casos notificados, um total de 4.455 casos de FHD e 259 óbitos por FHD no Brasil, sendo o estado do Rio de Janeiro o mais afetado com 251.346 casos, com 263 óbitos (106 por FHD e 157 por DCC) (SVS/MS, 2008b; SESDEC, 2009; SVS/MS, 2013). Esta epidemia apresentou um aumento significativo no número de FHD em menores de 15 anos, representando cerca de 50% dos casos de dengue e 86% das mortes ocorrendo em indivíduos nesta faixa etária (Teixeira *et al.*, 2009).

No ano de 2009 foram notificados 417.028 casos de dengue, destes 406.269 apresentando a forma clássica da doença, 10.418 casos de dengue grave (2.631 casos de FHD e 7.787 casos de DCC). Um total de 341 óbitos foi registrado, sendo 174 por FHD e 167 por DCC (SVS/MS, 2013)

Em 2010, foram registrados 1.029.678 casos de dengue, com 1.011.548 casos de dengue clássico, 17.474 casos graves (3.700 casos de FHD e 13.774 casos de DCC) e 656 óbitos, dos quais 300 por FHD e 356 por DCC. A região sudeste foi responsável por 478.003 casos da forma clássica, com os estados de Minas Gerais e São Paulo contribuindo cerca de 90% do total dos casos (SVS/MS, 2013). Este ano foi marcado pelo número elevado de casos de dengue, sendo uma das maiores epidemias ocorrida no país. O sorotipo predominante foi o DENV-1 que reemergiu no ano de 2009 (dos Santos et al., 2011).

A epidemia de 2010 apresentou um padrão espacial bastante distinto das epidemias de 2002 e 2008. Observou-se uma grande concentração de municípios com alta transmissão da doença na Região Centro-Oeste e parte da Região Sudeste. Os estados com maior número de casos registrados foram os estados de Minas Gerais (21,1%) e São Paulo (20,3%). O estado do Rio de Janeiro que foi o epicentro das epidemias anteriores representou apenas 2,9% dos casos. A principal alteração na epidemiologia foi a ocorrência de óbitos em pacientes que apresentavam comorbidades e a incidência foi de 538,4 casos por 100 mil habitantes. Destacam-se as taxas de internações de maiores de 60 anos de idade que apresentaram o maior incremento na comparação com o ano de 2008, onde as crianças foram as mais afetadas (Siqueira Júnior, 2011).

Em julho de 2010, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima (RR), cerca de 30 anos após a primeira detecção deste sorotipo no país ocorrida em Boa Vista (RR) em 1981-1982. Menos de 20 casos de DENV-4 foram confirmados neste estado ao longo do segundo semestre de 2010, e os primeiros casos decorrentes da dispersão do vírus foram detectados somente a partir de janeiro de 2011 no Amazonas e Pará (Região Norte). Em março, o vírus foi subsequentemente detectado na Região Nordeste (nos estados do Piauí, Pernambuco, Bahia e Ceará) e Região Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo). Os primeiros casos de DENV-4 detectado no RJ ocorreram na Região Oceânica do município de Niterói, localizado na região metropolitana, apenas 15 km de distância da capital (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

O número de casos de dengue em 2011 continuou elevado, porém menor do que no ano anterior. Um total de 775.060 casos foi notificado no país. Deste total, 764.032 foram referentes a casos de dengue clássico, 10.546 casos grave (7.744 por DCC e 2.802 por FHD) e 482 casos fatais (191 por FHD e 291 por DCC). No ano de 2012 foram notificados 594.343 casos da doença, com 589.591 casos de dengue clássico, 4.425 casos graves (3.429 por DCC e 996 por FHD) e 327 óbitos (121 por FHD e 206 por DCC) (SVS/MS, 2013).

Em 2013, até a 42ª semana epidemiológica foram registrados 1.476.917 casos notificados de dengue no Brasil, com predominância do DENV-4, que corresponde a 60% dos casos. Neste período foram confirmados 6.566 casos graves e 573 óbitos. A região Sudeste, responsável por 63,4% dos casos com 936.500 registros, tem o maior número de casos, seguida pela região Centro-Oeste (271.773 casos; 18,4%), Nordeste (149.678 casos; 10,1%), Sul (70.299 casos; 4,8%) e Norte (48.667 casos; 3,3%) (Rede Dengue, FIOCRUZ).

Nos últimos 27 anos extensas epidemias de dengue vêm ocorrendo no Brasil, com mais de oito milhões de casos notificados (SVS/MS, 2013; Silva Jr, 2013) (Figura 1.9).

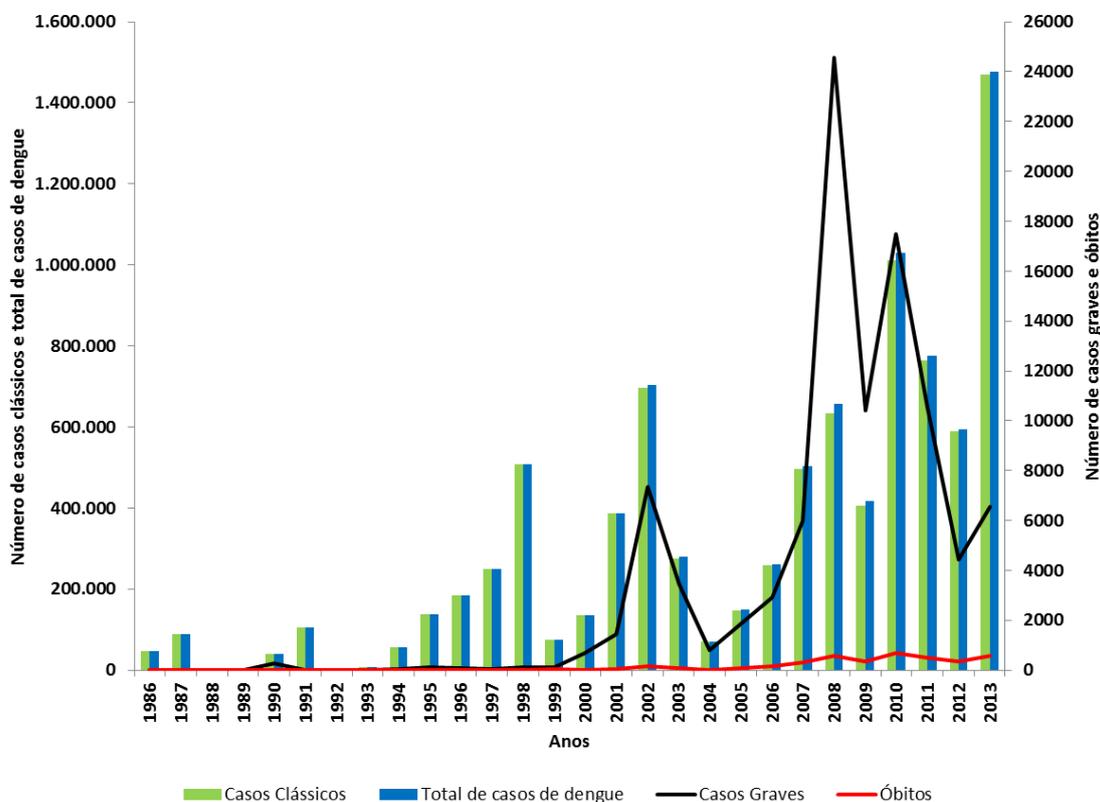


Figura 1.9 Número de casos de dengue no Brasil, 1986-2013.

A dispersão dos DENV pelo território brasileiro, com aumento nas notificações de casos de DC, FHD e óbitos ressalta a importância da vigilância virológica destes agentes no país. Como a dengue é uma doença viral sem tratamento específico e uma vacina anti-DENV eficaz ainda não se encontra disponível, apesar de inúmeros estudos e esforços para seu desenvolvimento desde a década de 40 (Sabin & Schlesinger, 1945; WHO, 2002), as medidas de controle ao vetor consistem no principal instrumento para a prevenção das infecções por estes vírus. Portanto, a participação da população é essencial para o controle da doença.

O monitoramento das infecções por DENV através de um programa de vigilância ativa em conjunto com ações envolvendo aspectos clínicos, epidemiológicos, virológicos, sorológicos e entomológicos, principalmente em períodos inter-epidêmicos, visa a detecção da circulação viral em tempo hábil para que sejam evitadas extensas epidemias (Gubler, 1989).

1.9 Manifestações clínica e classificação da dengue

A dengue é uma doença febril aguda, que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresenta: infecção inaparente, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque por dengue (SCD). Esse amplo espectro de manifestações clínicas que varia desde um quadro oligo ou assintomático, até formas mais graves, com hemorragia e choque, podendo evoluir pra o óbito. A sintomatologia da doença pode ser semelhante a outras enfermidades, usadas como diagnóstico diferencial tais como: gripe, rubéola, sarampo e outras infecções virais, bacterianas e exantemáticas, que dificulta em muitos casos o diagnóstico da doença (Souza et al., 2008; SVS/MS, 2010). O período de incubação do vírus no homem varia de 3 a 15 dias, após o qual a doença poderá evoluir para uma das formas clínicas.

1.9.1 Dengue clássica (DC)

A forma clássica da dengue apresenta como manifestação inicial a febre, normalmente de início súbito (podendo alcançar 40°C, diminuindo ao longo dos dias, persistindo em média por 2 a 7 dias) seguida de cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo, exantema ou prostração. A doença tem duração de 5 a 7 dias, mas o período de convalescença pode ser acompanhado de grande debilidade física, e prolongar-se por várias semanas (Souza et al., 2008; SVS/MS, 2010).

1.9.2 Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)

A FHD se caracteriza por manifestações hemorrágicas e/ou evidência de perda de plasma, podendo levar ao choque hipovolêmico. A fragilidade capilar é evidenciada pela positividade da prova do laço. Outras manifestações hemorrágicas incluem petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia, hemorragia em diversos órgãos (gastrointestinais, intracraniana, dentre outras) e hemorragia espontânea pelos locais de punção venosa. Nos casos graves de FHD, o choque geralmente ocorre entre o 3º e 7º dia de doença, geralmente precedido por dor abdominal. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguida de extravasamento plasmático (evidenciado por hemoconcentração, derrames cavitários e hipoalbuminemia) e falência respiratória. É de curta duração podendo levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida, após terapia antichoque apropriada (SVS/MS, 2010).

Segundo a OMS, a definição de FHD é baseada em critérios clínicos e laboratoriais. Após o preenchimento desses critérios, os casos devem ser classificados quanto à gravidade de acordo com as categorias que variam do grau I ao grau IV. Os quatro graus preenchem todos os critérios de FHD, porém se diferenciam pelo tipo de manifestação hemorrágica, ou seja, no grau I: a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva; grau II há manifestações hemorrágicas espontâneas (sangramento de pele, petéquias, epistaxe,

gengivorragia e outros). O grau III: apresenta colapso circulatório com pulso fraco e rápido, diminuição da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação; e o grau IV apresenta choque profundo, com pressão arterial e pulso imperceptíveis (SVS/MS, 2010).

1.9.3 Dengue com complicações (DCC)

Estabelecida pelo Ministério da Saúde, Brasil, a classificação de DCC, inclui os pacientes graves que não preenchem os critérios de FHD da OMS, e não podem ser definidos como dengue clássica. Enquadram-se nessa categoria os que apresentam um dos itens a seguir: plaquetopenia ≤ 50.000 céls/mm³, contagem de leucócitos ≤ 1.000 céls/mm³, hepatite por dengue, insuficiência hepática, miocardite, encefalite, hemorragia abundantes, alterações graves do sistema nervoso, disfunção cardiorrespiratória, hemorragia digestiva, derrames cavitários e óbito (Tristão Sá & Zagne, 2008; SVS/MS, 2010).

1.9.4 Nova classificação proposta pela OMS (2009)

Mudanças na epidemiologia da dengue dificultaram a aplicação da forma da classificação até então utilizada, estabelecida pela OMS em 1997 e baseada no padrão da dengue de origem asiática. Neste cenário, a OMS em 2009 preconizou uma nova forma de classificação dos casos de dengue onde seria possível definir os casos de dengue como: dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG) (Figura 1.10). Tal proposta foi desenvolvida a partir de um estudo prospectivo multicêntrico em várias regiões endêmicas de dengue, utilizando critérios de gravidade (OMS, 2009; SVS/MS, 2010).



Figura 1.10 Classificação dos casos de dengue e níveis de gravidade (OMS, 2009).

1.10 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial das infecções pelos DENV é realizado através do isolamento viral e/ou detecção do ácido nucléico viral, de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos (IgM/IgG) e captura de antígeno (NS1), e pela detecção de antígenos virais em tecidos (Igarashi, 1978; Kuno, 1987; Chungue, 1989; Hall, 1991; Lanciotti, 1992; Miagostovich, 1997; 1999).

O estabelecimento da cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral representou um grande avanço aos métodos virológicos utilizados no diagnóstico do dengue (Gubler & Sather, 1988). O clone C6/36 (Igarashi, 1978) tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de sua fácil manutenção, já que pode ser mantida à temperatura ambiente (Nogueira *et al.*, 1988; Miagostovich *et al.*, 1993).

A presença viral pode ser detectada pelo efeito citopático (ECP) na monocamada celular ou pela técnica de imunofluorescência indireta, com a

utilização de soros hiperimunes aos quatro sorotipos dos DENV. Para a identificação dos DENV, utilizam-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (DENV-1 a 4) (Gubler *et al.*, 1984).

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções por dengue (Lanciotti *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 1997; De Paula *et al.*, 2002). Esses protocolos têm sido úteis tanto para a clínica quanto para a vigilância virológica e são importantes por identificar o sorotipo infectante (Morita *et al.*, 1991; Lanciotti *et al.*, 1992).

A sorologia é o método utilizado para confirmação laboratorial de rotina. Através das técnicas sorológicas é possível detectar infecções atuais ou recentes, por meio da captura das imunoglobulinas da classe M (IgM) por ELISA (MAC ELISA). Na maioria dos casos, somente uma amostra de soro coletada é suficiente para a confirmação diagnóstica, contudo um resultado negativo em amostra coletada em fase precoce (6 a 10 dias após o início dos sintomas) não exclui o diagnóstico de dengue, uma vez que, em alguns casos, os níveis de IgM tornam-se detectáveis pelo teste somente após esse período. O anticorpo IgM anti-dengue desenvolve-se rapidamente, geralmente a partir do quinto dia do início da doença, e tanto em infecções primárias, quanto secundárias, apresentam esses anticorpos detectáveis. A pesquisa de anticorpos IgG (ELISA) e o teste de inibição de hemaglutinação (HI), que exigem amostras do soro pareadas (fase aguda e convalescente recente) de casos suspeitos também podem ser utilizadas no diagnóstico sorológico (SVS/MS, 2010). Miagostovich e colaboradores (1999) avaliaram a técnica IgG (ELISA) em substituição ao uso do HI, e concluíram que o teste IgG ELISA pode substituir o teste HI para caracterizar o tipo de infecção, se primária ou secundária.

A detecção de antígeno NS1 pode ser realizada através de método imunoenzimático (ELISA) ou por testes imunocromatográficos rápidos, disponíveis comercialmente, que permitem a detecção de antígenos NS1 virais específicos, precocemente. É um método que, a princípio, é bastante sensível e deve ser utilizado em pesquisas e nos casos graves. O Ministério da Saúde disponibiliza kits de teste NS1 ELISA para triagem das amostras para isolamento viral em unidades sentinelas (SVS/MS, 2010). Pesquisas de avaliação dos kits para detecção do antígeno NS1 disponíveis para o diagnóstico da dengue indicam que os kits comerciais são úteis para o diagnóstico laboratorial da dengue primária e secundária

na fase aguda e que detecção do NS1 deve ser usado em combinação com o MAC-ELISA para a detecção de casos e como triagem para complementar o isolamento viral (Lima et al., 2010). Além disso, a técnica é uma nova alternativa para diagnóstico em casos fatais através da detecção do antígeno NS1 em tecidos (Lima et al., 2011).

A imunohistoquímica também pode ser realizada em cortes de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina, permitindo a detecção de antígenos virais. Os cortes são corados pela fosfatase alcalina ou peroxidase marcados com anticorpos específicos. Essa técnica é bastante sensível e específica, sendo considerada exame confirmatório e deve ser utilizada após diagnóstico histopatológico presuntivo (SVS/MS, 2010).

Além dos métodos de diagnóstico utilizados na rotina, métodos moleculares como a PCR seguido a sequenciamento genômico viral são de grande importância para a vigilância dos sorotipos e/ou genótipos de DENV circulantes em uma dada região e a estratégia de sequenciamento vai depender do objetivo proposto. Para a caracterização molecular e genotipagem dos sorotipos circulantes de DENV utiliza-se o sequenciamento parcial (gene E) ou completo, com o uso de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificam o genoma dos DENV (Miagostovich et al., 2006).

1.11 Vacinas contra os DENV

Desenvolver uma vacina contra o DENV tem sido prioridade pela OMS, porém o desenvolvimento tem enfrentado algumas dificuldades, tais como: a necessidade de imunizar contra os quatro sorotipos com alta eficiência para evitar o desencadeamento de uma doença grave em caso de infecção secundária e a ausência de um modelo experimental para estudar a resposta pós-vacinal. Uma vacina ideal deve promover uma imunização prolongada contra os quatro sorotipos do DENV; ser de baixo custo e toxicidade e manter títulos virais em refrigeração ou à temperatura ambiente (Figueiredo, 1999).

Diversas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina eficaz estão sendo utilizadas como as vacinas de vírus vivo atenuado, de vírus inativados vacinas recombinantes, quiméricas e de DNA. Atualmente as vacinas desenvolvidas

e em fase experimental utilizando vírus vivo atenuado são da GlaxoSmithKline (GSK), em fase II; Biological E, Panacea, em fase I/II; Biotec, Butantan, em fase I/II; e Vabiotech, fase I/II. Já as vacinas contendo vírus vivo quimérico são as da Sanofi Pasteur, em fase III e Inviragen, em fase I (Murrel et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e no Brasil a atividade dos DENV têm crescido de modo significativo desde a introdução do DENV-1 no Rio de Janeiro (RJ) em 1986. Após a co-circulação com DENV-2 e DENV-3 em 2000/2001, este sorotipo re-emergiu em 2009 após aproximadamente oito anos sem intensa circulação, causando em 2010 mais de um milhão de casos prováveis da doença, com a maior taxa de internações registradas no país (cerca de 90 mil), principalmente em maiores de 60 anos de idade. Mesmo com a introdução do DENV-4 em um país totalmente susceptível, a circulação do DENV-1 foi responsável por epidemias com mais de dois milhões de casos suspeitos entre 2010 e 2011 sendo isolado em 36,4% das amostras no país em 2012.

Nos últimos 27 anos, o Brasil foi acometido por epidemias causadas por introduções de novos sorotipos de DENV assim como pela reemergência destes. Este padrão de substituições e co-circulação dos DENV vem sendo descrito não só no Brasil, como em outros países das Américas e Ásia. Nesse contexto, o monitoramento dos sorotipos é de grande importância e assim como há substituição e co-circulação de sorotipos faz-se necessário a vigilância dos genótipos circulantes, uma vez que alguns estão associados a uma maior gravidade da doença, como os de origem asiática. A análise filogenética dos DENV-1 isolados desde a introdução deste sorotipo no país caracterizou estes vírus como pertencentes ao genótipo V (América/África).

Estudos filogenéticos e de caracterização molecular podem constituir uma importante ferramenta para monitorar a introdução, dispersão e recombinação dos vírus, bem como prever as possíveis consequências epidemiológicas de tais eventos. Para o DENV-1 além dos genótipos, a existência de linhagens com distintas relações geográficas e temporais foi sugerida, demonstrando alta variabilidade genotípica. Além disso, relatos de múltiplas linhagens para o genótipo V (América/África) e eventos de recombinação foram descritos para os vírus isolados no Brasil, principalmente para o DENV-1. Recombinação ao longo do genoma completo pode ter efeito deletério, sendo talvez o motivo de não ser muito evidente. Diante disso, neste estudo, a filogenia dos DENV-1 isolados em alguns estados do Brasil ao longo dos 25 anos desde a sua introdução (1986) até 2011 foi realizada a

fim de documentar possíveis padrões evolutivos ou introduções de genótipos e linhagens no país.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar a análise molecular dos DENV-1 circulantes no Brasil durante períodos epidêmicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a análise filogenética e caracterização molecular do gene E (1.485 nucleotídeos) dos DENV-1 isolados nos períodos epidêmicos entre os anos de 1986 a 2011;
- Realizar a análise filogenética e caracterização molecular baseada na sequência completa da região codificante (10.176 nucleotídeos) dos DENV-1 representantes do período de estudo;
- Analisar possíveis eventos de recombinação entre as cepas brasileiras isoladas e as demais sequências de referência disponíveis no GenBank.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas virais

Foram analisadas cepas de DENV-1 (n=48), provenientes de amostras clínicas de pacientes positivos para dengue por isolamento viral e/ou RT-PCR recebidas no Laboratório de Flavivirus (LABFLA), IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue e Febre Amarela, procedentes de epidemias ocorridas entre 1986 e 2011, no estado do RJ e estados da área de abrangência do LABFLA. As amostras de DENV-1 foram selecionadas de acordo com o ano de isolamento, estado de origem e manifestação clínica. Do total de amostras, 43 foram submetidas ao isolamento viral e cinco soros positivos para DENV-1 foram utilizados diretamente para extração do RNA viral.

As amostras clínicas (soro) foram encaminhadas ao LABFLA refrigeradas ou congeladas. Duas alíquotas de cada amostra foram realizadas dentro de cabine de segurança biológica em tubos estéreis, identificados com o número de registro da amostra, onde uma foi destinada para estudos sorológicos (armazenadas a -20°C) e outra para o isolamento viral e testes moleculares (armazenado a -70°C). Após o isolamento viral o sobrenadante das culturas contendo vírus isolado foi congelado em tubos estéreis, identificados com o número de registro da amostra, data de isolamento e congelamento, acrescido de 30% de soro fetal bovino (SFB) a -70°C.

4.2 Isolamento viral

Quarenta e três cepas utilizadas neste estudo foram originadas de uma passagem dos isolados originais provenientes das amostras clínicas dos pacientes. Para isso, foi realizado o isolamento viral em cultura de células clone C6/36, do mosquito *Aedes albopictus*, cultivadas em meio de cultura celular acrescido de soro fetal bovino (SFB) (Igarashi, 1978).

As células foram cultivadas em tubos de 1,5x16 cm contendo 1,5 mL de meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA), com 10% de SFB (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) em estufa a 28°C. Após

formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de L-15 contendo 2% de SFB.

O volume de 25µL do sobrenadante do isolado original foi inoculado na monocamada celular. Para cada grupo de isolados inoculados, foram incluídos controles positivos e negativos, respectivamente, de vírus (amostra já identificada como DENV) e de células (cultura não inoculada). Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período aproximado de 10 a 14 dias, em microscópio óptico invertido (Zeiss - Deutschland, Alemanha), com aumento de até 400 vezes.

4.3 Extração do RNA viral

O RNA viral foi extraído a partir de 140µL do sobrenadante das culturas isoladas através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.4 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti *et al.* (1992) para confirmação da positividade das cepas isoladas para DENV-1. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM. No procedimento *semi-nested*, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 4.1).

O RNA extraído foi transcrito reversamente em cDNA (42°C/60 minutos) em uma primeira etapa (Figura 4.1 A) e as condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 30 ciclos subseqüentes de desnaturação (94°C/35 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 3.2.

Em uma segunda etapa (etapa *semi-nested* – Figura 4.1 B) para a tipagem dos DENV, os produtos obtidos na primeira etapa foram diluídos (1/100) em água livre de DNase e RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen, California, EUA) e submetidos a 18 ciclos de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e extensão final (72°C/5 minutos) utilizando os reagentes descritos na Tabela 3.2. Após a *semi-nested* PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido de 5µL de solução de brometo de etídeo 10 mg/mL (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) por 60 minutos e visualizados em luz ultravioleta em capturador de imagem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA).

Tabela 4.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.

Oligonucleotídeo iniciador (Sentido)	Seqüência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+) D2 (-)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3' 5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC- 3'	134-161 616-644	 511
TS1 (-) TS2 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3' 5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	568-586 232-252	482 (D1 + TS1) 119 (D1 + TS2)
TS3 (-) TS4 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3' 5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	400-421 506-527	290 (D1 + TS3) 392 (D1 + TS4)

* Invitrogen, California, EUA

Lanciotti et al., 1992.

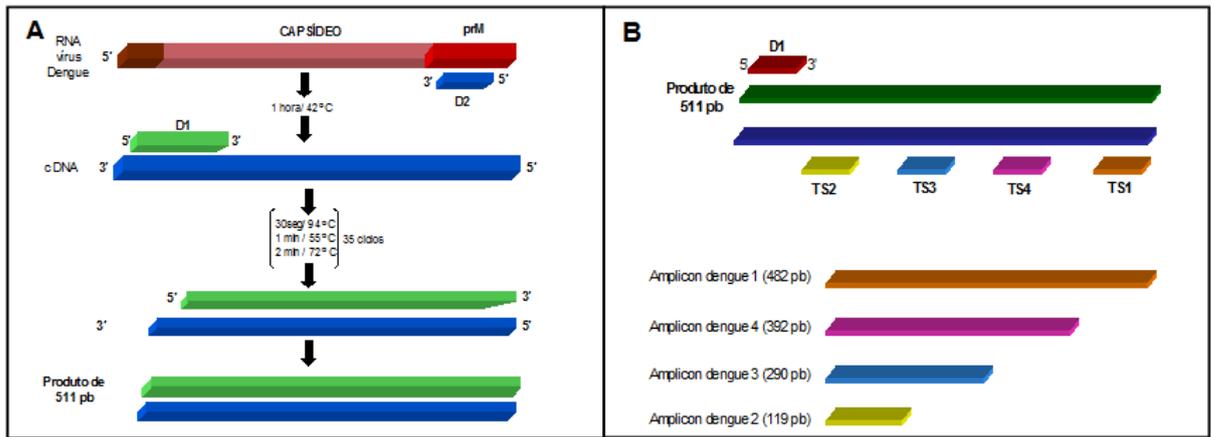


Figura 4.1 Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti et al., 1992. A: Transcrição reversa e amplificação do RNA viral utilizando iniciadores consensuais. B: Tipagem dos vírus dengue (*semi-nested* PCR) utilizando iniciadores tipo-específicos.

Tabela 4.2 Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

MIX 1 - MISTURA PARA A PRIMEIRA ETAPA DA RT-PCR				MIX 2 - MISTURA PARA A SEGUNDA ETAPA SEMI-NESTED PCR			
Reagente	Fabricante	Concentração	µL/tubo	Reagente	Fabricante	Concentração	µL/tubo
ddH ₂ O	Promega	-	9,8	ddH ₂ O	Promega	-	3,7
PCR Master Mix	Promega	2X	25,0	PCR Master Mix	Promega	2X	25,0
Primer D1	Invitrogen	10µM	1,3	Primer D1	Invitrogen	10µM	1,3
Primer D2	Invitrogen	10µM	1,3	Primer TS1-TS4	Invitrogen	20µM	2,5
DTT	Sigma-Aldrich	100Mm	2,5				
AMV-RT	Promega	2.5U/ µL	0,1				

4.5 Eletroforese em gel de agarose

Em um Erlenmeyer, foi dissolvido 1,5g de agarose em 100mL de Tris-ácido bórico – EDTA (TBE 0,5X), aquecendo a solução no forno de microondas (potência máxima) por 1 minuto, seguindo da homogeneização manual e aquecimento posterior de mais 1 minuto. A solução foi resfriada e 5µL de brometo de etídio (10 mg/mL) foi adicionado dentro da capela de exaustão, onde o gel foi transferido para um molde de acrílico, colocando-se pente para geração dos poços, permanecendo desta forma por ~15 min para a solidificação. Após endurecimento o

gel foi acondicionado em cuba de eletroforese contendo TBE 0,5X. As amostras diluídas 1:5 em azul de bromofenol foram aplicadas nos poços. A eletroforese foi realizada a 100 V por ~60min.

4.6 Caracterização molecular

A caracterização molecular dos vírus isolados foi realizada através do sequenciamento genômico, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificam fragmentos sobrepostos de aproximadamente 900 pares de base (pb) ao longo do genoma parcial e/ou completo do DENV-1 (dos Santos *et al.*, 2011).

4.6.1 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para sequenciamento

A técnica de RT-PCR para sequenciamento foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Miagostovich *et al.* (2006). Os reagentes utilizados nesta técnica estão descritos na Tabela 4.3.

Para o sequenciamento de DNA, foram utilizados quatro ou 16 pares de iniciadores para amplificação de fragmentos sobrepostos de aproximadamente 900 pb ao longo do genoma parcial e/ou completo do DENV-1, respectivamente (Figura 4.2; Tabela 4.4). O RNA extraído foi transcrito em cDNA e amplificado através da RT-PCR para sequenciamento utilizando o kit AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em tudo tipo eppendorf de 0,2mL foi acrescentado 45µL da mistura de reagentes e 5µL do RNA extraído.

A transcrição reversa do RNA e a amplificação do cDNA foi realizada seguindo os parâmetros de termociclagem apresentados na Tabela 4.5, em GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, California, EUA) (modificado de Miagostovich *et al.*, 2006).

Tabela 4.3 Reagentes utilizados na RT-PCR para o sequenciamento.

Reagente	Concentração	Volume
Access Quick™ RT-PCR	2X	25µL
Primer (sense)	10µM	2,5µL
Primer (anti-sense)	10µM	2,5µL
AMV-RT	5U	1µL
ddH ₂ O	-	14 µL

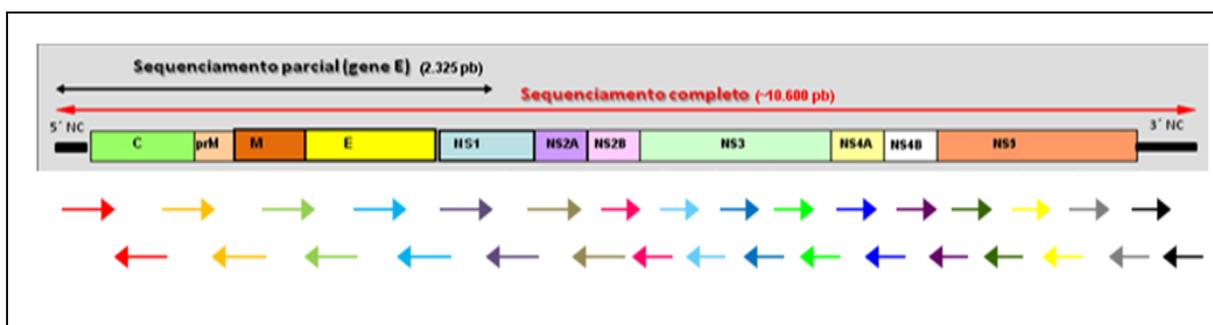


Figura 4.2 Estratégia de amplificação parcial (C/prM/M/E) e completo do genoma do DENV-1 por RT-PCR.

Tabela 4.4 Desenho de *primers* a partir do programa “primerexpress” para sequenciamento completo do genoma dos DENV1, de acordo com AF513110 (DENV-1). Produto amplificado de ~900pb por região (com ~200pb de sobreposição entre regiões).

Região	Primer sense A (5'- 3')	Primer antisense B (5'- 3')	Posição do genoma (de acordo com AF513110)	Produto (pb)	Tm (°C) A/B
1	TTA GTC TAC GTG GAC CGA CAA GAA	GCC TAT TCC CAC GCA TCG	6 – 938	932	62/63
2	TGA CCT ATG GGA CGT GTT CTC A	CAG TCC AAT GTG AGG GCT CC	660 – 1469	809	63/63
3	GAC GCG AAC TTT GTG TGT CG	GGC GCA TCT GTT CCT TCG TA	1193 – 1900	707	63/64
4	CTG GGA TCA CAA GAA GGA GCA	CCA ATG GCT GCT GAC AGT CTT	1691 – 2539	848	63/63
5	GGG ATT AAA TTC AAG GAG CAC G	ACT TGC CTA GAT GCC ATG GC	2332 – 3217	885	62/62
6	TGT GTG ACC ACC GGC TAA TG	CAT TGC AAG TCC ATC CCC TAG	2952 – 3842	890	63/62
7	CCT AGC CTT GAT GGC TAC TCT CA	GCC CAA CAG TCC TCT TTG CA	3697 – 4596	899	62/64
8	CCA CTT TGC TGG CAG TCT CA	TGT AAT TGG GAA CTC TCA CTG GG	4431 – 5335	904	63/62
9	CTC CCA CAA GAG TTG TCG CC	TCC CCG TCT ATT GCT GCA CT	5187 – 6068	881	63/63
10	TGC CCA AAG GAG AGG AAG AAT	GTC CTG TGG AGT GCG CTG T	5884 – 6751	867	62/63
11	TGA CGC TGT TCT TCC TAT CAG G	CCA GAA TTT TCC TGG AGA TCC C	6579 – 7447	868	62/63
12	GTG GAC GGG ATT GTT GCA AT	CCC TCC ATG TTT CCT TTG CA	7268 – 8160	892	63/63
13	CTG AGA AAT GTG ACA CCC TTC TGT	TTG GTT TTC ATC AAC GAA CAC TG	7983 – 8802	819	62/62
14	CAC ACC CTT CGG ACA ACA GA	CCA TGT TTT TCC AAC CAG TCA AG	8608 – 9500	892	62/63
15	AAA TGG AAC CGT GAT GGA TGT T	TCT CAT TCC CGA TGA GCC TT	9325 – 10183	858	63/62
16	GTG GAA TAG GGT TTG GAT AGA GGA A	TTC TGT GCC TGG AAT GAT GCT	10006 – 10675	669	63/63

*Invitrogen, California, EUA

Tabela 4.5 Parâmetros de termociclagem da RT-PCR para sequenciamento.

Etapas de termociclagem	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
RT	42°C	60 min	1 ciclo
Desnaturação	94°C	35 seg	
Anelamento	63°C	1 min	40 ciclos
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	∞	-

4.6.2 Purificação do DNA

O produto de DNA amplificado foi purificado utilizando o Kit comercial “PCR Purification” (QIAGEN, Inc., California, EUA) na presença fragmento amplificado único ou “Gel extraction” (QIAGEN, Inc., California, EUA), quando apresentou fragmentos inespecíficos, além do alvo. Os protocolos foram realizados de acordo com os descritos pelo fabricante.

4.6.3 Quantificação do DNA

Os produtos purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com 5µL de brometo de etídio (10mg/mL) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) utilizando marcador Low Mass DNA (Invitrogen, California, EUA), e o gel foi visualizado em luz ultravioleta.

4.6.4 Reação de sequenciamento

Os fragmentos de cDNA amplificados e purificados foram seqüenciados em ambas direções, utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction versão 3.1 (Applied Biosystems®, California, EUA). Os parâmetros de

termociclagem para a reação de sequenciamento seguem na Tabela 4.6, (modificado de Miagostovich et al., 2006).

Após a reação do sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separation, New Jersey, EUA) ou DyeEx 2.0 Spin Kit Procedure (QIAGEN, Inc., California, EUA), e armazenados a 37°C por 24h para secagem. O DNA foi ressuspenso em 10µL de Formamida e transferido para placa de 96 orifícios (MicroAmpOptical 96 Well Reaction Plate - Applied Biosystems®, California, EUA). A placa foi enviada para a Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde os produtos passaram por eletroforese capilar em Analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, California, EUA) (Otto et al., 2008).

Tabela 4.6 Parâmetros de termociclagem para a Reação de Sequenciamento.

Etapas de termociclagem	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação	94°C	1 min	35 ciclos
Anelamento	63°C	2 min	
Extensão	72°C	3 min	
Temperatura final	4°C	∞	-

4.6.5 Análise das seqüências

Para a análise dos produtos seqüenciados utilizou-se o programa Chromas® 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) ou BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A identidade da seqüência foi determinada através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando o software CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e as árvores filogenéticas foram construídas com suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) utilizando o Programa MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>) utilizando o método Neighbor-joining, modelo Tamura-Nei 93+G, de acordo com o resultado obtido pela ferramenta

disponível no MEGA 5 de escolha do melhor modelo de substituição baseado na Máxima Verossimilhança (MV).

4.6.6 *Localização das substituições de aminoácidos na proteína do envelope (E)*

Para determinação da localização dos aminoácidos substituídos na proteína do envelope viral foi utilizado o programa Protein Workshop (Moreland et al., 2005; Xu & Zhang, 2009), disponível no PDB (Protein Data Bank). Acesso:http://www.pdb.org/pdb/explore/viewerLaunch.do?viewerType=PW&structureId=3KZP&unit=bio&unit_id=1.

4.7 Análise de recombinação genômica

Para a verificação de eventos de recombinação ao longo do genoma completo dos DENV-1 isolados foi utilizado o programa RDP3 (Martin et al., 2010). O programa encontra-se disponível em <http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação de cepas de DENV-1

A confirmação das culturas celulares inoculadas com DENV-1 (n=43) foi confirmada através da RT-PCR utilizando iniciadores específicos e os produtos das ampliações de algumas cepas estão representadas na Figura 5.1.

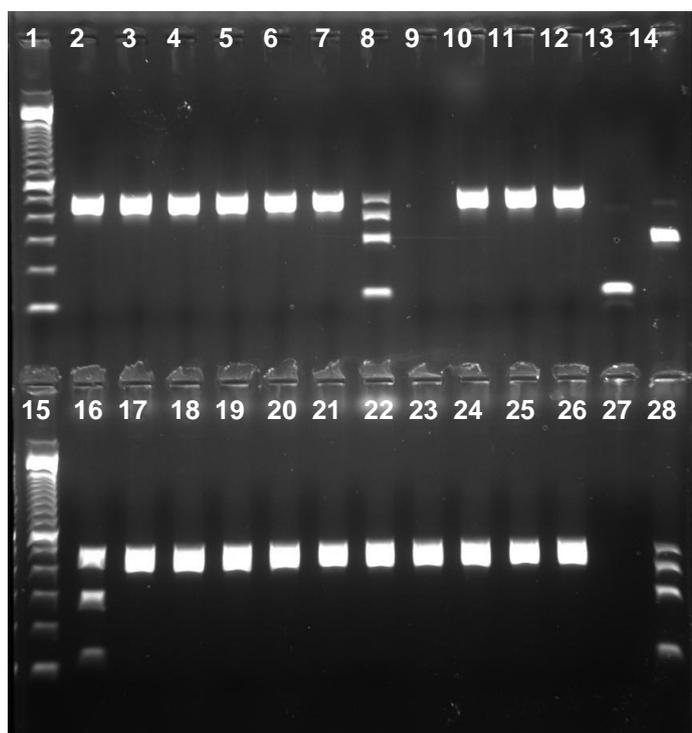


Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR (Lanciotti, 1992) para confirmação dos isolados com DENV-1 (fragmento com 482pb). Poços: 1 e 15 – padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 7, 10, 11, 17 a 26 – 19 amostras isoladas (com DENV-1); 9 e 27: controle negativo (água livre de nucleases); 12: controle positivo para DENV-1; 13: controle positivo para DENV-2; 14: controle positivo para DENV-3; 16: mistura dos controles positivos (DENV-1, 2 e 3); 8 e 28: mistura de controles positivos (DENV-1, 2, 3 e 4).

5.2 Caracterização molecular

A estratégia de amplificação utilizada permitiu a geração de produtos de aproximadamente 900pb para o sequenciamento parcial (Figura 5.2) e completo da

região codificante dos DENV-1 (Figura 5.3). Os mesmos foram purificados e posteriormente quantificados em gel de agarose a 2% (Figura 5.4).

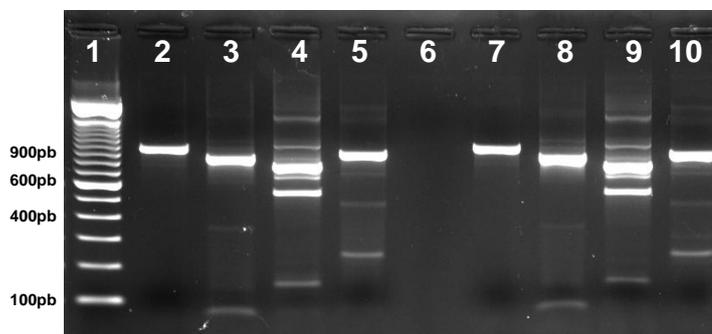


Figura 5.2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os quatro primeiros pares de *primers* para o DENV-1 (regiões C/prM/M/E). Poços: 1- padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 5 - amostra isolada; 6 - vazio; 7 a 10 - amostra isolada.

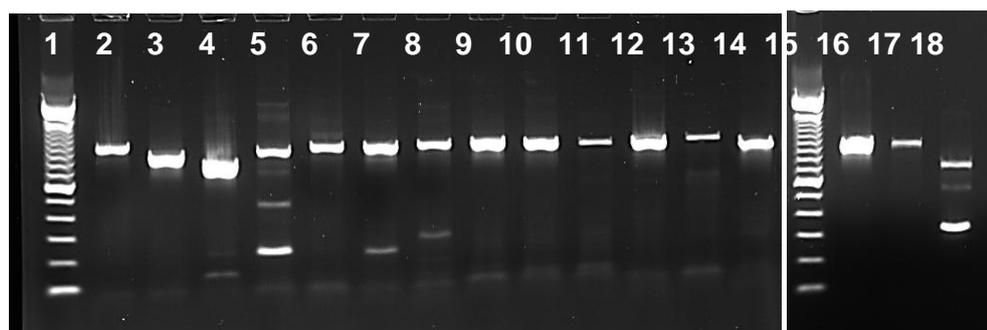


Figura 5.3 Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os 16 pares de *primers* para o DENV-1 (genoma completo). Poços: 1 e 15 - padrão de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 14 - fragmento amplificado de um DENV-1 isolado (*primers* 1 a 13, respectivamente); 16 a 18 - fragmento amplificado de um DENV-1 isolado (*primers* 14 a 16, respectivamente).

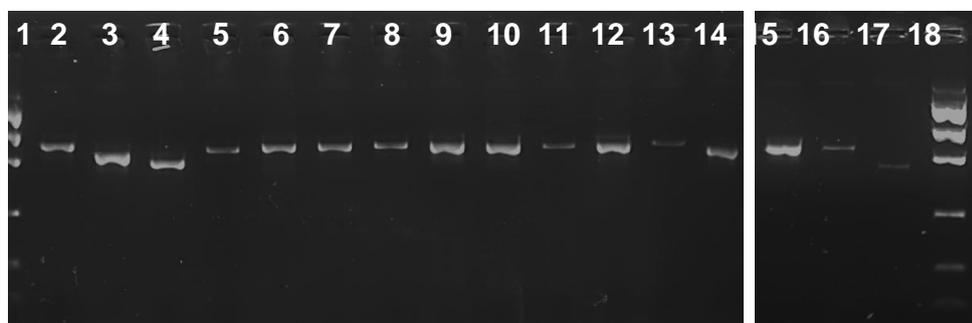


Figura 5.4 Quantificação por eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados por RT-PCR utilizando os 16 pares de *primers* para o DENV-1 (genoma completo). Poços: 1 e 18 - Padrão de massa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, California, EUA); 2 a 17 - fragmento amplificado de um DENV-1 isolado (*primers* 1 a 16, respectivamente).

Todas as 48 amostras (43 isoladas e 5 provenientes de soro) foram sequenciadas parcialmente (2.325 nucleotídeos correspondentes às regiões C/prM/M/E) utilizando quatro pares de iniciadores, e em seis destas, foi realizado o sequenciamento completo da região codificante (C a NS5) compreendendo 10.176 nucleotídeos com 16 pares de iniciadores que geraram fragmentos de 900pb, com sobreposição de 200pb aproximadamente. As 48 cepas de DENV-1 estudadas foram obtidas de casos que apresentam manifestações clínicas distintas, classificadas de acordo com a OMS (2009) como dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG). Do total, 22 amostras foram classificadas como DSSA; sete, DCSA; quatro, DG; seis casos fatais; e nove casos sem informações, impossibilitando a classificação (Tabela 5.1)

5.2.1 Caracterização molecular de cepas de DENV-1 baseada na análise do gene E

A origem geográfica das cepas isoladas abrangeu as regiões sudeste – Rio de Janeiro (RJ), Minas Gerais (MG) e Espírito Santo (ES); nordeste – Alagoas (AL), Ceará (CE), Piauí (PI) e Rio Grande do Norte (RN); e centro-oeste – Mato Grosso do Sul (MS) (Tabelas 5.1 e 5.2; Figuras 5.5 e 5.6). A estratégia para o sequenciamento parcial foi baseada na amplificação dos genes C/prM/M/E, no entanto a caracterização molecular e filogenia foram baseadas na análise do gene E. A análise filogenética das 48 cepas demonstrou que todas as cepas de DENV-1 analisadas pertencem ao genótipo V (América/África), porém as isoladas recentemente (2009-2011) agrupam-se em *clades* distintos. Os grupos foram diferenciados em duas linhagens, sendo uma dividida em duas sub-linhagens. As amostras do período de introdução do DENV-1 (1986 a 2002) no Brasil (n=25) e amostras isoladas recentemente entre 2010 e 2011 (n=10) foram agrupadas na linhagem 1. Esses dois grupos estão relacionados filogeneticamente, porém uma sub-divisão é evidenciada, consideradas então como linhagens 1a e 1b, respectivamente. Outro grupo distinto foi demonstrado com doze amostras isoladas entre 2009 e 2011, e uma representante do ano de 2001, sendo considerado como linhagem 2 (n=13).

Através do alinhamento das sequências do gene E das 48 amostras foi possível observar alterações nucleotídicas conservadas entre cepas da mesma linhagem. Tais alterações foram responsáveis pelas mudanças de alguns aminoácidos (aa) nos domínios I e III do gene E. No domínio I houve mudança do aa Treonina → Metionina na posição E₂₉₇, entre a linhagem 1a e as linhagens 1b e 2, respectivamente. A mudança desses aa ocorreu pela troca de uma citosina na segunda posição do códon ACG (linhagem 1a) por uma Timina, (linhagens 1b e 2). No domínio III foram detectados quatro substituições de aa conservados nas posições E₃₃₈ (S→L), E₃₉₄ (K→R), E₄₂₈ (V→L) e E₄₃₆ (V→I). As substituições de aa ocorridas nas posições E₃₃₈, E₄₂₈ e E₄₃₆ foram conservadas nas cepas da linhagem 2, enquanto as cepas da linhagem 1b apresentaram modificação conservada na posição E₃₉₄ (Tabela 5.2). A tabela dos aa está apresentada no anexo 10.1.

Ao longo do gene E, o domínio III foi o que apresentou o maior número de substituições gerando mudanças em aa conservados entre as linhagens. A análise filogenética baseada somente na sequência nucleotídica que codifica o domínio III do gene E foi suficiente para diferenciar as amostras nas distintas linhagens (Tabela 5.2; Figura 5.6). A localização dos aminoácidos substituídos no ectodomínio da proteína E está representada em modelo tridimensional na Figura 5.7.

A identidade entre as sequências nucleotídicas do gene E das 48 cepas de DENV-1 foi de 95,6 a 97,2% entre as linhagens 1a e 2; 96,6 a 98,1% entre as linhagens 1a e 1b e 95,2 a 96,2% entre as linhagens 2 e 1b. A similaridade mais baixa foi encontrada entre as linhagens 2 e 1b, apresentando divergências nucleotídicas de 3,8 a 4,8%. A matriz de identidade entre os 495 aa do gene E, demonstra taxas de 98,3 a 99,5% entre as linhagens 1a e 2, 95,9 a 99,5% entre a linhagem 1a e 1b e de 95,7 a 99,1% entre as linhagens 2 e 1b. A divergência entre os aa de 0,5 a 1,7% foi encontrada entre as linhagens 1a e 2, 0,5 a 4,1% entre as linhagens 1a e 1b, e de 0,9 e 4,3% entre as linhagens 2 e 1b. As matrizes de porcentagem tanto da identidade quanto divergência nucleotídica e de aa foram acrescidas de representantes dos cinco genótipos de DENV-1. As divergências nucleotídicas observadas foram de 6,3 a 8,7% entre as cepas estudadas com os genótipos I, II, III e IV (Anexo 10.2).

Tabela 5.1 Cepas de DENV-1 isoladas de casos humanos de 1986 a 2011 no Brasil.

ID	Origem da cepa	Passagem em C6/36	Classificação (OMS, 2009)	Genes Sequenciados	Acesso Genbank
31768/RJ/1986	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	HQ026760
31807/RJ/1986	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	JN122280
36034/RJ/1988	Isolado (C6/36)	2ª	DSSA	(C→NS5)	KF672761
38159/RJ/1989	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	(C→NS5)	KF672762
45907/MS/1991	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672791
58485/MG/1997	Isolado (C6/36)	1ª	DG	C/prM/M/E	KF672769
58522/MG/1997	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	KF672770
58540/RJ/1997	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672771
58610/RJ/1997	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672772
58724/RN/1997	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	KF672773
60068/RJ/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DG	C/prM/M/E	KF672774
60443/CE/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672775
60606/MG/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672776
60619/MG/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DG	C/prM/M/E	KF672777
62114/ES/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672778
62189/ES/1998	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672779
64450/RJ/1999	Isolado (C6/36)	2ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672780
64451/RJ/1999	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672781
64616/RJ/1999	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672792
66568/RJ/2000	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672782
66694/ES/2000	Isolado (C6/36)	1ª	SI	(C→NS5)	KF672763
67993/PI/2000	Isolado (C6/36)	1ª	SI	(C→NS5)	KF672787
68826/RJ/2001	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672764
71602/RJ/2001	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672788
75424/ES/2002	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672783
15_2010/MS/2010*	Soro		DSSA	C/prM/M/E	HQ696612
876_2010/MS/2010	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	KF672768
2676_2010/RJ/2010	Isolado (C6/36)	2ª	ÓBITO	C/prM/M/E	KF672786
1141_2011/AL/2010	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	JQ015184
1142_2011/AL/2010	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	JQ015185
122_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	JN122281
169_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	ÓBITO	C/prM/M/E	KF672765
325_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	DG	C/prM/M/E	KF672766
1049_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	KF672790
1266_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	ÓBITO	(C→NS5)	KF672760
73834/ES/2001	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672789
55_2009/ES/2009	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	HM043709
1433_09/RJ/2009	Soro		DSSA	C/prM/M/E	HQ026761
1435_09/RJ/2009	Soro		DSSA	C/prM/M/E	HM043710
19_2010/RJ/2010	Soro		DSSA	C/prM/M/E	HQ026762
20_2010/RJ/2010	Soro		DSSA	C/prM/M/E	HQ696613
188_2010/RJ/2010	Isolado (C6/36)	1ª	DCSA	C/prM/M/E	HQ696614
242_2010/RJ/2010	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	(C→NS5)	KF672759
516_2010/ES/2010	Isolado (C6/36)	1ª	ÓBITO	C/prM/M/E	KF672785
568_2010/ES/2010	Isolado (C6/36)	1ª	ÓBITO	C/prM/M/E	KF719187
594_2011/CE/2010	Isolado (C6/36)	1ª	SI	C/prM/M/E	JN982362
512_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	DSSA	C/prM/M/E	KF672767
514_2011/RJ/2011	Isolado (C6/36)	1ª	ÓBITO	C/prM/M/E	KF672784

*Amostra suspeita de febre amarela, com histórico de viagem ao Mato Grosso do Sul. ID: Identificação; BR: Brasil; RJ: Rio de Janeiro, ES: Espírito Santo; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; CE: Ceará; AL: Alagoas; PI: Piauí; SI: Sem informação; DG: dengue grave; DSSA: dengue sem sinais de alerta; DCSA: dengue com sinais de alerta; C: capsídeo; prM: pré-membrana; M: membrana; E: envelope; NS5: proteína não estrutural 5. OMS: Organização Mundial da Saúde.

Tabela 5.2 Substituições de aminoácidos que predizem a diferenciação dos vírus dengue 1 (DENV-1) em diferentes linhagens baseada na análise do gene do envelope (E).

ID da amostra Estado de origem Ano de isolamento	Gene E (posição)/Substituição de aminoácido					Genótipo Rico-Hesse (2003) Weaver & Vasilakis (2009)	Linhagem
	Domínio I		Domínio III				
	E ₂₉₇	E ₃₃₈	E ₃₉₄	E ₄₂₈	E ₄₃₆		
31768/RJ/1986	T	S	K	V	V	América/África (V)	Linhagem 1a
31807/RJ/1986	América/África (V)	Linhagem 1a
36034/RJ/1988	América/África (V)	Linhagem 1a
38159/RJ/1989	América/África (V)	Linhagem 1a
45907/MS/1991	América/África (V)	Linhagem 1a
58485/MG/1997	América/África (V)	Linhagem 1a
58522/MG/1997	América/África (V)	Linhagem 1a
58540/RJ/1997	América/África (V)	Linhagem 1a
58610/RJ/1997	América/África (V)	Linhagem 1a
58724/RN/1997	América/África (V)	Linhagem 1a
60068/RJ/1998	América/África (V)	Linhagem 1a
60443/CE/1998	América/África (V)	Linhagem 1a
60606/MG/1998	América/África (V)	Linhagem 1a
60619/MG/1998	.	L	.	.	.	América/África (V)	Linhagem 1a
62114/ES/1998	América/África (V)	Linhagem 1a
62189/ES/1998	América/África (V)	Linhagem 1a
64450/RJ/1999	América/África (V)	Linhagem 1a
64451/RJ/1999	América/África (V)	Linhagem 1a
64616/RJ/1999	América/África (V)	Linhagem 1a
66568/RJ/2000	América/África (V)	Linhagem 1a
66694/ES/2000	América/África (V)	Linhagem 1a
67993/PI/2000	América/África (V)	Linhagem 1a
68826/RJ/2001	América/África (V)	Linhagem 1a
71602/RJ/2001	América/África (V)	Linhagem 1a
75424/ES/2002	América/África (V)	Linhagem 1a
15_2010/MS/2010	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
876_2010/MS/2010	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
2676_2010/RJ/2010	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
1141_2011/AL/2010	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
1142_2011/AL/2010	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
122_2011/RJ/2011	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
169_2011/RJ/2011	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
325_2011/RJ/2011	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
1049_2011/RJ/2011	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
1266_2011/RJ/2011	M	.	R	.	.	América/África (V)	Linhagem 1b
73834/ES/2001	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
55_2009/ES/2009	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
1433_09/RJ/2009	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
1435_09/RJ/2009	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
19_2010/RJ/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
20_2010/RJ/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
188_2010/RJ/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
242_2010/RJ/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
516_2010/ES/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
568_2010/ES/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
594_2011/CE/2010	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
512_2011/RJ/2011	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2
514_2011/RJ/2011	M	L	.	L	I	América/África (V)	Linhagem 2

Legenda dos aminoácidos:

T: treonina; S: serina; K: lisina; V: valina; M: metionina; L: leucina; R: arginina; I: isoleucina.

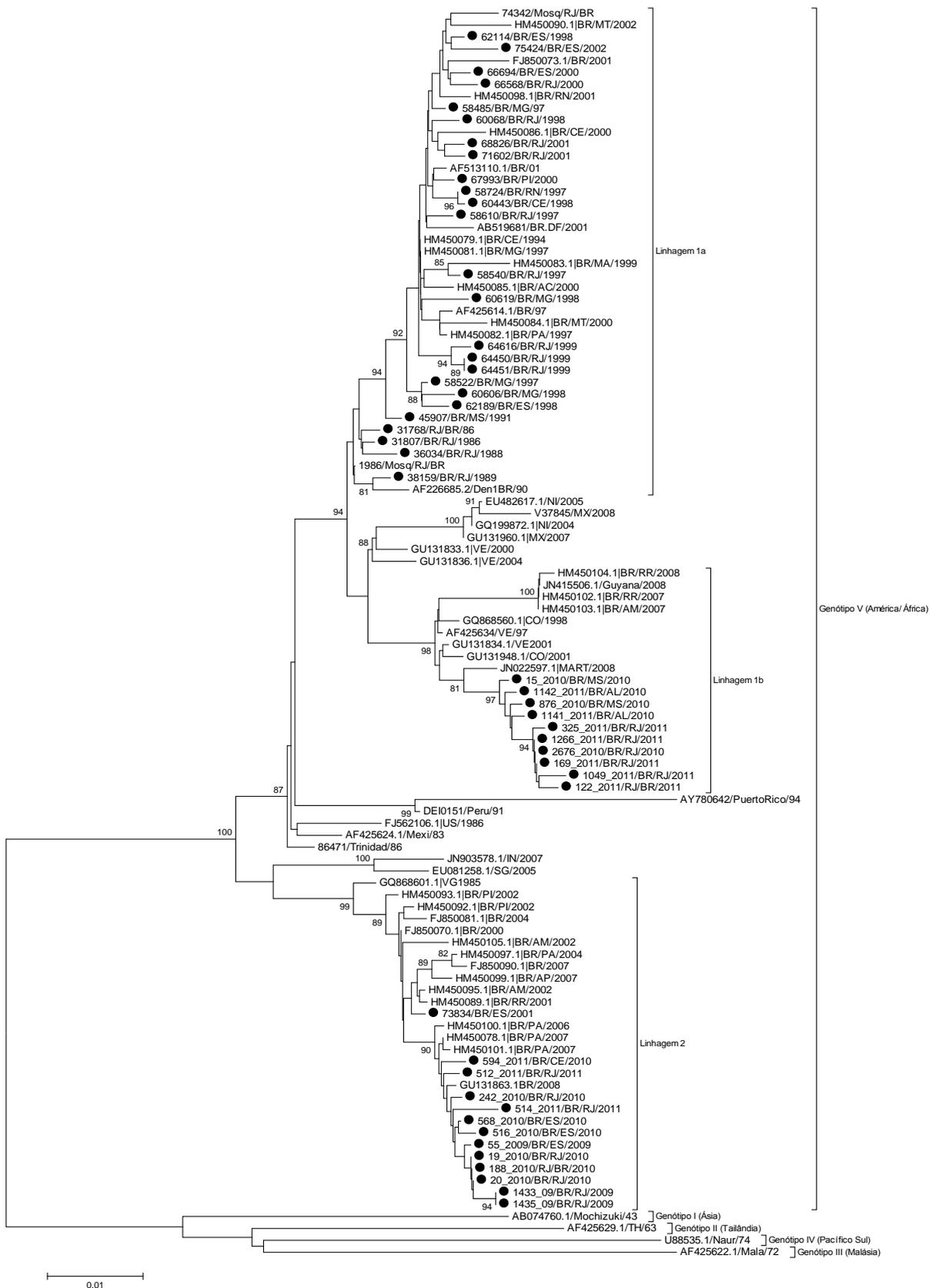


Figura 5.5 Árvore filogenética baseada no gene E dos 48 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.30. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentada na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

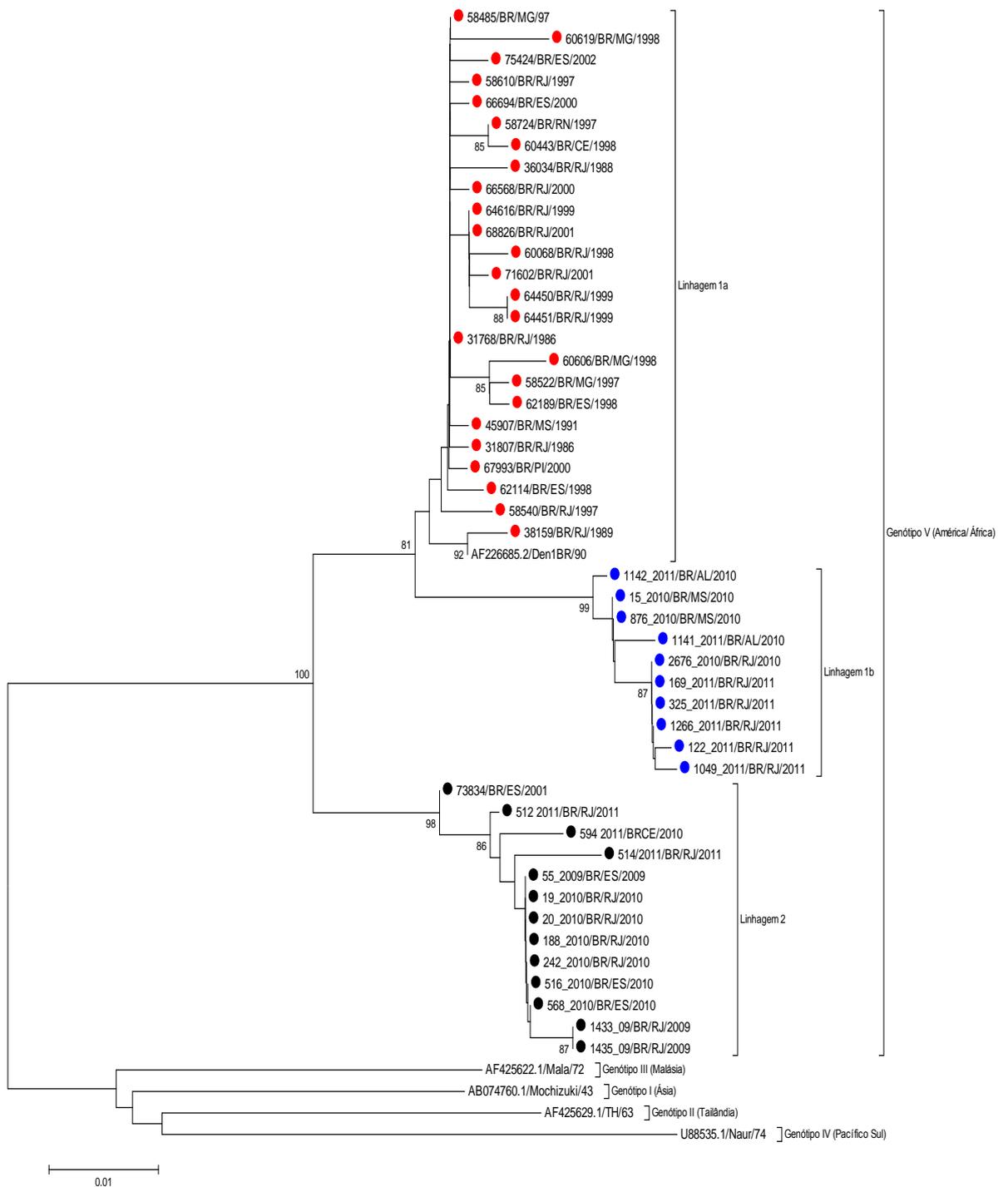


Figura 5.6 Árvore filogenética baseada na sequência codificante para o domínio III do gene E dos DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.46. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos na cor vermelha representam as sequências de DENV-1 da linhagem 1a, em azul as amostras da linhagem 1b e preto da linhagem 2. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

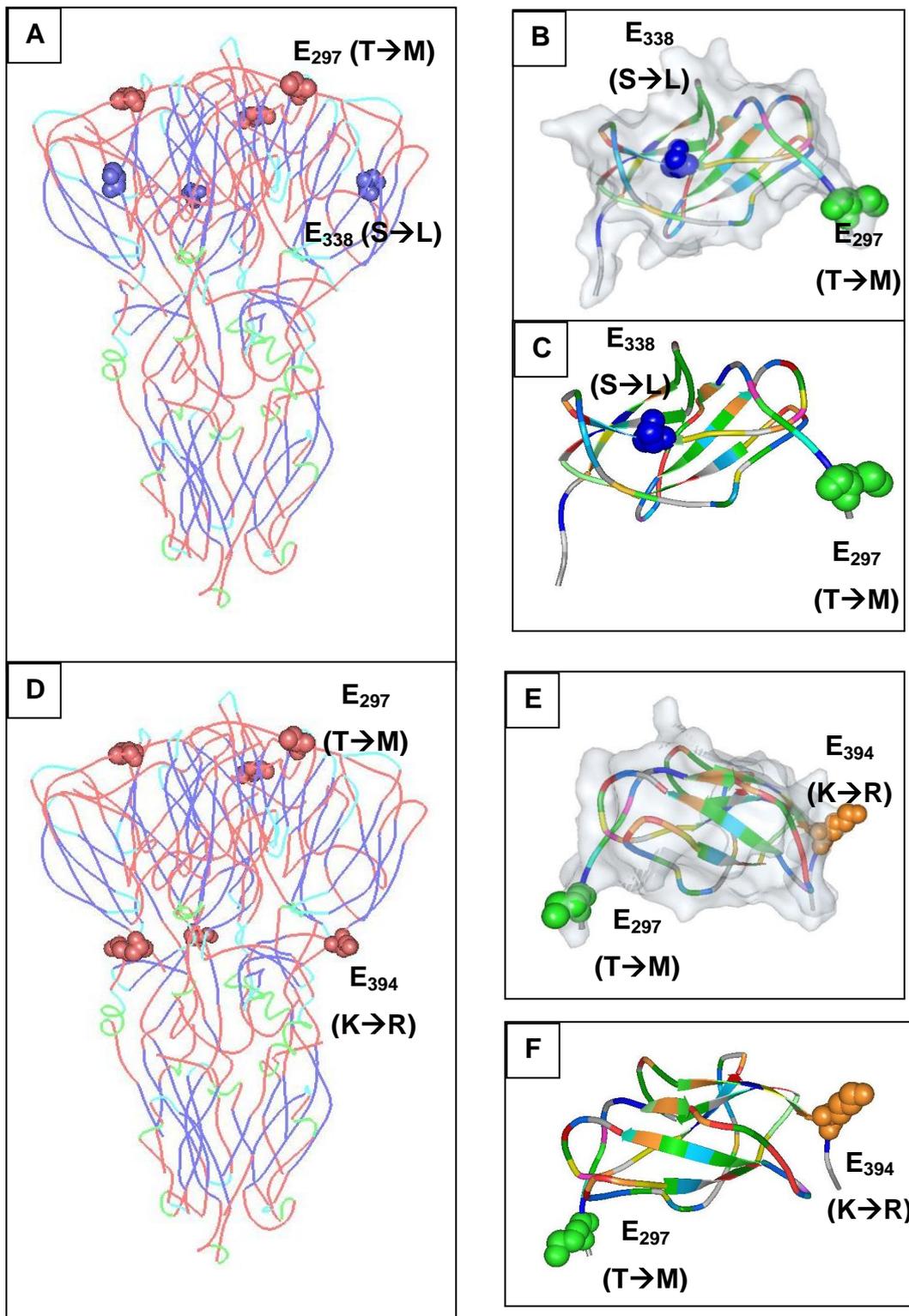


Figura 5.7 Estrutura tridimensional do ectodomínio da proteína E do DENV-1. Linhagem 2: Trímero, estrutura de conformação pós fusão, apresentando as posições com aminoácidos conservados no Domínio I e III (A) e segmento do domínio III com e sem estrutura de superfície (B e C, respectivamente); Linhagem 1b: Trímero, estrutura de conformação pós fusão, apresentando as posições com aminoácidos conservados no Domínio I e III (D) e segmento do domínio III com e sem estrutura de superfície (E e F, respectivamente). Representação construídas em Protein Workshop (Moreland et al., 2005), utilizando como moldes as proteínas 3G7T (Nayak et al., 2009) e 3IRC (Nelson et al., 2011), disponíveis em PDB (Protein Data Bank). Resíduos destacados nas imagens representam a localização dos aminoácidos, sem necessariamente apresentar a estrutura química do aminoácido encontrado nas linhagens.

5.2.2 Caracterização molecular baseada na sequência da região codificante completa (C→NS5)

A análise filogenética baseada nas sequências da região codificante completa demonstrou que as seis cepas de DENV-1 isoladas pertencem ao genótipo V (América/África), corroborando a análise do gene E, e que as representantes das linhagens se mantêm em grupos distintos (Tabelas 5.1 e 5.2; Figura 5.8).

A fim de verificar quais genes poderiam ser utilizados para identificação das linhagens, árvores filogenéticas foram construídas a partir dos genes C, prM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4 e NS5 (Figuras 5.9 a 5.17, respectivamente). A análise de todos os genes, exceto o gene C, permitiu agrupar as amostras no genótipo V, porém somente os genes E, NS3 e NS5 permitiram o agrupamento das amostras em duas linhagens distintas (linhagem 1 e 2), sendo o gene E o único que caracterizou as sub-linhagens 1a e 1b, com suporte de *bootstrap* $\geq 75\%$ (Figuras 5.11; 5.15; 5.17).

Comparando os 3.392 aa, correspondentes aos 10.176 nucleotídeos, das seis amostras com a cepa de referência AF226685.2/BR/90 foram encontradas 82 substituições de aa distribuídas entre as sequências. As cepas 36034/RJ/1988 e 38159/RJ/1989 apresentaram seis e sete substituições, respectivamente. Já nas outras duas cepas também pertencentes à linhagem 1a, o número de substituições foi mais elevado: 66694/ES/2000 com dezenove e a cepa 68826/RJ/2001 com dezesseis. Na representante da linhagem 1b, 1266_2011/RJ/2011 foram identificadas 26 substituições de aa e a representante da linhagem 2 (242_2010/RJ/2010) apresentou aproximadamente 50% do total de substituições encontradas (43 substituições).

A maioria das substituições foi pontual, em sequências únicas, porém dezesseis foram conservadas entre as cepas estudadas. Nas cepas isoladas em 2000 e 2001 (linhagem 1a) foram detectadas nove substituições nos genes NS1, NS4B e NS5. Os resíduos de aa substituídos foram NS1₄₈ (K→R), NS1₈₄ (M→I), NS1₉₂ (D→N), NS1₂₄₆ (I→M), NS1₂₉₃ (N→S), NS4B₃₄ (R→H), NS4B₉₀ (I→L), NS5₆₂₉ (L→F), NS5₆₃₅ (T→S). A substituição R→H em NS4B₃₄ também foi observado na cepa da linhagem 1b. Entre as representantes das linhagens 1b e 2, três substituições foram encontradas no gene E, NS2A e NS5 em E₂₉₇ (T→M), NS2A₆₇ (K→R) e NS5₆₇₈ (I→T). Além destas, quatro repetições de aminoácidos foram

encontrados nas sequências das três linhagens, diferenciadas da BR/90, nas posições NS2A₉₇ (A→T), NS3₄₆₅ (S→N), NS5₁₁₄ (V→I) e NS5₇₈₄ (I→V), ressaltando que a cepa 38159/RJ/1989 compartilha esta última posição com a cepa de referência (Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5).

A identidade nucleotídica das seis cepas onde se analisou a região codificante completa demonstrou uma variação de 96.1 - 96.5% entre as linhagens 1a e 2; 97.3 - 97.9% entre as linhagens 1a e 1b e 95.4% entre as linhagens 1b e 2. A identidade de aa entre as linhagens 1a e 2 foi de 98.4% - 98.7%; linhagens 1a e 1b, 98.9 - 99.2%; e de 98.4% entre as linhagens 1b e 2 (Tabela 5.6). Conseqüentemente, a divergência nucleotídica e de aa obtida entre as linhagens foi: 3.5 - 3.9% (nucleotídica) e 1,3 - 1,6% (aa) entre as linhagens 1a e 2; 2,1 - 2,7% (nucleotídica) e 0,8 - 1,1% (aa) entre as linhagens 1a e 1b; 4,6% (nucleotídica) e 1,6% (aa) entre as linhagens 2 e 1b (Tabela 5.7). As matrizes de porcentagem tanto da identidade quanto divergência nucleotídica e de aa foram acrescidas de representantes dos cinco genótipos de DENV-1, apresentando divergência nucleotídica >6% entre as amostras estudadas com os genótipos I, II, III e IV (Tabelas 5.6 e 5.7).

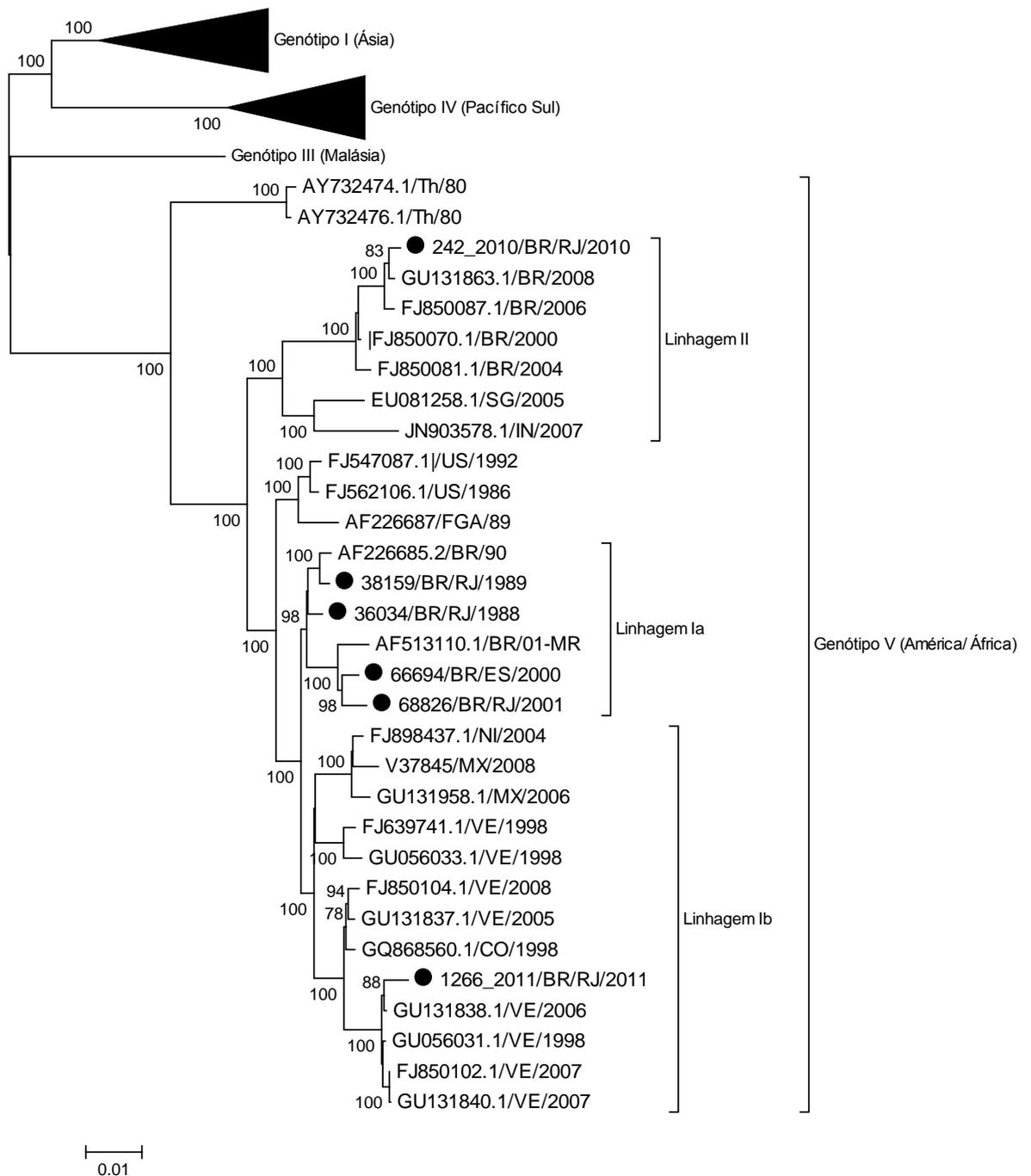


Figura 5.8 Árvore filogenética baseada na região codificante completa dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.28. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as seqüências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

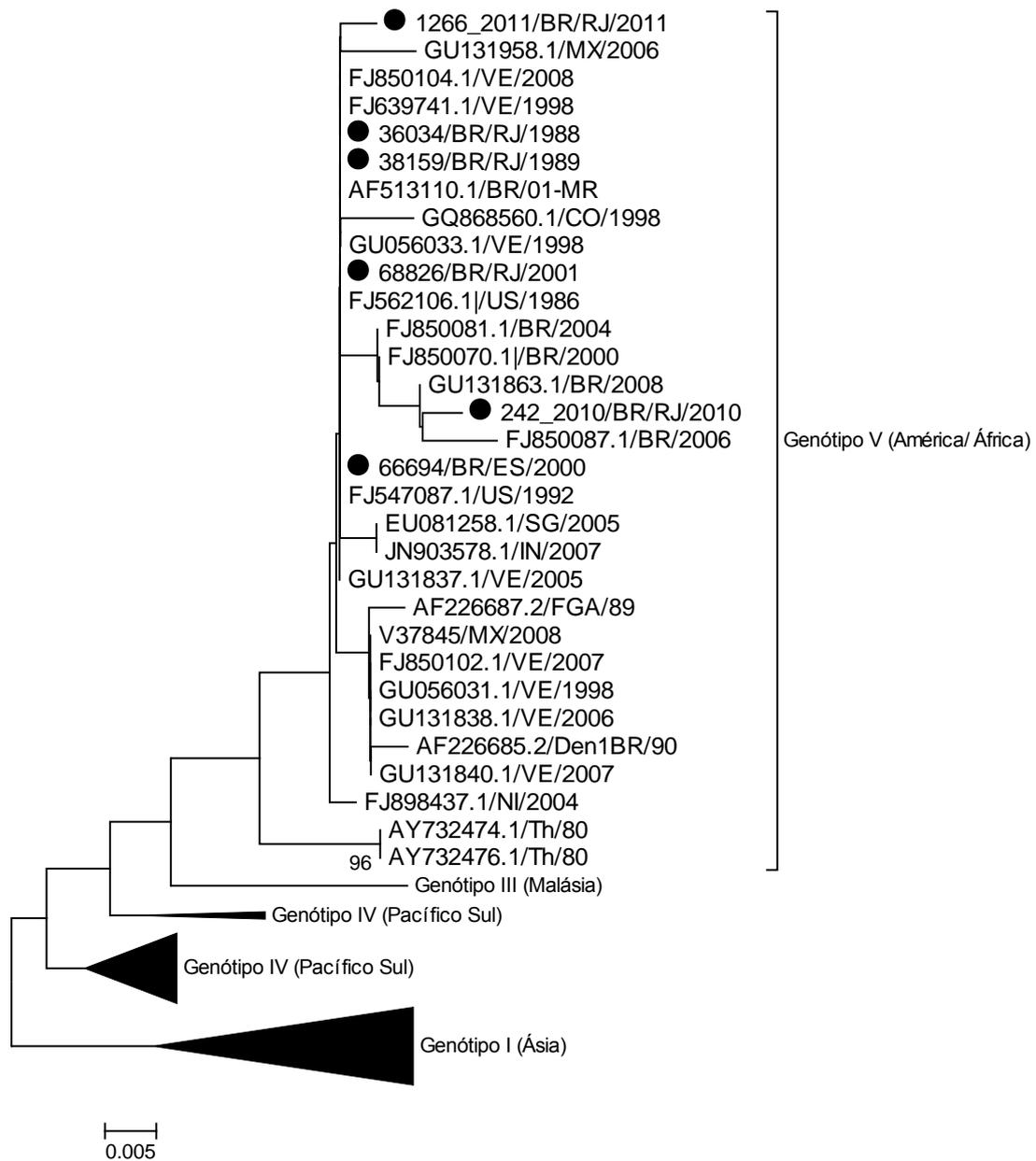


Figura 5.9 Árvore filogenética baseada no gene C (capsídeo) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.15. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentada na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.



Figura 5.10 Árvore filogenética baseada no gene prM/M (pré-membrana/membrana) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.30. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

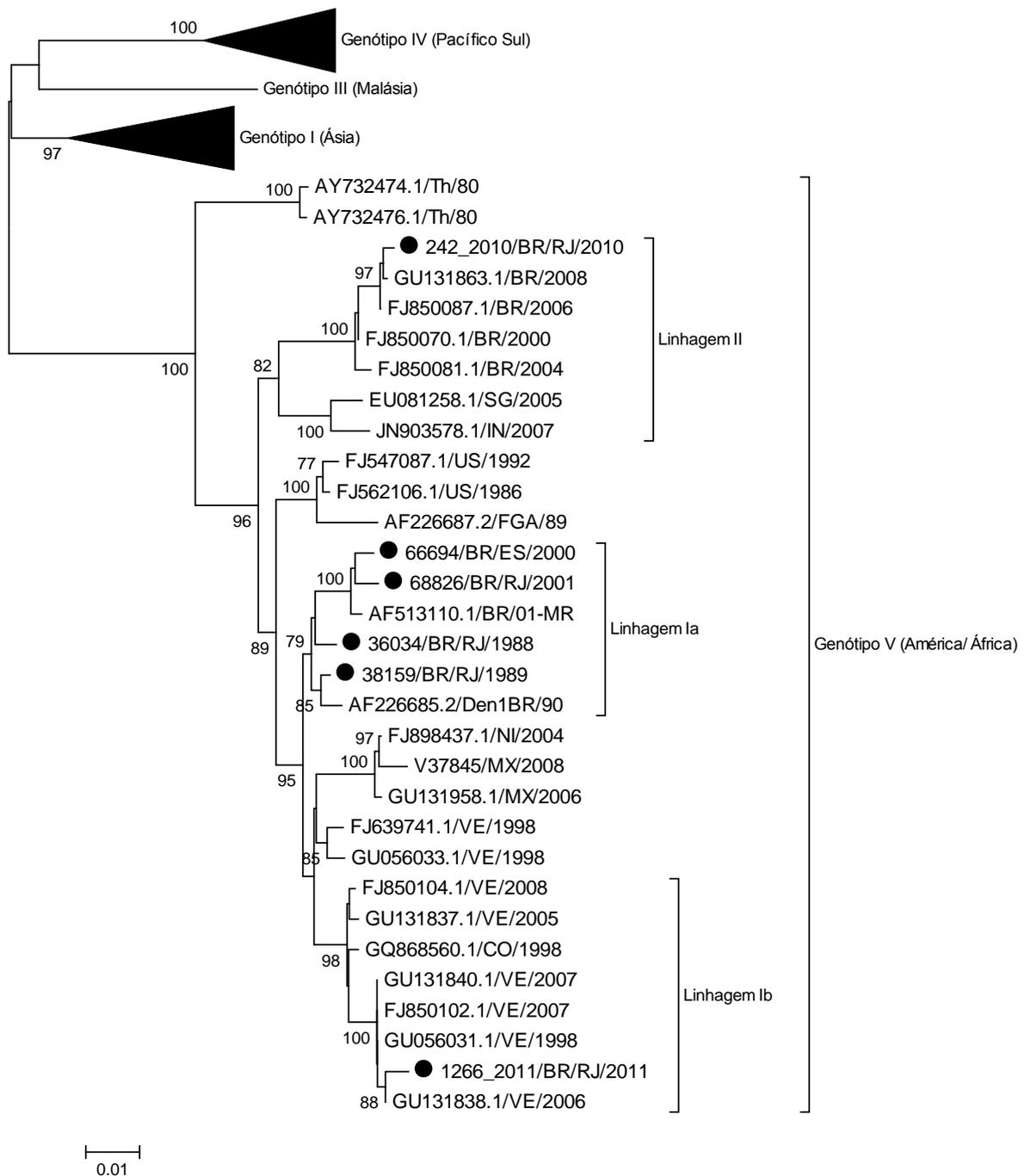


Figura 5.11 Árvore filogenética baseada no gene E (envelope) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.32. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.



Figura 5.12 Árvore filogenética baseada no gene NS1 (não estrutural 1) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.32. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referencia de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.



Figura 5.13 Árvore filogenética baseada no gene NS2A (não estrutural 2A) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.40. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

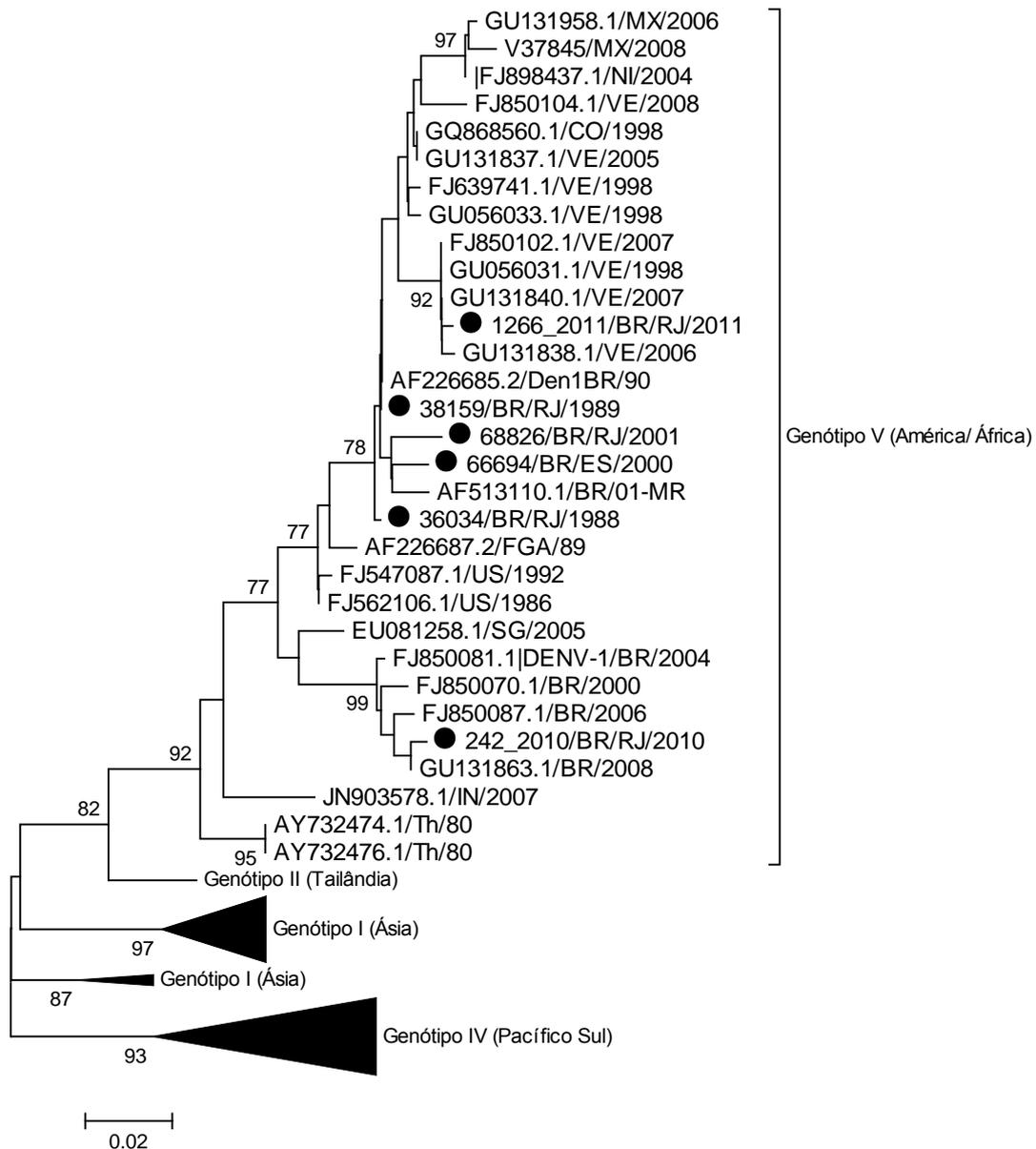


Figura 5.14 Árvore filogenética baseada no gene NS2B (não estrutural 2B) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.22. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

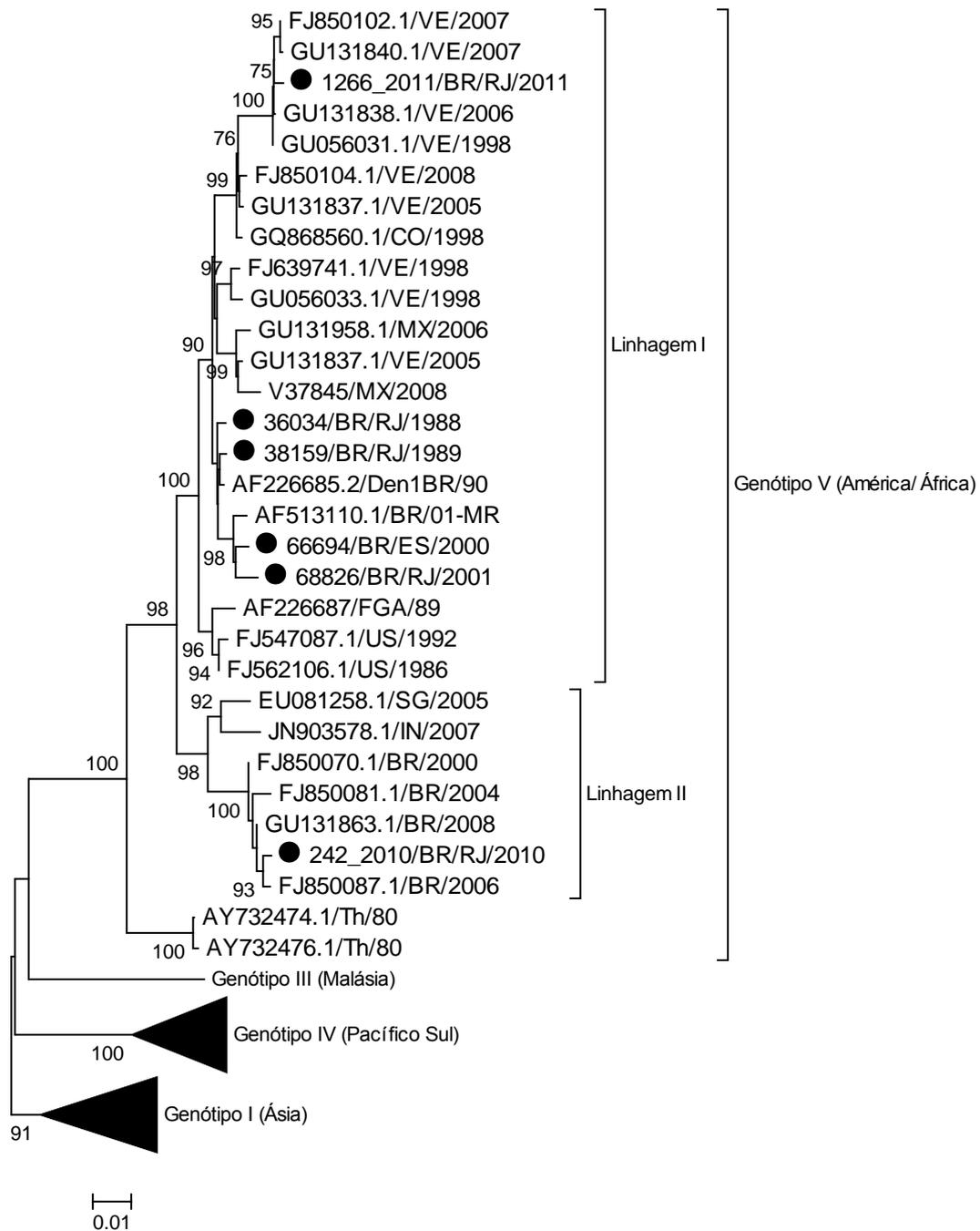


Figura 5.15 Árvore filogenética baseada no gene NS3 (não estrutural 3) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.25. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referencia de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

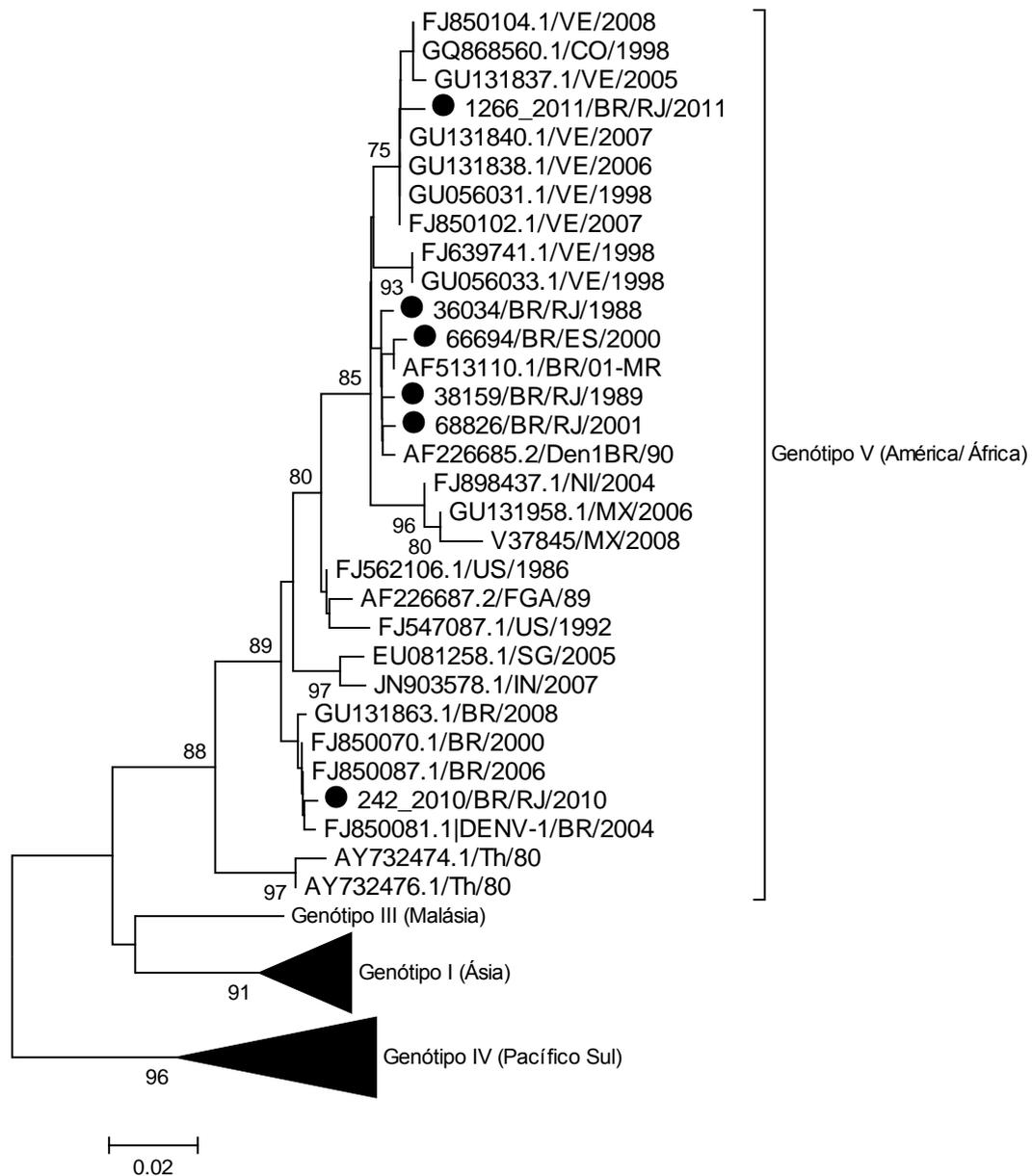


Figura 5.16 Árvore filogenética baseada no gene NS4A (não estrutural 4A) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.33. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.



Figura 5.17 Árvore filogenética baseada no gene NS4B (não estrutural 4B) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.28. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

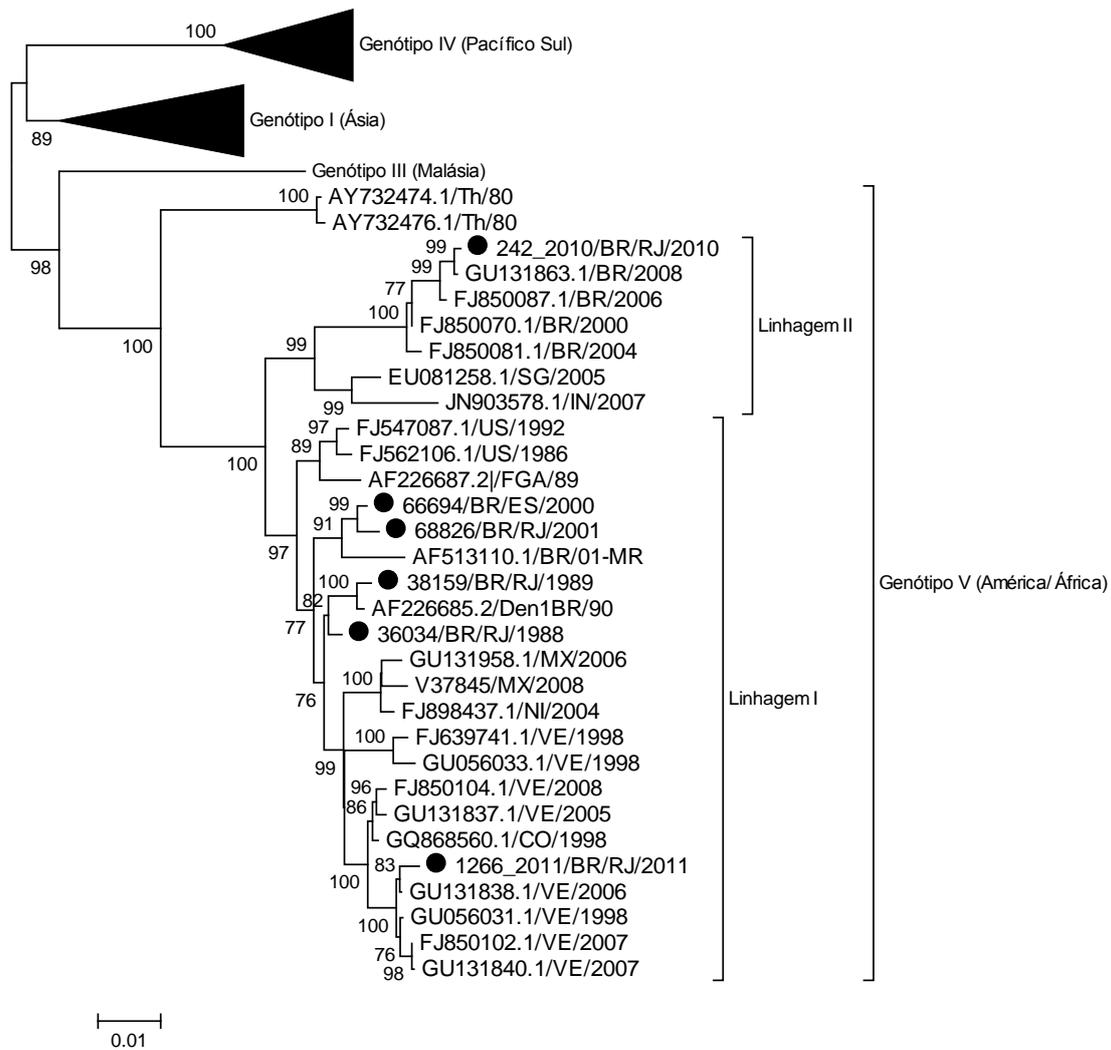


Figura 5.18 Árvore filogenética baseada no gene NS5 (não estrutural 5) dos 6 DENV-1 isolados ao longo dos períodos epidêmicos (1986 a 2011). Método Neighbor-joining, modelo TN93+G com valor de correção 0.25. Suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) está apresentado na base dos ramos. Círculos pretos representam as sequências de DENV-1 analisadas. Cepas de referência de DENV foram nomeadas da seguinte forma: número de acesso ao GenBank/País/ano.

Tabela 5.3 Substituições de aminoácidos nos genes C, prM, M e NS1 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com amostra de referência AF226685.2/BR/90.

ORF	Proteína	aa	AF226685.2 BR/90	Cepas de DENV-1						
				Linhagem 1a				Linhagem 2	Linhagem 1b	
				36034/ BR/RJ/1988	38159/ BR/RJ/1989	66694 BR/ES/2000	68826 BR/RJ/2001	242_2010 BR/RJ/2010	1266_2011 BR/RJ/2011	
26	C	25	G	*	*	*	*	S	*	
95		95	M	*	*	*	*	I	*	
106		106	L	F	*	*	*	*	*	
143	prM	29	A	*	*	*	*	V	*	
199		85	E	G	*	*	*	*	*	
203		89	D	*	*	*	*	*	E	
222	M	31	K	*	*	*	*	*	R	
252		47	L	*	*	*	*	*	F	
577	E	297	T	*	*	*	*	M	M	
603		329	T	*	I	*	*	*	*	
618		338	S	*	*	*	*	L	*	
662		382	A	*	*	V	*	*	*	
674		394	K	*	*	*	*	*	R	
708		428	V	*	*	*	*	L	*	
716		436	V	*	*	*	*	I	*	
720		440	F	*	L	*	*	*	*	
823		NS1	48	K	*	*	R	R	*	*
852			77	H	*	*	*	*	Y	*
859	84		M	*	*	I	I	*	*	
867	92		D	*	*	N	N	*	*	
868	93		A	*	*	*	*	V	*	
869	94		N	*	*	D	*	*	*	
873	98		A	*	*	*	T	*	*	
921	146		E	*	*	*	*	D	G	
937	162		I	*	*	*	*	*	V	
950	175		Y	*	*	*	*	H	*	
999	224		I	*	*	*	*	*	T	
1017	242		I	*	*	*	*	V	*	
1021	246		I	*	*	M	M	*	*	
1022	247		Y	*	*	*	*	*	F	
1068	293		N	*	*	S	S	Y	*	
1122	347	R	*	*	*	K	*	*		

Tabela 5.4 Substituições de aminoácidos nos genes NS2A, NS2B, NS3 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com a amostra de referência AF226685.2/BR/90.

ORF	Proteína	aa	AF226685.2 BR/90	Cepas de DENV-1							
				Linhagem 1a				Linhagem 2	Linhagem 1b		
				36034/ BR/RJ/1988	38159/ BR/RJ/1989	66694 BR/ES/2000	68826 BR/RJ/2001	242_2010 BR/RJ/2010	1266_2011 BR/RJ/2011		
1144	NS2A	17	I	*	*	*	*	*	M		
1145		18	M	*	*	*	*	L	*		
1194		67	K	*	*	*	*	R	R		
1224		97	A	T	T	T	T	T	T		
1225		98	S	*	*	*	*	C	*		
1233		106	I	*	*	*	*	V	*		
1238		111	V	*	*	M	*	*	*		
1240		113	S	*	*	*	*	*	C		
1266		139	E	*	*	*	*	D	*		
1282		155	I	*	*	*	*	*	V		
1283		156	K	*	*	*	*	R	*		
1285		158	T	*	*	*	*	S	*		
1295		168	T	*	*	*	*	M	*		
1298		171	V	*	*	*	*	A	*		
1340	213	K	*	*	E	*	*	*			
1349	NS2B	4	L	*	*	*	*	I	*		
1356		11	I	*	*	*	*	V	*		
1408		63	E	*	*	*	*	*	Q		
1415		70	T	*	*	*	*	*	A		
1487	NS3	12	E	*	*	*	*	K	*		
1646		171	S	*	*	*	*	T	*		
1830		358	K	*	R	*	*	*	*		
1912		437	D	*	*	*	*	E	*		
1940		465	S	N	N	N	N	N	N		
1949		474	V	*	*	*	*	I	*		

Tabela 5.5 Substituições de aminoácidos nos genes NS4A, NS4B, NS5 de seis amostras de DENV-1 representativas das três linhagens distintas comparadas com a amostra de referência AF226685.2/BR/90.

ORF	Proteína	aa	AF226685.2 BR/90	Cepas de DENV-1						
				Linhagem 1a				Linhagem 2	Linhagem 1b	
				36034/ BR/RJ/1988	38159/ BR/RJ/1989	66694 BR/ES/2000	68826 BR/RJ/2001	242_2010 BR/RJ/2010	1266_2011 BR/RJ/2011	
2183	NS4A	89	T	*	*	*	*	M	*	
2261	NS4B	17	H	*	*	*	*	*	Y	
2264		20	A	*	*	*	*	V	*	
2268		24	Q	*	*	*	*	H	*	
2278		34	R	*	*	H	H	*	H	
2334		90	I	*	*	L	L	*	*	
2392		148	V	*	*	I	*	*	*	
2397		153	A	*	*	*	*	T	*	
2523		NS5	30	R	*	*	*	*	K	*
2532	39		S	*	*	*	T	*	*	
2607	114		V	I	I	I	I	I	I	
2628	135		M	*	*	*	*	T	*	
2688	195		Q	*	*	*	*	*	R	
2863	370		A	*	*	*	*	*	T	
3040	547		Q	*	*	R	*	*	*	
3078	585		N	*	*	*	*	S	*	
3120	629		L	*	*	F	F	S	*	
3128	635		T	*	*	S	S	*	*	
3133	640		E	*	*	*	*	K	*	
3134	641		R	*	*	*	*	K	*	
3135	642		V	*	*	*	*	*	A	
3171	678		I	*	*	*	*	T	T	
3277	784		I	V	*	V	V	V	V	
3282	789	T	*	*	*	*	*	A		
3320	827	T	*	A	*	*	*	*		

Tabela 5.6 Matriz de porcentagem* da identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) das linhagens dos DENV-1.

Amostras**	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 36034/BR/RJ/1988		99,7%	99,4%	99,5%	98,7%	99,2%	97,3%	97,8%	97,6%	99,8%
2 38159/BR/RJ/1989	99,3%		99,4%	99,4%	98,7%	99,2%	97,2%	97,7%	97,5%	99,7%
3 66694/BR/ES/2000	98,8%	98,7%		99,7%	98,4%	98,9%	97,0%	97,5%	97,3%	99,4%
4 68826/BR/RJ/2001	98,7%	98,6%	99,2%		98,5%	99,0%	97,1%	97,6%	97,4%	99,5%
5 242/2010/BR/RJ/2010	96,5%	96,5%	96,1%	96,1%		98,4%	97,0%	97,4%	97,3%	98,7%
6 1266/2011/BR/RJ/2011	97,9%	97,8%	97,3%	97,3%	95,4%		97,1%	97,6%	97,3%	99,2%
7 AB074760.1/Mochi/43	93,9%	93,7%	93,5%	93,4%	93,2%	93,0%		97,8%	97,7%	97,2%
8 EF457905.1/MAL/72	93,4%	93,3%	93,0%	93,0%	92,9%	92,6%	94,6%		98,0%	97,7%
9 U88535.1/Naur/74	92,9%	92,7%	92,6%	92,4%	92,3%	92,0%	95,0%	93,7%		97,5%
10 AF226685.2/Den1BR/90	99,3%	99,6%	98,7%	98,5%	96,5%	97,8%	93,8%	93,4%	92,7%	

*Quadrante superior acima da diagonal: porcentagem de aminoácidos; quadrante inferior abaixo da diagonal (em negrito): porcentagem de nucleotídeo. Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos foi determinada por BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

**amostras: 1 a 4 (linhagem 1a), 5 (linhagem 2), 6 (linhagem 1b), 7 (Genótipo I – Ásia), 8 (Genótipo III – Malásia), 9 (Genótipo IV – Pacífico Sul), 10 (Genótipo V – América/África).

Tabela 5.7 Matriz de porcentagem* da divergência nucleotídica e de aminoácidos baseada na região codificante completa (C→NS5) das linhagens dos DENV-1.

Amostras**		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	36034/BR/RJ/1988		0,3%	0,6%	0,5%	1,3%	0,8%	2,7%	2,2%	2,4%	0,2%
2	38159/BR/RJ/1989	0,7%		0,6%	0,6%	1,3%	0,8%	2,8%	2,3%	2,5%	0,3%
3	66694/BR/ES/2000	1,2%	1,3%		0,3%	1,6%	1,1%	3,0%	2,5%	2,7%	0,6%
4	68826/BR/RJ/2001	1,3%	1,4%	0,8%		1,5%	1,0%	2,9%	2,4%	2,6%	0,5%
5	242/2010/BR/RJ/2010	3,5%	3,5%	3,9%	3,9%		1,6%	3,0%	2,6%	2,7%	1,3%
6	1266/2011/BR/RJ/2011	2,1%	2,2%	2,7%	2,7%	4,6%		2,9%	2,4%	2,7%	0,8%
7	AB074760.1/Mochi/43	6,1%	6,3%	6,5%	6,6%	6,8%	7,0%		2,2%	2,3%	2,8%
8	EF457905.1/MAL/72	6,6%	6,7%	7,0%	7,0%	7,1%	7,4%	5,4%		2,0%	2,3%
9	U88535.1/Naur/74	7,1%	7,3%	7,4%	7,6%	7,7%	8,0%	5,0%	6,3%		2,5%
10	AF226685.2/Den1BR/90	0,7%	0,4%	1,3%	1,5%	3,5%	2,2%	6,2%	6,6%	7,3%	

*Quadrante superior acima da diagonal: porcentagem de aminoácidos; quadrante inferior abaixo da diagonal (em negrito): porcentagem de nucleotídeo. Porcentagem de divergência de nucleotídeos e aminoácidos foi determinada por BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

**amostras: 1 a 4 (linhagem 1a), 5 (linhagem 2), 6 (linhagem 1b), 7 (Genótipo I – Ásia), 8 (Genótipo III – Malásia), 9 (Genótipo IV – Pacífico Sul), 10 (Genótipo V – América/África).

5.3 Análise de recombinação de cepas de DENV-1 baseada na análise da região codificante completa do genoma viral

As sequências completas e do gene E das cepas estudadas, de sequências disponíveis no Genbank pertencentes ao genótipo V e representantes dos demais genótipos de DENV-1 foram alinhadas e analisadas. O resultado da análise do gene E das cepas brasileiras estudadas não apresentou evidência de recombinação. Porém, na análise do gene completo (10.176 nucleotídeos), foi identificado um possível evento de recombinação na cepa AF513110.1/BR/2001, isolada no estado do Paraná no ano de 2001. A cepa 36034/BR/RJ/1988 (KF672761), isolada no estado do Rio de Janeiro em 1988, foi selecionada como parente mais próximo e a cepa de referência AF226687.2/BR/90, isolada no estado do Rio de Janeiro em 1990, com menor parentesco. O evento recombinante em potencial foi detectado pelos métodos RDP e BootScan utilizados pelo RDP3, e os valores de P obtidos foram de 6.338×10^{-06} e 5.750×10^{-06} , respectivamente (Tabela 5.8; Figuras 5.19 e 5.20). A região indicada como recombinante abrange os nucleotídeos 8.037 a 8.677 (aa 2.679 - 2.893) dentro do gene codificante para a proteína NS5. A proteína NS5 corresponde aos aa 2.494 até 3.392. A região recombinante sobrepõe a região codificante para a FtsJ metiltransferase (aa 2.548-2.714) e Flavi_NS5 (aa 2.743-3.386).

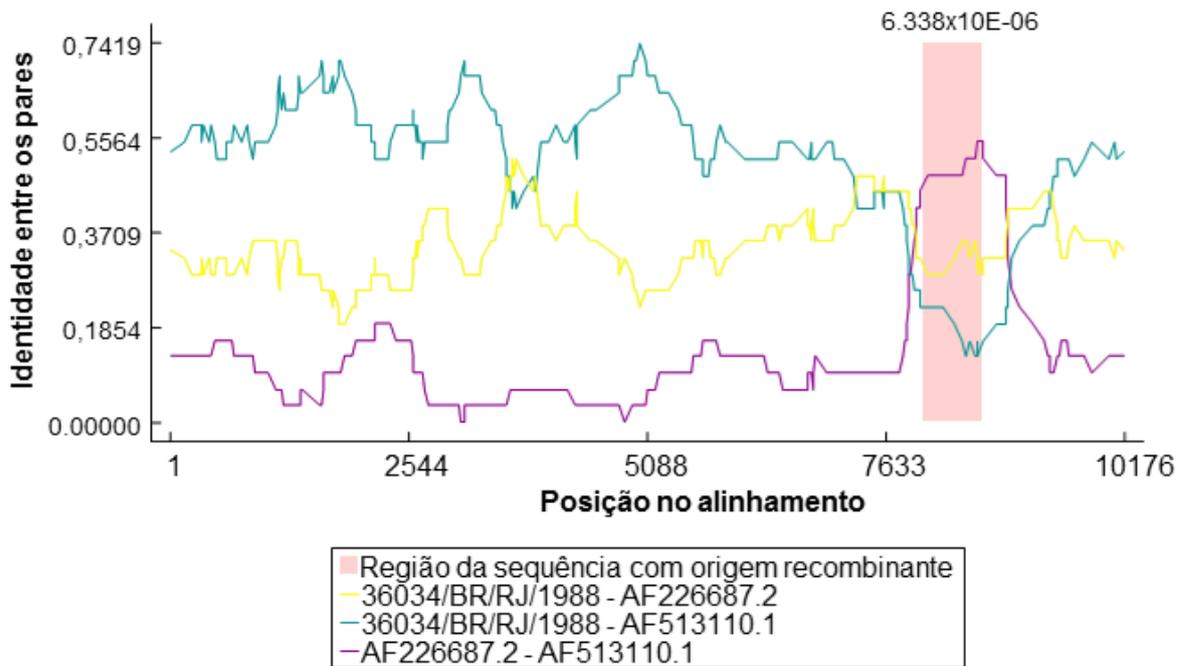


Figura 5.19 Detecção de evento de recombinação em sequência genômica codificante completa pelo método RDP. Sequência da amostra AF513110.1/BR/2001 apresenta possível evento recombinante com AF226687.2/BR/90 sendo o parente menor e a amostra 36034/RJ/1988 como parente maior. RDP – valor de P : 6.338×10^{-06} .

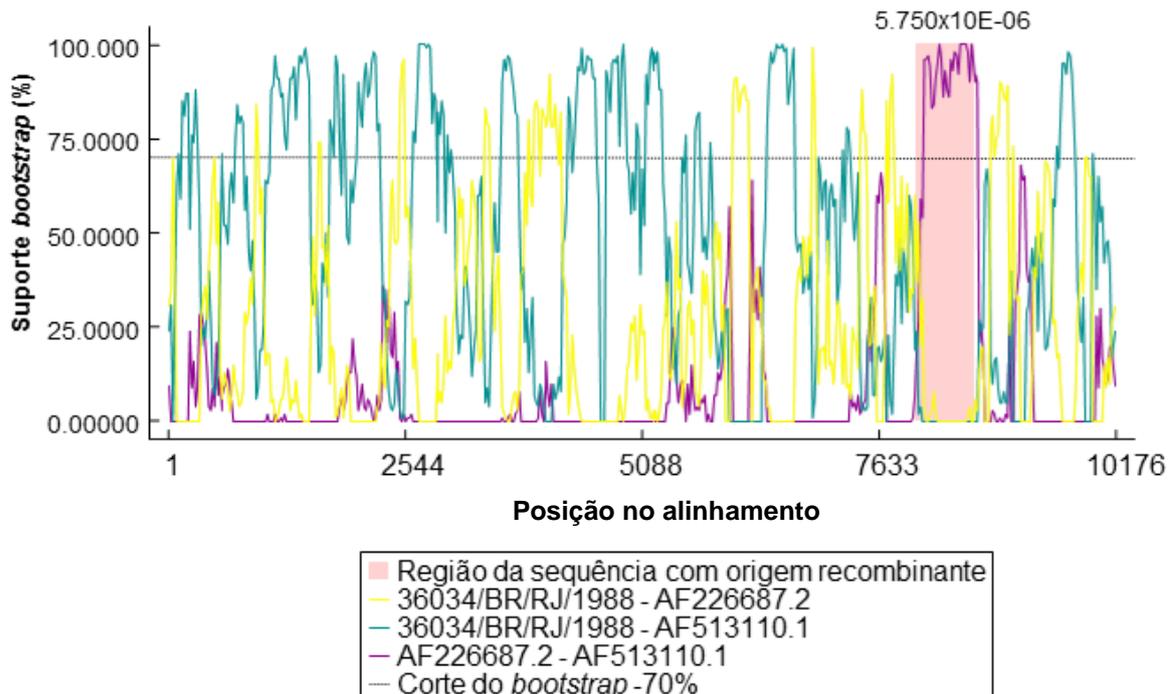


Figura 5.20 Detecção de evento de recombinação em sequência genômica codificante completa pelo método BootScan. Sequência da amostra AF513110.1/BR/2001 apresenta possível evento recombinante com AF226687.2/BR/90 sendo o parente menor e a amostra 36034/RJ/1988 como parente maior. BootScan – valor de P : 5.750×10^{-06} .

Tabela 5.8 Evento de recombinação em potencial determinado por dois métodos utilizados pelo RDP3.

Método de detecção de recombinação	Evento recombinante (valor de P)
RDP	6.338×10^{-06}
BOOTSCAN	5.750×10^{-06}

6 DISCUSSÃO

Nos últimos 27 anos mais de oito milhões de casos da dengue foram registrados no Brasil, sendo a doença um grave problema de saúde pública em diversos estados (Silva Jr., 2013; SVS/MS, 2013) e particularmente no Rio de Janeiro, que foi a porta de entrada e dispersão do DENV-1, em 1986 (Nogueira et al., 1999; 2002). O período entre 1986-1987 foi caracterizado por uma epidemia de dengue clássico, embora o isolamento do DENV-1 a partir de um caso fatal tenha ocorrido (Nogueira et al., 1999) e cinco óbitos por DENV-1 com envolvimento do sistema nervoso central tenha sido descrito (Chimelli et al., 1990). A dispersão dos vírus para outros estados é favorecida pela alta densidade populacional e a frequente movimentação de moradores e turistas. Desde a introdução do DENV no Rio de Janeiro em 1986 a vigilância virológica foi estabelecida para monitorar o DENV em amostras clínicas.

No final do ano 1989 um aumento da atividade do DENV-1 foi observado e uma nova epidemia foi reconhecida no estado do Rio de Janeiro. Durante esse período de alta atividade do DENV-1, um novo sorotipo, DENV-2, foi isolado na cidade de Niterói, exatamente quatro anos após o isolamento do DENV-1 (Nogueira et al., 1990). A circulação simultânea dos DENV-1 e DENV-2 em 1990-1991 caracterizou uma grande epidemia no estado, com um total de 140 mil casos reportados (Nogueira et al., 1999). Após a substituição do DENV-1 pelo DENV-2 em 1990, o sorotipo 1 voltou a ser isolado, juntamente com o DENV-2 em uma nova epidemia durante os anos 1995-1996, com um total de 51.465 casos registrados (Nogueira et al., 2002). Em 1998, após um período interepidêmico, o DENV-1 foi o único sorotipo isolado nos municípios de Pinheiral, Barra do Piraí, Barra Mansa e Volta Redonda. A epidemia se dispersou para outras regiões do estado incluindo os municípios de Búzios, Araruama e Iguaba, considerados pontos turísticos da região costeira do estado do Rio de Janeiro (Nogueira et al., 1999).

No final do ano 2000 ocorreu o isolamento do DENV-3 no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro. Em 2000-2001, os municípios do Rio de Janeiro e Nova Iguaçu apresentaram a co-circulação dos DENV-1, 2 e 3, enquanto no município de Niterói ocorreu uma epidemia causada principalmente pelo DENV-1

(De Simone et al., 2004). No ano seguinte, o DENV-3 foi responsável pela até então epidemia de maior gravidade ocorrida no país (Nogueira et al., 2005), sendo o sorotipo predominante até a reemergência do DENV-2, em 2007, também no estado do Rio de Janeiro, que se sobrepôs em gravidade à epidemia de 2002, com aproximadamente o dobro de óbitos (SESDEC, 2009).

Em 2009, iniciou um novo ciclo de alta transmissão do DENV-1 no Brasil, com o registro de mais de um milhão de casos prováveis no ano de 2010, com 63% dos casos nas regiões do Centro-Oeste e Sudeste, culminando no maior número de óbitos pela doença em um único ano no país. Esta epidemia apresentou um padrão distinto daquele observado nas epidemias de 2002 e 2008. Observou-se uma grande concentração de municípios com alta transmissão da doença na Região Centro-Oeste e parte da Região Sudeste. Os estados com maior número de casos registrados foram Minas Gerais (21,1%) e São Paulo (20,3%). O estado do Rio de Janeiro que foi o epicentro das epidemias anteriores e representou apenas 2,9% dos casos. A principal alteração na epidemiologia foi a ocorrência de óbitos em pacientes que apresentavam comorbidades e a incidência foi de 538,4 casos por 100 mil habitantes (Siqueira Júnior, 2011).

Com a reemergência do DENV-1, foi possível detectar cepas virais circulantes diferentes daquelas isoladas no período de introdução deste vírus no país. Devido à baixa circulação do DENV-1 desde a co-circulação deste sorotipo com o DENV-2 e DENV-3 em 2000-2001, adicionado à baixa porcentagem de identidade dos vírus recém-isolados com aqueles da década de 1980, foi sugerido que os DENV-1 reemergentes não sofreram evolução local, mas foram provavelmente provenientes de introduções independentes (dos Santos et al., 2011).

A diversidade genética dos DENV tem sido descrita, sendo reconhecidos genótipos diferentes dentro de cada sorotipo. Rico-Hesse (1990), a partir da análise da junção E/NS1 (240 nucleotídeos) dos DENV-1 e 2, determinou como genótipo o agrupamento que apresentava divergência nucleotídica $\geq 6\%$. Posteriormente, a análise baseada no gene E, realizado também por Rico-Hesse (2003) sugeriu a classificação dos genótipos para cada um dos sorotipos do DENV.

Além da evidência dos genótipos, a identificação de linhagens distintas tem sido relatada para os diferentes sorotipos. A existência de múltiplas linhagens parece ser comum tanto nas Américas quanto na Ásia. Porém, os mecanismos que envolvem a substituição de linhagens não são totalmente conhecidos (Zhang et al.,

2005; Carrillo-Valenzo et al., 2010). Estudos têm sido realizados sobre a substituição e circulação de linhagens para os variados genótipos dos DENV. Carrillo-Valenzo e colaboradores (2010) demonstraram através da análise filogenética dos DENV isolados no México, que a dinâmica evolutiva dos DENV se caracteriza por frequentes substituições de linhagens.

O genótipo V do DENV-1 tem sido alvo de estudos sobre a co-circulação e substituição de linhagens tanto no Brasil quanto em outros países americanos (Mendez et al., 2010; dos Santos et al., 2011; Carneiro et al., 2012; Drumond et al., 2012; Muñoz-Jordan et al., 2013; Añez & Rios, 2013).

Neste estudo a análise das 48 sequências de DENV-1 revelou que as amostras representantes dos vinte e cinco anos (1986 a 2011) no Brasil, correspondentes às linhagens 1a e 1b possuem maior ancestralidade com os DENV-1 de origem latino-americana e as cepas da linhagem 2 com vírus de origem asiática. Todas as sequências possuem diferenças nucleotídicas, que correspondem a substituições de aa, principalmente no domínio III da proteína do envelope. A alteração do aminoácido E₂₉₇ tanto na linhagem 2 quanto na linhagem 1b às diferenciam da linhagem 1a, mas as mudanças que promovem a maior divergência entre as linhagens são aquelas ocorridas no domínio III, quando se compara com o gene do envelope. Mudanças no domínio III da proteína do envelope podem alterar na imunogenicidade da partícula viral, já que esta região possui o papel de ligação do vírus aos receptores celulares e é altamente indutor de resposta imunológica de anticorpos neutralizantes (Chen et al., 1996; Drumond et al., 2012). Substituições de aa nas posições da proteína do envelope relatadas neste estudo corroboram observações recentes (Carneiro et al., 2012; Drumond et al., 2012). A posição E₂₉₇ está localizada entre os domínios I e III da proteína E, e tem sido sugerido que mutações nesta região podem influenciar a patogenicidade dos flavivirus (Carneiro et al., 2012; Golcalves et al., 2002).

A posição E₃₃₈, localizado no domínio III, que compreende os aa 299 ao 397 da proteína E, está envolvido com a ligação do vírus a receptores, sendo responsável pela determinação da especificidade do receptor, tipo de vetor, hospedeiro e tropismo celular (Carneiro et al., 2012; dos Santos et al. 2002). Carneiro e colaboradores (2012) descreveram substituições de aa na posição E₃₃₈ em quatro amostras de pacientes com quadro clínico de dengue grave, contudo neste estudo, substituições na posição E₃₃₈ foram observadas nas treze cepas

isoladas de pacientes da linhagem 2, dentre elas sete com quadro clínico de DSSA, uma de DCSA, e duas de DG que foram a óbito. Na linhagem 1a, das 25 cepas estudadas uma apresentou alteração em E₃₃₈, classificada como DG, com quadro de febre, cefaléia, dor retro-orbitária, exantema, dor abdominal, petéquias, náuseas/vômitos e choque. Tal mudança não se apresentou nos demais casos graves e óbitos. Pelo fato de não conhecermos a evolução da doença após o recebimento dos espécimes clínicos para o diagnóstico não podemos afirmar se a alteração de aa nesta posição está relacionada com gravidade da doença.

Assim como a posição E₃₃₈, a E₃₉₄ também está presente no domínio III, e como este domínio está envolvido na ligação com o receptor celular e é alvo principal de anticorpos neutralizadores do vírus em humanos, conseqüentemente, as mutações nesta região podem ter conseqüências funcionais importantes (Thai et al., 2012). As substituições em E₄₂₈ e E₄₃₆ estão localizadas na região “stem”, após o ectodomínio, que está envolvida na formação do homotrímero da proteína E, na formação da partícula e retenção intracelular (de Borba et al., 2012; Osman et al., 2009). Alterações nas posições E₄₀₁, E₄₀₅, E₄₀₈ e E₄₁₂, também situadas na região “stem”, são descritas afetando a montagem dos DENV VLPs (partícula *virus like*), provavelmente devido a interferência com a heterodimerização da prM/E (Lin et al., 2011). Alterações nas posições E₁₉₆ (M→V) e E₂₉₆ (T→P) sugeridas como marcadores de virulência (Bordignon et al., 2008) não foram verificadas nas 48 amostras estudadas.

Os resíduos de aminoácidos nas posições E₂₉₇ e E₃₃₈ mudaram de caráter químico. A treonina em E₂₉₇ possui cadeia lateral polar não-carregada e ao ser mudada para uma metionina a proteína passa a ter nesta posição um aa apolar. O mesmo acontece na posição E₃₃₈, quando uma serina é substituída por uma leucina. Como esses aa ficam em domínios expostos e relacionados com propriedade antigênica, mudanças deste tipo podem alterar a função da proteína (Chen et al., 1996).

A análise da sequência nucleotídica da região codificante completa dos DENV-1 demonstrou que as amostras isoladas recentemente, pertencentes à linhagem 1b e 2, acumulam um número muito maior de substituições não sinônimas, apresentando mudanças de aa em relação à amostra de referência BR/90. A cepa AF226687.2/BR/90 foi selecionada como referência pois corresponde a um isolado

do DENV-1 representante do período de introdução do vírus no Brasil com genoma completo sequenciado e disponível no Genbank.

Três substituições ocorreram na prM, mas destaca-se na posição prM₂₉ a única amostra representante da linhagem 2, apresentando uma valina no lugar da alanina presente nas demais cepas e na cepa BR/90. A presença da valina no lugar da alanina já foi descrito por Kukreti et al (2009), ao comparar amostras da Índia com outras referências globais, sendo a valina presente nesta posição em algumas amostras indianas de 2001 e 2002, da Ilha Reunion 2004 e Singapura 90. Esta similaridade com estas cepas foi considerada um dos fatores que aproxima a amostra do estudo com amostras asiáticas e a distancia das amostras americanas.

Destacamos os genes E, NS1, NS2A, NS3 e NS5 como os genes que mais apresentaram substituições de aminoácidos. Substituições em tais genes podem modificar o comportamento do vírus, uma vez que o gene E está relacionado com o processo de ligação do vírus a receptores celulares e a NS1, NS2A, NS3 e NS5 estão envolvidas com a replicação viral.

Substituições nas posições NS1₈₄ e NS1₉₂ identificadas nas duas cepas da linhagem 1a do início do ano 2000 se localizam imediatamente anterior ao epítipo linear consenso ¹¹¹HKYSWK. Sabendo que a glicoproteína NS1 está envolvida nas etapas iniciais da replicação viral, seria importante determinar se a diferença de aa, entre as cepas estudadas, afeta a antigenicidade e atividade biológica da NS1 (dos Santos et al., 2002).

Suzuki e colaboradores (2007) realizaram um teste com DENV-1 NS1 mutante, demonstrando que o resíduo Y (Tirosina) na posição NS1₂₄₇, altamente conservado nos DENV-1, pode ser importante para função da NS1. Esta posição foi modificada somente na representante da linhagem 1b, onde a tirosina (Y) foi substituída por uma fenilalanina (F), sendo conservada nas demais amostras.

Na proteína NS3, posição 465, foi constatada a presença do resíduo do aa asparagina nas seis cepas analisadas, diferenciando-as da cepa de referência que apresenta uma serina, fato já descrito por dos Santos e colaboradores (2002). Considerando que duas cepas virais estudadas datam antes da BR/90 e que elas compartilham o mesmo tipo de aa com cepas de períodos posteriores de isolamento sugere-se que a mutação pontual ocorreu na própria BR/90, já relatada como uma possível descendente de uma cepa ancestral recombinante produzida por permuta

genética entre cepas da Jamaica (genótipo IV) e Singapura (genótipo I) (Holmes et al., 1999).

Outros estudos mostram que a NS3₂₀₉, localizada no subdomínio helicase-1, e NS3₄₃₅ e NS3₄₈₀, subdomínio helicase-2, são relacionadas com alteração na capacidade replicativa e apresentaram neurovirulência em camungondos. O domínio helicase está envolvido com o início da síntese do RNAs (-), agindo no desdobramento das estruturas secundárias do RNA fornecendo acesso à maquinaria de replicação (de Borba et al., 2012; dos Santos et al., 2002). A região que compreende o domínio helicase engloba os aa 180 a 619 do gene da proteína NS3. Dentre as amostras estudadas, mudanças em aa situados no subdomínio helicase-2 foram encontradas nas posições NS3₃₅₈, NS3₄₃₇, NS3₄₆₅, NS3₄₇₄. A amostra da linhagem 2 possui três destas substituições, a NS3₄₃₇, NS3₄₆₅ e NS3₄₇₄ (Tabela 5.4).

As substituições ocorridas na NS4B nas duas cepas da linhagem 1b de 2000-01, localizadas nos resíduos 34 (R→H) e 90 (I→L) foram as únicas conservadas. Esta proteína mantém fortes interações com a NS1, estando associada com a replicação viral (Lindenbach et al., 2007). Embora vários estudos analisando genoma completo apontem alterações nesta região, pouco se discute a respeito do significado destas mudanças.

Substituições na proteína NS5 podem afetar diretamente a replicação viral, uma vez que a mesma atua como RNA polimerase RNA-dependente, e junto com a NS3 pode atuar estimulando ambas atividades da NS3 de NTPase e RTPase (Lindenbach et al., 2007). Mudanças nucleotídicas que geram trocas de aa vêm sendo descritas para este gene. Mudanças descritas nas posições 114, 629, 635 e 784 da proteína NS5 foram encontradas entre as amostras analisadas. Demais trocas de aa foram identificadas, porém estas quatro substituições foram conservadas em pelo menos duas amostras do grupo. Tal padrão foi mostrado por dos Santos et al. (2002), analisando cepas brasileiras. A substituição do resíduo valina por isoleucina na NS5₁₁₄ e isoleucina por valina em NS5₇₈₄ foram prevalentes nas cepas estudadas, diferente da cepa BR/90. As duas cepas da linhagem 1a do ano de 2000-2001 compartilharam substituições de aa nas posições NS5₆₂₉ (L→F) e NS5₆₃₅ (T→S), as quais não foram detectadas nas demais cepas. Embora tenham sido observadas várias substituições de aa entre as amostras estudadas, não foram identificadas mudanças de caráter bioquímico. A presença de aa de mesma classe

bioquímica pode estar relacionada com a importância da conservação deste gene para o vírus, suportando e mantendo somente substituições sinônimas.

As matrizes de identidade e divergência nucleotídica e de aa demonstram o quão similar as sequências são entre os grupos. A partir desta análise pudemos concluir que as linhagens 1a e 1b são mais similares do que quando comparado com a linhagem 2. O que era esperado, uma vez que as mesmas se distribuem filogeneticamente em ramos distintos na árvore filogenética com suporte aceitável, acima de 75% (Figura 5.8). A linhagem 2, representada pela cepa 242_2010/RJ/2010 demonstrou uma grande similaridade com amostra de origem asiática. O gene E desta amostra apresenta um número maior de substituições do domínio III, como previamente citado, permitindo a sua separação do grupo da linhagem 1. Porém, estas substituições não foram as únicas responsáveis pela segregação desta cepa. A partir da análise das árvores filogenéticas construídas foi possível verificar a separação desta amostra em relação a linhagem 1 com suporte acima de 75%, com exceção dos genes C e NS4A (Figuras 5.9 - 5.16).

Observando as substituições encontradas ao longo do genoma foi verificado que o gene C se manteve conservado entre as amostras da linhagem 1a e 1b, apresentando duas substituições na linhagem 2. Através da análise filogenética este gene foi o único que não permitiu a genotipagem das amostras estudadas, apresentando suporte de *bootstrap* insuficiente na base de todos os ramos segregados (<75%). Isso pode estar relacionado à conservação deste segmento gênico entre os DENV, uma vez que o capsídeo viral, por não ficar exposto ao ambiente externo, sofre menor pressão seletiva e conseqüentemente menor divergência nucleotídica.

A diferenciação das amostras em linhagem 1a, 1b e 2 só foi obtida através da análise do gene E ou da região codificante completa, e o mesmo padrão de agrupamento foi mantido pela análise do domínio III da proteína E, sustentando o fato de tais alterações estarem associadas à divisão das linhagens.

Estudos tem revelado a recombinação nas cepas de DENV-1 (Tolou et al., 2001; Aaskov et al., 2007; Carvalho et al., 2010), contudo não encontramos evidência de recombinação entre o gene E das 48 cepas e nem no genoma codificante completo das seis cepas selecionadas. Porém, como descrito, uma amostra com sequência codificante completa foi identificada como parente mais próximo da cepa AF513110.1/BR/2001, selecionada com possível evento de

recombinação. O sequenciamento completo de um número maior de amostras poderá auxiliar no achado de um evento recombinante.

A evidência do evento recombinante em potencial está relacionada com o valor de P resultante dos métodos utilizados pelo programa RDP3, que indica a probabilidade aproximada dos sinais de recombinação detectados terem sido gerados por evolução convergente, em vez de a troca de sequências entre os genomas, sendo o valor $\leq 10^{-5}$ indicativo de possível recombinação (Carvalho et al., 2010).

A existência de cepas circulantes com padrão molecular correspondente as linhagens 1b e 2 demonstram que linhagens distintas podem co-circular em uma mesma localidade. A demonstração de casos brandos, graves e fatais em ambas as linhagens também pode ser um indicador de que as duas são igualmente capazes de provocar infecções brandas ou graves, não exibindo uma seletividade em relação a gravidade da doença (Tabela 5.1).

O isolamento recente de amostras pertencentes às linhagens 1b e 2, e não mais a 1a nos permite dizer que esta linhagem foi substituída ao longo das últimas duas décadas. Devido ao curto espaço de tempo para ocorrer evolução local a partir das amostras introduzidas na década de 1980, sugerimos que as duas linhagens circulantes foram originárias de introduções independentes no país. A alta similaridade entre a linhagem 1a e 1b sugere que esta última foi derivada de uma cepa com mutações que por seleção se sobrepôs à anterior. Porém, se analisarmos a distribuição temporal das amostras nas diversas Regiões do país representadas, é possível observar que no início dos anos 2000, quando ainda havia detecção das cepas da linhagem 1a, amostras isoladas no nordeste e uma do nosso estudo proveniente do estado do Espírito Santo (Região Sudeste), caracterizadas filogeneticamente como linhagem 2, já estavam circulando. Mas, somente a partir do ano de 2010 foi possível identificar cepas que eram semelhantes à linhagem 1, porém com padrão nucleotídico distinto que ocasionou um agrupamento das cepas na grupo chamado linhagem 1b, sugerido neste trabalho.

Ainda não está claro se a epidemia explosiva ocorrida no Brasil em 2009 e 2010, causada principalmente por DENV-1 foi devido a circulação de linhagens. A susceptibilidade da população a esse sorotipo, que não circulava intensamente por quase uma década, e a ocorrência de infecções secundárias em um país hiperendêmico podem também desempenhar um papel importante na epidemiologia

da doença. Neste contexto, o monitoramento do DENV é de grande relevância para observar a propagação de cepas potencialmente virulentas, assim como para avaliar o seu impacto sobre a população durante um surto. Devido à geografia do Brasil e epidemiologia da dengue, juntamente ao fato do país possuir regiões turísticas, o sequenciamento completo ou parcial (gene E) de vírus pertencentes a cada linhagem identificada, se faz necessário para melhor caracterizar esses eventos de substituições e introduções de possíveis genótipos e linhagens no país.

7 CONCLUSÕES

- A análise filogenética das cepas de DENV-1 baseada na sequência nucleotídica do gene E ou região codificante completa confirmou a circulação do genótipo V (América/África) no país;
- A caracterização molecular do gene E demonstrou que uma única substituição conservada no domínio I da proteína na posição E₂₉₇ é capaz de diferenciar as amostras da linhagem 1a das linhagens 1b e 2, e que alterações de aminoácidos nas posições E₃₃₈, E₃₉₄, E₄₂₈ e E₄₃₆ são responsáveis pela separação entre as linhagens 1b e 2;
- A análise filogenética baseada no segmento nucleotídico correspondente ao domínio III do gene E foi suficiente para diferenciar as distintas linhagens de DENV-1;
- A análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas dos genes que codificam para as proteínas estruturais e não estruturais podem ser utilizadas para realização da genotipagem dos DENV-1, com exceção do gene C, porém somente o gene E ou genoma codificante completo permite a discriminação das linhagens;
- A linhagem 1b possui alta similaridade com amostras de origem americana, assim como a linhagem 1a, enquanto as amostras da linhagem 2, possui maior relação filogenética com as cepas de origem asiática;
- A circulação de múltiplas linhagens no país nos 25 anos de circulação foi evidenciada, havendo substituição e co-circulação ao longo do tempo;
- Sugere-se que as linhagens circulantes atuais no Brasil representam introduções independentes;

- Não foi possível detectar eventos de recombinação entre as cepas deste estudo, porém, a cepa 36034/RJ/1988 pertencente à linhagem 1a foi identificada como parente mais próximo da cepa de referência AF513110.1/BR/2001, potencialmente recombinante.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar o sequenciamento das regiões não codificantes das cepas de DENV-1 estudadas, a fim de verificar possíveis mudanças nucleotídicas que poderiam estar envolvidas em alteração conformacional das regiões 5'NC e 3'NC, envolvidas no processo de replicação viral;
- Analisar o processo de evolução das cepas de DENV-1 representantes das linhagens identificadas no Brasil durante os 25 anos de circulação, buscando entender a origem e dispersão das variantes no país ao longo do tempo;
- Identificar a variação viral intra-hospedeiro de cada linhagem dos DENV-1 isolados, verificando a prevalência destas variantes virais por *deep sequencing*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aaskov J, Buzacott K, Field E, Lowry K, Berlioz-Arthaud A, Holmes EC. Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 12):3334-40.
2. Alberts B [et al.]. *Biologia molecular da célula.* 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
3. Alcaraz-Estrada SL, Manzano MI, Del Angel RM, Levis R, Padmanabhan R. Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 11):2713-8.
4. Anderson CR, Downs WG, Hell AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science.* 1956;124(3214):224-5.
5. Añez G, Rios M. Dengue in the United States of America: a worsening scenario? *Biomed Res Int.* 2013;2013:678645.
6. Bordignon J, Probst CM, Mosimann AL, Pavoni DP, Stella V, Buck GA, et al. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. *Virology.* 2008;377(2):319-29.
7. Brathwaite Dick O, San Martín JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(4):584-93.
8. Brown JL, Wilkinson R, Davidson RN, Wall R, Lloyd G, Howells J, et al. Rapid diagnosis and determination of duration of viraemia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(2):140-3.
9. Burke D, Monath T. Flaviviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology.* 1. 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 1043-126.
10. Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo DeV, Ramos RT, Medeiros DB, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):805-12.
11. Carrillo-Valenzo E, Danis-Lozano R, Velasco-Hernández JX, Sánchez-Burgos G, Alpuche C, López I, et al. Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement. *Arch Virol.* 2010;155(9):1401-12.

12. Carvalho SE, Martin DP, Oliveira LM, Ribeiro BM, Nagata T. Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. *Virus Genes*. 2010;40(1):60-6.
13. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88.
14. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011;3(9):1562-608.
15. Chen SP, Yu M, Jiang T, Deng YQ, Qin CF, Han JF, et al. Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China. *Arch Virol*. 2008;153(6):1175-9.
16. Chen Y, Maguire T, Marks RM. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol*. 1996;70(12):8765-72.
17. Chimelli L, Hahn MD, Netto MB, Ramos RG, Dias M, Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. *Clin Neuropathol*. 1990;9(3):157-62.
18. Chungue E, Marché G, Plichart R, Boutin JP, Roux J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(5):708-11.
19. de Borba L, Strottmann DM, de Noronha L, Mason PW, Dos Santos CN. Synergistic interactions between the NS3(hel) and E proteins contribute to the virulence of dengue virus type 1. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4):e1624.
20. De Paula SO, Pires Neto RJ, Corrêa JA, Assumpção SR, Costa ML, Lima DM, et al. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(3):266-9.
21. De Simone TS, Nogueira RM, Araújo ES, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004;98(9):553-62.
22. Dietz VJ, Gubler DJ, Rigau-Pérez JG, Pinheiro F, Schatzmayr HG, Bailey R, et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *Am J Epidemiol*. 1990;131(4):693-701.

23. dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoso SP, Rey F, Deubel V, et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res.* 2002;90(1-2):197-205.
24. dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J.* 2011;8:387.
25. Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol.* 2012;157(11):2061-73.
26. Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira FeB, da Rocha Queiroz Lima M, et al. Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2095.
27. Figueiredo LT, Batista WC, Igarashi A. A simple reverse transcription-polymerase chain reaction for dengue type 2 virus identification. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(3):395-8.
28. Figueiredo L. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. *Virus Review & Research;* 1996. p. 9-16.
29. Figueiredo L. Vacinas contra o dengue. Ribeirão Preto: Medicina; 1999. p. 21-5.
30. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 2002;303(1):110-9.
31. Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. *Bull Pan Am Health Organ.* 1989;23(4):397-404.
32. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
33. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* 1984;33(1):158-65.
34. Gubler D, Sather G. Laboratory diagnostic of Dengue hemorrhagic fever. *Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue: Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil; Maio 15-19; Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1988. p. 291-322.*

35. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. London: Cab. International; 1997. p. 1-21.
36. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003;27(1):1-13.
37. Guzmán MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Alvarez M, Vazques S, et al. Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol*. 2000;152(9):793-9; discussion 804.
38. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(4):408-17.
39. Halstead SB. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*. 1974;23(5):974-82.
40. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*. 1980;58(1):1-21.
41. Halstead SB. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue. *Rev Infect Dis*. 1984;6(2):251-64.
42. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960;131(3407):1102-3.
43. Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4(4):450-5.
44. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol*. 2012;55(4):289-95.
45. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3(4):376-96.
46. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*. 2003;3(1):19-28.
47. Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol*. 1999;16(3):405-9.
48. Hotta S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J Infect Dis*. 1952;90(1):1-9.

49. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978;40(3):531-44.
50. Knight KL, Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). In: Foundation TTS, editor. 1977. p. 611.
51. Konishi E, Kuno G. In memoriam: Susumu Hotta (1918-2011). *Emerg Infect Dis.* 2013;19(5):843-4.
52. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(1):89-92.
53. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717-25.
54. Kukreti H, Dash PK, Parida M, Chaudhary A, Saxena P, Rautela RS, et al. Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. *Virology.* 2009;6:1.
55. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 1998;72(1):73-83.
56. Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(1):153-9.
57. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:71-92.
58. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):545-51.
59. Lima MaR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Limonta D, dos Santos FB. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(5):e1147.
60. Lima MaR, Nogueira RM, Schatzmayr HG, dos Santos FB. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e738.
61. Lin SR, Zou G, Hsieh SC, Qing M, Tsai WY, Shi PY, et al. The helical domains of the stem region of dengue virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry. *J Virol.* 2011;85(10):5159-71.

62. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol.* 1999;73(6):4611-21.
63. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007. p. 1101-33.
64. Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, et al. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol.* 1998;72(3):2132-40.
65. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2462-3.
66. Mason PW, McAda PC, Mason TL, Fournier MJ. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. *Virology.* 1987;161(1):262-7.
67. Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virol J.* 2010;7:226.
68. Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(3):307-13.
69. Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993;35(2):149-54.
70. Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araújo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol.* 1999;14(3):183-9.
71. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* 1997;16(4):204-8.
72. Miller S, Romero-Brey I, Bartenschlager R. The Dengue Virus Replication Complex. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1^a ed: Caister Academic Press; 2010. p. 35-53.

73. Moreland JL, Gramada A, Buzko OV, Zhang Q, Bourne PE. The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:21.
74. Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2107-10.
75. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013;98(2):192-208.
76. Muñoz-Jordán JL, Santiago GA, Margolis H, Stark L. Genetic relatedness of dengue viruses in Key West, Florida, USA, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(4):652-4.
77. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv*. 2011;29(2):239-47.
78. Mutebi JP, Rijnbrand RC, Wang H, Ryman KD, Wang E, Fulop LD, et al. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the *Flavivirus* genus based on the 3' noncoding region. *J Virol*. 2004;78(18):9652-65.
79. Muylaert IR, Galler R, Rice CM. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J Virol*. 1997;71(1):291-8.
80. Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizet M, Modis Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *J Virol*. 2009;83(9):4338-44.
81. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue Viruses in Brazil. World Health Organization (WHO); 2002. p. 77-83.
82. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):255-6.
83. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
84. Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect*. 1993;111(1):163-70.

85. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2000;16(1):205-11.
86. Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araújo ES, de Filippis AM, et al. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(3):297-304.
87. Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MF, Farias Filho JD. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988;83(2):219-25.
88. Nogueira RM, Zagner SM, Martins IS, Lampe E, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86(2):269.
89. OMS. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New ed. Geneva: World Health Organization; 2009.
90. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.
91. Osman O, Fong MY, Sekaran SD. Genetic characterization of dengue virus type 1 isolated in Brunei in 2005-2006. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 3):678-86.
92. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res*. 2008;7(3):861-71.
93. PAHO. Number of reported cases of dengue & dengue haemorrhagic fever (DHF), region of the Americas 2002 (by country and subregion) [Internet]. Pan American Health Organization. 2002. [cited 2003]. Available from: <http://www.paho.org/English/HCP/HCT/VBD/dengue-cases-2002.htm>.
94. PAHO. Alerta epidemiológica: Dengue 21 de Junio 2013 [Internet]. Pan American Health Organization. 2013. [cited 2013]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22104&Itemid=
95. Rambaut A. Estimating the rate of molecular evolution: incorporating non-contemporaneous sequences into maximum likelihood phylogenies. *Bioinformatics*. 2000;16(4):395-9.
96. Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*. 1990;174(2):450-8.

97. Rede Dengue. Mapa da dengue aponta 157 municípios em situação de risco e 525 em alerta [Internet]. Rede de Ações Integradas de Atenção à Saúde no Controle da Dengue. 2013. [cited 2013]. Available from: <http://www.fiocruz.br/rededengue/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=235&sid=9>.
98. Repik PM, Dalrymple JM, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(3):577-89.
99. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 1990;174(2):479-93.
100. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:315-41.
101. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
102. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int.* 2013;2013:690835.
103. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952;1(1):30-50.
104. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945;101(2634):640-2.
105. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.
106. Schatzmayr H, Cabral M. A virologia no Estado do Rio de Janeiro: uma visão global. 2a Edição ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2012. 176 p.
107. Shurtleff AC, Beasley DW, Chen JJ, Ni H, Suderman MT, Wang H, et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. *Virology.* 2001;281(1):75-87.
108. SESDEC. Relatório de casos de Dengue - 2008 [Internet]. Secretaria de Saúde e Defesa Civil/RJ. 2009. [cited 2009]. Available from: http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Dengue/Relatório%20de%20Casos%20de%20Dengue%20_18-02-2009%20-%2019h25m_%20-%202008.pdf.
109. Silva Jr J. DENGUE: Situação e perspectivas [Internet]. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2013. [cited 2013]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2b_2013_abril.pdf.

110. Siqueira Jr J, Vinhal L, Said R, Hoffmann J, Martins J, Barbiratto S, et al. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010 Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde Secretaria de Vigilância em Saúde/MS; 2011. p. 157-71.
111. Souza LJ, Zagne SMO, Rocha NSM, Nogueira FBD. Tratamento da Dengue. In: Souza LJd, editor. Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2008. p. 115-23.
112. Suzuki R, de Borba L, Duarte dos Santos CN, Mason PW. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology*. 2007;362(2):374-83.
113. SVS/MS. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007 [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2008a. [cited 2008]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf.
114. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde Informe Epidemiológico da Dengue Janeiro a Novembro de 2008 [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2008b. [cited 2009]. Available from: <http://www.combateadengue.com.br/wp-content/uploads/2009/02/boletim-janeiro-novembro-2008.pdf>.
115. SVS/MS. Caderno 9 Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
116. SVS/MS. Situação Epidemiológica [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2013. [cited 2013]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1525.
117. Teixeira MG, Costa MaC, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25 Suppl 1:S7-18.
118. Thai KT, Henn MR, Zody MC, Tricou V, Nguyet NM, Charlebois P, et al. High-resolution analysis of intrahost genetic diversity in dengue virus serotype 1 infection identifies mixed infections. *J Virol*. 2012;86(2):835-43.

119. Tolou HJ, Couissinier-Paris P, Durand JP, Mercier V, de Pina JJ, de Micco P, et al. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *J Gen Virol*. 2001;82(Pt 6):1283-90.
120. Tristão-Sá R, Zagne SMO. Classificação da Dengue. In: Souza LJD, editor. *Dengue: diagnóstico, tratamento e prevenção*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2008. p. 67-74.
121. Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002;298(1):63-72.
122. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*. 2003;20(1):122-9.
123. Vasilakis N. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; Bangkok, Thailand 2013.
124. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008;72:1-76.
125. Vasilakis N, Hanley KA, Weaver SC. Dengue Virus Emergence from its Sylvatic Cycle. In: Hanley KA, Weaver SC, editors. *Frontiers in Dengue Virus Research*. 1ª ed. USA: Caister Academic Press; 2010. p. 183-217.
126. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):523-40.
127. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):365-75.
128. Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SYa, Horzinek MC, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. *Flaviviridae*. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
129. WHO. Break-borne fever. *Nature*. 2002:672-4.
130. WHO. Impact of Dengue [Internet]. World Health Organization. 2009. [cited 2009]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.
131. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. . Geneva: World Health Organization; 2013.

132. Xu D, Zhang Y. Generating triangulated macromolecular surfaces by Euclidean Distance Transform. *PLoS One*. 2009;4(12):e8140.
133. Zlotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(2):548-53.
134. Zhang C, Mammen MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol*. 2005;79(24):15123-30.

10 ANEXO

10.1 Nome e abreviatura dos aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de três letras	Abreviatura de uma letra	Cadeia lateral
Ácido aspártico	Asp	D	Ácida
Ácido glutâmico	Glu	E	Ácida
Alanina	Ala	A	Apolar
Cisteína	Cys	C	Apolar
Fenilalanina	Phe	F	Apolar
Glicina	Gly	G	Apolar
Isoleucina	Ile	I	Apolar
Leucina	Leu	L	Apolar
Metionina	Met	M	Apolar
Valina	Val	V	Apolar
Triptofano	Trp	W	Apolar
Prolina	Pro	P	Apolar
Histidina	His	H	Básica
Lisina	Lys	K	Básica
Arginina	Arg	R	Básica
Asparagina	Asn	N	Polar não-carregada
Glutamina	Gln	Q	Polar não-carregada
Serina	Ser	S	Polar não-carregada
Treonina	Thr	T	Polar não-carregada
Tirosina	Tyr	Y	Polar não-carregada

Fonte: Alberts et al., 2010.

10.2 Matriz de porcentagem da identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada no gene E das linhagens dos DENV-1.

Legenda:

Quadrante superior acima da diagonal: porcentagem de aminoácidos; quadrante inferior abaixo da diagonal (em negrito): porcentagem de nucleotídeo. Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos foi determinada por BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Amostras: 1 a 4 (linhagem 1a), 5 (linhagem 2), 6 (linhagem 1b), 7 (Genótipo I – Ásia), 8 (Genótipo III – Malásia), 9 (Genótipo IV – Pacífico Sul), 10 (Genótipo V – América/África).

Anexo 10.2 Matriz de porcentagem da identidade nucleotídica e de aminoácidos baseada no gene E das linhagens dos DENV-1.

AMOSTRAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 31768/RU/BR/86		99,7%	100,0%	99,5%	100,0%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,3%
2 31807/BR/RJ/1986	99,6%		99,7%	99,3%	99,7%	99,5%	99,7%	99,3%	99,5%	99,7%	100,0%	99,5%	99,5%	99,5%	99,3%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,1%
3 36034/BR/RJ/1988	99,4%	99,5%		99,3%	100,0%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,3%
4 38159/BR/RJ/1989	99,3%	99,4%	99,2%		99,5%	99,5%	99,5%	99,3%	99,3%	99,3%	99,5%	99,3%	99,3%	99,3%	99,1%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,9%
5 45907/BR/MS/1991	99,3%	99,3%	99,1%	99,1%		99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	99,3%
6 58485/BR/MG/97	98,9%	98,9%	98,7%	98,7%	99,1%		99,7%	99,5%	98,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	99,7%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,1%
7 58522/BR/MG/1997	99,1%	99,1%	98,9%	98,9%	99,3%	99,3%		99,7%	99,7%	99,7%	100,0%	99,7%	99,7%	99,7%	99,5%	100,0%	100,0%	100,0%	99,7%	99,1%
8 58540/BR/RJ/1997	98,7%	98,8%	98,6%	98,6%	99,0%	99,4%	99,2%		99,5%	99,5%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
9 58610/BR/RJ/1997	98,8%	98,9%	98,7%	98,6%	99,1%	99,5%	99,3%	99,2%		99,5%	99,7%	99,7%	99,7%	99,5%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
10 58724/BR/RJ/1997	98,7%	98,8%	98,6%	98,5%	99,0%	99,5%	99,2%	99,1%	99,3%		99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
11 60068/BR/RJ/1998	98,7%	98,8%	98,6%	98,5%	99,0%	99,4%	99,2%	99,1%	99,3%	99,3%		99,2%	99,2%	99,2%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
12 60443/BR/CE/1998	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	98,9%	99,1%	99,1%	99,1%	99,3%	99,3%	99,2%		99,2%	99,2%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
13 60606/BR/MG/1998	98,8%	98,9%	98,7%	98,6%	99,1%	99,5%	99,5%	98,9%	99,0%	99,0%	98,9%	98,9%		99,0%	99,3%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
14 60619/BR/MG/1998	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	98,9%	99,2%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,0%	98,9%		99,1%	99,7%	99,7%	99,7%	99,7%	99,1%
15 62114/BR/ES/1998	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	99,1%	99,6%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	98,9%	98,8%	98,9%		99,5%	99,5%	99,5%	99,5%	98,9%
16 62189/BR/ES/1998	99,0%	98,9%	98,7%	98,7%	99,1%	99,6%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	98,9%	98,8%	98,9%	98,9%		100,0%	100,0%	100,0%	99,3%
17 64450/BR/RJ/1999	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	99,1%	99,2%	99,1%	99,2%	99,1%	99,1%	99,2%	99,2%	98,9%	99,0%	99,1%	98,9%		100,0%	100,0%	99,3%
18 64451/BR/RJ/1999	98,8%	98,7%	98,5%	98,5%	99,1%	99,5%	99,3%	99,2%	99,2%	99,2%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,1%	98,9%	100,0%		100,0%	99,3%
19 64616/BR/RJ/1999	98,6%	98,7%	98,5%	98,4%	99,0%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,1%	98,9%	99,6%		99,6%	99,3%
20 66568/BR/RJ/2000	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	99,1%	99,3%	99,1%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,4%	98,9%	99,0%	99,0%	98,9%	99,5%
21 66994/BR/ES/2000	98,7%	98,8%	98,6%	98,5%	99,1%	99,4%	99,2%	99,2%	99,2%	99,2%	99,3%	99,2%	98,9%	99,0%	99,5%	99,5%	99,1%	99,1%	99,1%	99,5%
22 67993/BR/PI/2000	98,8%	98,9%	98,7%	98,6%	99,1%	99,5%	99,3%	99,2%	99,2%	99,2%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,5%	99,5%	99,1%	99,1%	99,1%	99,5%
23 68826/BR/RJ/2001	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	98,9%	99,5%	99,1%	99,1%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,3%	98,9%	99,6%	99,6%	99,1%	99,5%
24 71602/BR/RJ/2001	98,7%	98,7%	98,5%	98,5%	99,1%	99,3%	99,1%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	99,3%	98,9%	99,0%	99,4%	98,9%	99,0%	99,0%	98,9%	99,5%
25 75424/BR/ES/2002	98,3%	98,4%	98,2%	98,1%	98,7%	99,3%	98,8%	98,7%	98,9%	99,0%	99,3%	99,3%	98,9%	98,9%	99,3%	98,6%	98,8%	98,8%	98,7%	99,1%
26 78834/BR/RJ/2002	97,1%	97,2%	96,9%	96,9%	96,9%	96,4%	96,6%	96,2%	96,3%	96,2%	96,2%	96,2%	96,4%	96,4%	96,3%	96,4%	96,4%	96,4%	96,5%	96,0%
27 55_2009/ES/BR	96,6%	96,7%	96,3%	96,4%	96,4%	95,8%	96,0%	95,7%	95,8%	95,9%	96,0%	95,6%	96,1%	96,1%	96,0%	95,8%	96,2%	96,2%	96,2%	96,4%
28 1433_09/BR/RJ/2009	96,6%	96,7%	96,3%	96,4%	96,4%	95,8%	96,0%	95,7%	95,8%	95,9%	96,0%	95,6%	96,1%	96,1%	96,0%	95,8%	96,2%	96,2%	96,2%	96,4%
29 1435_09/BR/RJ/2009	96,6%	96,7%	96,3%	96,4%	96,4%	95,8%	96,0%	95,7%	95,8%	95,9%	96,0%	95,6%	96,1%	96,1%	96,0%	95,8%	96,2%	96,2%	96,2%	96,4%
30 19_2010/BR/RJ/2010	96,8%	96,9%	96,5%	96,6%	96,6%	96,0%	96,2%	95,9%	96,0%	96,0%	96,2%	95,8%	96,1%	96,1%	96,0%	96,4%	96,4%	96,4%	96,4%	96,0%
31 20_2010/BR/RJ/2010	96,8%	96,9%	96,5%	96,6%	96,6%	96,0%	96,2%	95,9%	96,0%	96,0%	96,2%	95,8%	96,1%	96,1%	96,0%	96,4%	96,4%	96,4%	96,4%	96,0%
32 188_2010/BR/RJ/2010	96,8%	96,9%	96,5%	96,6%	96,6%	96,0%	96,2%	95,9%	96,0%	96,0%	96,2%	95,8%	96,1%	96,1%	96,0%	96,4%	96,4%	96,4%	96,4%	96,0%
33 242/2010/BR/RJ/2010	96,8%	96,9%	96,5%	96,6%	96,7%	96,2%	96,4%	96,0%	96,1%	96,0%	96,2%	96,0%	96,2%	96,2%	96,1%	96,2%	96,4%	96,4%	96,4%	96,1%
34 516/2010/BR/ES/2010	96,7%	96,8%	96,4%	96,5%	96,8%	96,1%	96,2%	95,8%	95,9%	95,8%	96,0%	95,8%	96,0%	96,0%	96,0%	96,0%	96,2%	96,2%	96,2%	95,9%
35 568_2010/BR/ES/2010	96,9%	96,9%	96,6%	96,7%	96,8%	96,1%	96,2%	96,0%	96,0%	96,0%	96,2%	95,9%	96,0%	96,0%	96,0%	96,0%	96,2%	96,2%	96,2%	96,0%
36 BR/0594_2011/CE/2010	96,8%	96,9%	96,5%	96,6%	96,7%	96,2%	96,4%	96,0%	96,0%	96,0%	96,2%	95,8%	96,1%	96,1%	96,0%	96,0%	96,2%	96,2%	96,2%	96,0%
37 512_2011/BR/RJ/2011	96,9%	96,9%	96,6%	96,7%	96,8%	96,1%	96,2%	96,0%	96,0%	96,0%	96,2%	95,8%	96,1%	96,1%	96,0%	96,0%	96,2%	96,2%	96,2%	96,0%
38 514/2011/BR/RJ/2011	96,6%	96,7%	96,3%	96,4%	96,4%	95,8%	96,0%	95,7%	95,8%	95,7%	96,0%	95,6%	96,0%	95,9%	95,8%	95,8%	96,0%	96,0%	96,1%	95,8%
39 15_2010/BR/RJ/2010	98,1%	98,0%	97,9%	98,0%	97,9%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	97,4%	97,4%	97,5%	97,5%
40 876/2010/BR/MS/2010	97,9%	98,0%	97,8%	97,9%	97,8%	97,6%	97,6%	97,6%	97,6%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,3%	97,4%
41 2676/2010/BR/RJ/2010	97,9%	97,9%	97,7%	97,8%	97,7%	97,4%	97,5%	97,4%	97,3%	97,4%	97,4%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,4%	97,3%
42 BR/1144_2011/AJ/2010	97,9%	98,0%	97,8%	97,9%	97,8%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,4%	97,4%
43 BR/1142_2011/AJ/2010	98,0%	98,1%	97,9%	98,0%	97,9%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,4%	97,4%
44 0122/2011/BR/2011	97,7%	97,7%	97,5%	97,6%	97,5%	97,2%	97,3%	97,2%	97,1%	97,2%	97,2%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,3%	97,1%
45 169_2011/BR/RJ/2011	97,9%	97,9%	97,7%	97,8%	97,7%	97,4%	97,5%	97,4%	97,3%	97,4%	97,4%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,3%	97,4%	97,3%
46 325_2011/BR/RJ/2011	97,9%	98,0%	97,8%	97,9%	97,8%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,4%	97,4%
47 1049_2011/BR/RJ/2011	97,9%	98,0%	97,8%	97,9%	97,8%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,4%	97,4%
48 1266/2011/BR/RJ/2011	97,9%	98,0%	97,8%	97,9%	97,8%	97,6%	97,6%	97,6%	97,5%	97,6%	97,4%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,4%	97,3%	97,3%	97,4%	97,4%
49 AB074760.1/Mochizuki/4	93,5%	93,4%	93,2%	93,4%	93,7%	93,2%	93,4%	93,3%	93,0%	93,1%	93,1%	93,0%	92,9%	93,1%	93,1%	93,0%	93,1%	93,1%	93,0%	93,3%
50 AF425629.1/TH/63	92,9%	92,7%	92,7%	92,8%	93,1%	92,9%	92,8%	92,7%	92,7%	92,7%	92,7%	92,7%	92,6%	92,7%	92,8%	92,6%	92,7%	92,7%	92,7%	92,8%
51 AF425622.1/Maha/72	92,7%	92,7%	92,5%	92,7%	92,9%	92,3%	92,8%	92,4%	92,3%	92,3%	92,3%	92,3%	92,5%	92,4%	92,4%	92,4%	92,3%	92,3%	92,3%	92,4%
52 UB8535.1/Westpac/74	92,3%	92,2%	92,1%	92,1%	92,5%	91,9%	92,0%	92,1%	91,9%	91,9%	91,9%	91,8%	91,9%	91,8%	91,9%	91,8%	91,9%	91,9%	91,9%	91,9%
53 AF226685.2/DenIR/90	99,1%	99,1%	98,9%	99,4%	98,9%	98,5%	98,7%	98,3%	98,4%	98,3%	98,3%	98,3%	98,4%	98,3%	98,4%	98,5%	98,3%	98,3%	98,2%	98,4%

11 APÊNDICE

Durante o período de atividades desenvolvidas no Laboratório de Flavivírus participei de estudos sobre vigilância, caracterização molecular e filogenia dos DENV.

11.1 First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil (publicado em Virol J. 2011 Aug 3;8:387).

11.2 Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance (publicado em Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Nov;107(7):940-5).

11.3 Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil (publicado em Virol J. 2013 Jan 2;10:3).

11.4 Twenty years of DENV-2 activity in Brazil: molecular characterization and phylogeny of strains isolated from 1990 to 2010 (publicado em PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(3):e2095).

SHORT REPORT

Open Access

First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil

Flavia B dos Santos^{1*}, Fernanda B Nogueira¹, Márcia G Castro², Priscila CG Nunes¹, Ana Maria B de Filippis¹, Nieli RC Faria¹, Jaqueline BS Simões¹, Simone A Sampaio¹, Clarice R Santos¹ and Rita Maria R Nogueira¹

Abstract

Background: In Brazil dengue has been a major public health problem since DENV-1 introduction and spread in 1986. After a low or silent co-circulation, DENV-1 re-emerged in 2009 causing a major epidemic in the country in 2010 and 2011. In this study, the phylogeny of DENV-1 strains isolated in RJ after its first introduction in 1986 and after its emergence in 2009 and 2010 was performed in order to document possible evolutionary patterns or introductions in a re-emergent virus.

Findings: The analysis of the E gene sequences demonstrated that DENV-1 isolated during 2009/2010 still belong to genotype V (Americas/Africa) but grouping in a distinct clade (lineage II) of that represented by earlier DENV-1 (lineage I). However, strains isolated in 2011 grouped together forming another distinct clade (lineage III).

Conclusions: The monitoring of DENV is important to observe the spread of potentially virulent strains as well to evaluate its impact over the population during an outbreak. Whether explosive epidemics reported in Brazil caused mainly by DENV-1 was due to lineage replacement, or due the population susceptibility to this serotype which has not circulated for almost a decade or even due to the occurrence of secondary infections in a hyperendemic country, is not clear. This is the first report of multiple lineages of DENV-1 detected in Brazil.

Keywords: Dengue virus type 1, multiple lineages, phylogeny, Rio de Janeiro

Findings

Dengue viruses (DENV) are the most important human arboviruses worldwide, transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* and currently it is estimated that 70 to 500 million dengue infections occur annually in 124 endemic countries. Nearly 3.6 billion people (55% of world population) are at risk of contracting the disease [1]. The rapid global spread of the four DENV serotypes (DENV-1 to 4) in the last 50 years resulted in the dispersal of genotypes associated with increased severity [2].

In Brazil, the State of Rio de Janeiro (RJ), in the Southeast region (Figure 1A) has been important to the epidemiology of dengue, with the introduction of DENV-1 in 1986, DENV-2 in 1990 and DENV-3 in 2000 [3]. The latter was prevalent in the majority of Brazilian States from 2002 to 2006 and, from 2007 to 2009 this serotype was displaced by DENV-2. In 2008,

the Southeast and the Northeast regions were responsible for approximately 80% of the cases reported in the most severe epidemic in the country, where DENV-2 and DENV-3 were detected in 96.4% of the cases isolated. After a low or silent circulation, DENV-1 re-emerged in the Southeast region in 2009 (Figure 1B) and it was the serotype detected in 50.4% of the viral isolations, displacing DENV-2 (30.5%) and DENV-3 (19.1%) [4].

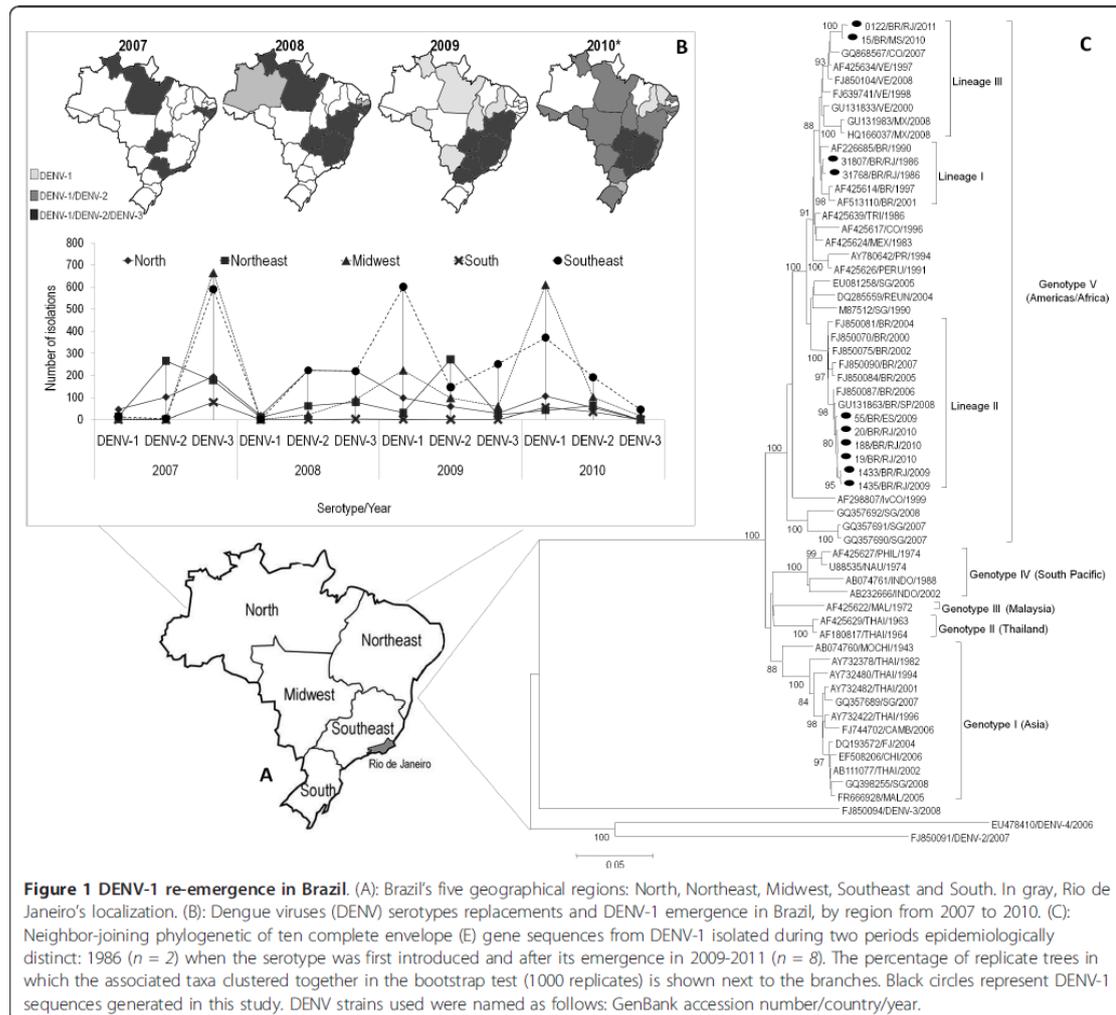
DENV-1 falls into five distinct genotypes designated as genotype I (Southeast Asia, China and East Africa), genotype II (Thailand), genotype III (Malaysia), genotype IV (South Pacific) and genotype V (America/Africa) and the existence of lineages with distinct geographic and temporal relationships have been suggested [5,6]. Moreover, lineage turnover or replacements have become more frequently common in phylogenetic studies. The term "lineage" has been used non-officially to characterize those viruses clustered in clades in a taxonomic level beneath genotype [7].

* Correspondence: flaviab@ioc.fiocruz.br

¹Laboratório de Flavivirus, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article



Apêndice 11.1



In this study, the phylogeny of DENV-1 strains isolated in RJ after its first introduction in 1986 and after its emergence in 2009 and 2010 was performed in order to document possible evolutionary patterns or introductions in a re-emergent virus. Phylogenetic studies may constitute an important tool to monitor the introduction and spread of viruses as well as to predict the potential epidemiological consequences of such events.

The strains analyzed in this study belong to a collection obtained from acute phase human serum through the passive surveillance system performed by the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, from an ongoing Project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Ministry

of Health-Brazil. To avoid mutations introduced by *in vitro* passages of the virus in cell cultures we used DENV-1 strains ($n = 10$; from 1986 [$n = 2$], 2009 [$n = 3$], 2010 [$n = 4$] and 2011 [$n = 1$]) extracted directly from serum previously detected by RT-PCR or originally isolated from cell culture when serum did not yield enough volume for RNA extraction.

DENV-1 isolation was performed by inoculation into C6/36 *Aedes albopictus* cell line [8] and isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies [9]. RT-PCR for detecting and typing DENV from serum was performed as described previously [10]. For RT-PCR and sequencing the viral RNA was extracted from infected cell culture supernatant or directly from the

Apêndice 11.1

patients serum using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and stored at -70°C for DENV typing and sequencing.

The sequencing reaction was performed by reverse transcription using 5 µL of extracted RNA in 25 µL of AccessQuick™ RT-PCR System (Promega Corporation) and specific oligonucleotides primers which sequences can be provided upon request, to amplify the C/prM/M/E region of 2,325 bp. Amplification was conducted using a Model 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). PCR products were purified from using QIAquick Gel extraction Kit or QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) and used as template for cycle sequencing. Sequencing reactions were performed as recommended in the BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and the products were analyzed using an automated 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Sequences for the complete E gene (1,485 nucleotides) were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The sequences multiple alignment was performed using CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the phylogenetic analysis by MEGA 4 software (<http://www.megasoftware.net>), using the "Neighbor-joining" method, according to the Tamura-Nei model, with a bootstrap of 1,000 replications. Strains representative from the five genotypes available in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) were used for the comparison, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 strains were used as outgroup to root the trees.

The results based on the analysis of the E gene sequences have demonstrated that the DENV-1 strains isolated during 2009/2010 in RJ and one isolated in the State of Espírito Santo (ES) used for comparison purposes, still belong to genotype V (America/Africa) previously detected in the country, but grouping into a distinct clade (lineage II) of that represented by earlier Brazilian DENV-1 strains (lineage I) with a strong bootstrap support. In

fact, the re-emergent DENV-1 was more closely related to strains isolated in Singapore in 1990 and in 2005, suggesting a probable Asian origin. However, one strain isolated in 2010 (15/BR/MS/2010) from a RJ resident who traveled to Mato Grosso do Sul (MS), Midwest region and one strain recently isolated in 2011 in RJ (0122/BR/RJ/2011) grouped together forming another distinct clade (lineage III), grouping with strains isolated in 2007 and 2008 in Colombia, Venezuela and Mexico, suggesting a Latin American origin for those strains (Figure 1C).

In spite of the continuous low circulation in the country, the low percentage of identity of the newly isolated viruses with those strains first introduced in the 80's suggest that the re-emergent DENV-1 did not evolved locally but occurred probably due to new lineages introductions in the country (Table 1). The analysis based on the E gene sequences from DENV-1 strains isolated in the Northern region of Brazil from 2000 to 2008 available on GenBank support the idea that those viruses could have been introduced earlier and their low or silent circulation could be due to the prevalent DENV-3/DENV-2 circulation during that time (unpublished data). The circulation of more than one DENV-1 "lineage" has been described in Asia [6] and in the Americas [7]. A previous study by Carrillo-Valenzo [11] recently reported multiple viral lineages introductions for each DENV serotype in Mexico with frequent lineage replacements. In fact, lineage replacements appear to be a more common observation than long term lineage persistence [12].

Lineage replacement occurs when an entire clade of viruses that has persisted in a particular locality for a period of time is not evident on a subsequent sampling, indicating that it has dropped dramatically in frequency, even experiencing extinction, and sometimes replaced by a new clade of viruses [13]. Despite this, the evolutionary processes controlling these events are not fully understood. Recently, it has been suggested that despite

Table 1 Sequences identity between Brazilian DENV-1 based on the E gene analysis (1,485 nucleotides)

DENV-1 Strains	55/2009 ^a	1435/2009	1433/2009	15/2010	19/2010	20/2010	188/2010	0122/2011	31768/1986	31807/1986
55/2009	-	99,6 ^b	99,6	95,8	99,8	99,8	99,8	95,6	96,8	96,9
1435/2009	99,7	-	100,0	95,6	99,7	99,7	99,7	95,4	96,6	96,7
1433/2009	99,7	100	-	95,6	99,7	99,7	99,7	95,4	96,6	96,7
15/2010	99,1	98,9	98,9	-	95,8	95,8	95,8	99,4	98,1	98,1
19/2010	100	99,7	99,7	99,1	-	100	100	95,6	96,8	96,9
20/2010	100	99,7	99,7	99,1	100	-	100	95,6	96,8	96,9
188/2010	100	99,7	99,7	99,1	100	100	-	95,6	96,8	96,9
0122/2011	98,9	98,9	98,9	99,7	98,9	98,9	98,9%	-	97,7	97,7
31768/1986	99,1	98,9	98,9	99,5	99,1	99,1	99,1%	99,3	-	99,6
31807/1986	98,9	98,7	98,7	99,3	98,9	98,9	98,9%	99,1	99,7	-

^a: Brazilian strains analyzed in this study. Strain name followed by year of isolation; ^b: percentage of nucleotide identity as determined by BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>); ^c: percentage of amino acid identity (bold).

the endemicity of a particular serotype in a specific geographic region for a long period, different viral clades may be involved in that period [14]. It is known that the introduction of new DENV serotypes/genotypes/lineages is a major risk factor for dengue epidemics. In 2009/2010, 1,471,390 dengue fever (DF) suspected cases and 665 deaths were reported in Brazil, with DENV-1 causing epidemics in most states [4,15]

It is not clear whether the explosive epidemic reported in Brazil during 2009 and 2010 caused mainly by DENV-1 was due to this lineage replacement. The population susceptibility to this serotype which has not circulated for almost a decade and the occurrence of secondary infections in a hyperendemic country may also have played an important role in the disease epidemiology. In this scenario, the monitoring of DENV is of great relevance to observe the spread of potentially virulent strains as well to evaluate its impact over the population during an outbreak.

Due to the Brazil's geography and dengue epidemiology, along with the fact the country has important tourist regions, a larger sampling analysis is suggested to better characterize those replacement events and lineage introductions in the country.

Funding

This work was supported by CNPq [303546/2008-5], CAPES, FAPERJ [E/26-102.936/2008] and FIOCRUZ.

Acknowledgements

We are grateful to José Farias Filho and Leda Maria dos Santos for technical support.

Author details

¹Laboratório de Flavivirus, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

²Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil.

Authors' contributions

FBS, RMRN and AMBF designed the study, FBN, NRCF, SAS, JBSS and CS performed the experiments, NCF and PCGN analyzed the data. FBS and FBN wrote the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 June 2011 Accepted: 3 August 2011

Published: 3 August 2011

References

- Pediatric Dengue Vaccine Initiative (PDM): **Global burden of dengue**. [<http://www.denguevaccines.org/disease-burden/>], Accessed 7 April 2011.
- Kyle JL, Harris E: **Global Spread and Persistence of Dengue**. *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**:71-92.
- Nogueira RM, de Araujo JM, Schatzmayr HG: **Dengue viruses in Brazil, 1986-2006**. *Rev Panam Salud Publica* 2007, **22**:358-363.
- SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde): **Informe Epidemiológico da Dengue. Semanas de 1 a 52 de 2009** 2009 [http://portalsaude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf], Accessed 7 April 2011.
- Myat Thu H, Lowry K, Jlang L, Hlaing T, Holmes EC, Aaskov J: **ineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection**. *Virology* 2005, **336**:163-172.
- Kukreti H, Dash PK, Parida M, Chaudhary A, Saxena P, Rautela RS, Mittal V, Chhabra M, Bhattacharya D, Lal S, Rao PV, Rai A: **Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007**. *Viol J* 2009, **6**:1.
- Mendez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sanchez JA, Tenorio A, Gallego-Gomez JC: **Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia**. *Viol J* 2010, **7**:226.
- Igarashi A: **Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses**. *J Gen Virol* 1978, **40**:531-544.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A: **Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses**. *Am J Trop Med Hyg* 1984, **33**:158-165.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV: **Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction**. *J Clin Microbiol* 1992, **30**:545-51.
- Carrillo-Valenzo E, Danis-Lozano R, Velasco-Hernandez JX, Sanchez-Burgos G, Alpuche C, Lopez I, Rosales C, Baronti C, de Lamballerie X, Holmes EC, Ramos-Castaneda J: **Evolution of dengue virus in Mexico is characterized by frequent lineage replacement**. *Arch Virol* 2010, **155**:1401-1412.
- Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO: **Selection-driven evolution of emergent dengue virus**. *Mol Biol Evol* 2003, **20**:1650-1658.
- Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC: **Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence**. *J Virol* 2005, **79**:15123-30.
- Raghwan J, Rambaut A, Holmes EC, Hang VT, Hien TT, Farrar J, Wills B, Birren BW, Simmons CP: **Endemic dengue associated with the co-circulation of multiple viral lineages and localized density-dependent transmission**. *PLoS Pathog* 2011, **7**(6):e1002064.
- SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde): **Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências 2010** [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf], Accessed 7 April 2011.

doi:10.1186/1743-422X-8-387

Cite this article as: dos Santos et al: **First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil**. *Virology Journal* 2011 **8**:387.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance

Márcia Gonçalves de Castro¹, Rita Maria Ribeiro Nogueira², Ana Maria Bispo de Filippis², Anielly Alves Ferreira¹, Monique da Rocha Queiroz Lima², Nieli Rodrigues da Costa Faria², Fernanda de Bruycker Nogueira², Jaqueline Bastos Santos Simões², Priscila Conrado Guerra Nunes², Simone Alves Sampaio², Ricardo Lourenço-de-Oliveira¹, Flávia Barreto dos Santos^{2/+}

¹Laboratório de Transmissores de Hematozoários ²Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

In Niterói, state of Rio de Janeiro, dengue virus type 4 (DENV-4) was isolated for the first time in March 2011. We analysed the laboratory findings of the first cases and evaluated the use of molecular techniques for the detection of DENV-4 in Aedes aegypti that were field-caught. Conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR confirmed DENV-4 infection in all cases. Additionally, DENV-4 was confirmed in a female Ae. aegypti with 1.08 x 10³ copies/mL of virus, as determined by quantitative real-time RT-PCR. This is the first time the Simplexa™ Dengue real-time assay has been used for the classification of cases of infection and for entomological investigations. The use of these molecular techniques was shown to be important for the surveillance of dengue in humans and vectors.

Key words: dengue virus type 4 - *Aedes aegypti* - RT-PCR - real-time RT-PCR - Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR

Dengue is widespread in the tropical and sub-tropical areas of Asia, Africa and the Americas and the transmission of the virus is primarily associated with *Aedes aegypti*. In Brazil, a dengue outbreak that was caused by dengue virus (DENV) type 1 and DENV-4 was reported in 1981-1982 in a city in the Amazon Region (Osanaí et al. 1983). However, it was only after DENV-1 was introduced in Rio de Janeiro (RJ) in 1986 (Schatzmayer et al. 1986) that the disease became a nationwide public health problem. Additionally, a virological and entomological program was established to monitor DENV in human sera and vectors in 1986 (Nogueira et al. 1988, 1999, Lourenço-de-Oliveira et al. 2002). RJ has assumed an important role in the epidemiology of dengue, with the first case of DENV-2 identified in 1990 (Nogueira et al. 1993) and the first case of DENV-3 identified in 2000 (Nogueira et al. 2001).

DENV-4 was reintroduced into Brazil in 2010 in the municipalities of Boa Vista and Canta, state of Roraima (RR) (Temporão et al. 2011). The virus then spread to the different regions of Brazil. Cases of infection have been identified in northern, northeastern and southeastern Brazil (MS/SVS 2011). Sequencing of the viral isolate genomes revealed that the DENV-4 Brazilian strains belonged to genotype II (de Sousa et al. 2011). In RJ, the first DENV-4 cases that were detected occurred in the Cafubá neighbourhood. Cafubá is located in the oceanic region of the municipality of Niterói which is located in the metropolitan region of RJ, Brazil (Nogueira & Eppinghaus 2011).

The entomological surveillance of DENV in adult and immature mosquito stages is an important tool for the early prediction of dengue epidemics. Additionally, the virological surveillance of field-caught dengue vectors using molecular techniques, such as conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), has been useful for the rapid detection of dengue outbreaks in endemic regions and/or for the detection of the introduction of novel DENV variants (Chow et al. 1998, Pinheiro et al. 2005, Mendez et al. 2006, Chen et al. 2010, Guedes et al. 2010).

In this study, we aimed to characterise the first DENV-4 cases and demonstrate the role of rapid molecular techniques, such as conventional RT-PCR and real-time RT-PCR, in the entomological surveillance of the newly introduced DENV-4 variant in vector populations from Niterói after it was isolated from humans. Furthermore, we evaluated a real-time PCR commercial kit that has recently become available for the detection and typing of DENV in serum samples and mosquito macerates.

Human serum samples were obtained during a surveillance program of the Laboratory of Flavivirus, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), RJ. This program was an on-going project that was approved by the Fiocruz Ethical Committee in Research (CEP 274/05, resolution CSN196/96), Ministry of Health.

The investigation of DENV-4 cases was performed during the RJ DENV-1 epidemic in 2011. The first two confirmed cases were two sisters who lived in the Cafubá neighbourhood of Niterói. Both experienced an onset of symptoms on March 6 2011 (Nogueira & Eppinghaus 2011). We investigated nine other suspected cases of individuals who experienced an onset of symptoms from March 23 2011-April 11 2011 and who lived in Cafubá, São Francisco, São Domingos and Engenho do Mato (Fig. 1A).

Financial support: CNPq, CAPES, FIOCRUZ, FIOCRUZ/PAPES V, FAPERJ

+ Corresponding author: flaviab@ioc.fiocruz.br

Received 27 January 2012

Accepted 15 May 2012

online | memorias.ioc.fiocruz.br

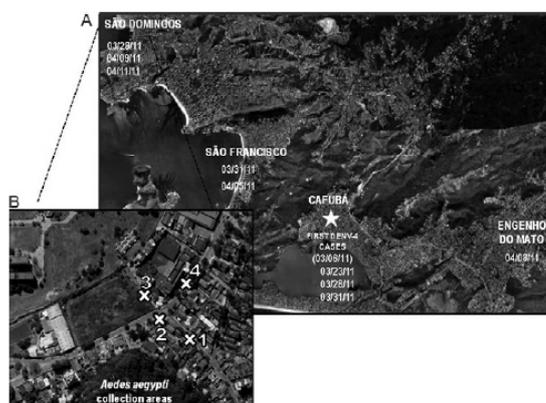


Fig. 1: dengue virus type 4 (DENV-4) introduction in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil, 2011. A: Niterói neighbourhoods with DENV-4 confirmed cases. Dates shown are DENV-4 confirmed cases in the different neighbourhoods; B: entomological surveillance in the São Domingos neighbourhood. White crosses represent the four collection sites within an area with confirmed DENV-4.

Ae. aegypti adult mosquitoes were collected at nine residential and non-residential sites (São Domingos) where DENV-4 human cases had been confirmed. The collection of the mosquitoes was performed at four sites (Fig. 1B) on May 4 2011, using battery-operated aspirators. Mosquitoes were anaesthetised at 4°C, identified, sexed and stored in liquid nitrogen on the same day of collection. Seventy-two *Ae. aegypti* (33 females and 39 males) adult mosquitoes were collected. Of these mosquitoes, 47 (18 females and 29 males) were collected from a single site in a village-like residential area (site #1) that was comprised of six houses. *Ae. aegypti* were individually macerated in 1 mL of Leibovitz L-15 medium (Sigma) with antibiotics (penicillin-streptomycin, 10,000 units; Invitrogen) and centrifuged (6,000 rpm at 4°C for 30 min). The supernatant was then transferred to an Eppendorf tube that contained 100 mL of streptomycin/fungizone and penicillin. The tube was kept in an ice bath for 1 h and centrifuged (3,000 rpm at 4°C for 15 min). The supernatant was then transferred to an Eppendorf tube that contained 0.3 mL of foetal calf serum (Invitrogen) and frozen (-70°C).

Virus isolation was performed by inoculating the C6/36 *Aedes albopictus* cell line (Igarashi 1978) and the viral isolates were identified by an indirect fluorescent antibody test using serotype-specific monoclonal antibodies (Gubler et al. 1984). Infected supernatant was clarified by centrifugation and the virus stocks were stored in 1-mL aliquots at -70°C until use.

Viral RNA was directly extracted from mosquito macerates using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNA was stored at -70°C for DENV detection and genotyping.

RT-PCR for the detection and genotyping of DENV was performed as described previously (Lanciotti et al. 1992). DNA products of a size unique to DENV-4 (392 bp) were amplified and then analysed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

For the quantification of the virus, the RNA that was isolated from the individually macerated *Ae. aegypti* mosquitoes was subjected to a quantitative real-time RT-PCR according to the protocol described by Drosten et al. (2002).

Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR - For the qualitative detection and typing of the viral isolates, the RNA from individually macerated *Ae. aegypti* mosquitoes was subjected to the Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR assay (Focus Diagnostics, Cypress, CA) according to the manufacturer's protocol. The assay uses the 3M Integrated Cycler instrument for the in vitro detection and genotyping of DENV-1 through DENV-4. The assay is based on a real-time RT-PCR that detects DENV-1 and DENV-4 in one reaction and detects DENV-2 and DENV-3 in a separate reaction. The assay uses bi-functional fluorescent primer-probes and reverse primers for the following specific regions of DENV: DENV-1 (NS5 gene), DENV-2 (NS3 gene), DENV-3 (NS5 gene) and DENV-4 (capsid gene). An internal RNA control is used to monitor the efficiency of the extraction process and to detect RT-PCR inhibition. In real-time RT-PCR, a positive reaction is detected by the accumulation of a fluorescent signal. The cycle threshold (Ct) is defined as the number of cycles that are required for the fluorescent signal to cross a particular threshold exceeding the background level. Ct values are inversely proportional to the amount of target nucleic acid present in the sample. Therefore, the lower Ct value, the greater the amount of target nucleic acid that is present in the sample. The Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR assay stipulates 40 cycles of amplification. The Simplexa™ Dengue kits from Focus Diagnostics were kindly provided for the evaluation. The evaluation was performed for research purposes only and the authors have no competing financial interests.

Anti-dengue IgM antibodies in human serum were measured using the commercially available Panbio Dengue IgM capture ELISA. The results were classified as positive, negative or equivocal according to the manufacturer's instructions.

For the NS1 antigen capture, two commercial kits were used for the analysis of human serum and macerates. The Platelia™ Dengue NS1 Ag ELISA (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) is a one-step, sandwich format microplate enzyme immunoassay that is used to detect the DENV NS1 antigen in human serum or plasma. The Dengue NS1 Ag STRIP (Biorad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France) is an immunochromatographic test for the rapid detection of the NS1 antigen. This assay was performed according to the manufacturer's protocol.

During March and April 2011, a total of 11 DENV-4 cases were confirmed using the following routine laboratory diagnostic techniques: MAC-ELISA, NS1 capture ELISA and rapid test, virus isolation and conventional RT-PCR. Two of the first cases were previously analysed, both consisting of individuals who experienced an onset of symptoms on March 6 2011 (Nogueira & Eppinghaus 2011). Three of the other cases occurred in the same neighbourhood as the first cases (Cafubá), three cases occurred in São Domingos, two in São Francisco

Apêndice 11.2

942 *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107(7), November 2012*

and one occurred in Engenho do Mato (Fig. 1A). The age of the patients ranged from 14-46 years (mean \pm 24.7 years). Six patients were male and three were female. All patients had acute infections (up to 4 days of infection) and two of the nine patients (22.2%) were positive by MAC-ELISA. The isolation of virus was possible in five out of nine patients (55.5%) and all patients were positive by conventional RT-PCR. Four patients (44.4%) were positive when analysed by both the NS1 capture ELISA and the NS1 Ag Strip test. We further analysed all cases using the Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR assay and all of the cases (9/9) were confirmed as DENV-4 using this method (Table). Ct values that were obtained from the DENV-4 human samples ranged from 16.8-35.1 (mean \pm 25.0) (Fig. 2).

Because of the establishment of a sentinel network for DENV surveillance, which includes blood collections from febrile cases for virus detection, in 1986 in Niterói, it was possible to detect the introduction of DENV-2 and DENV-4 into the human population early, in 1990 and 2011, respectively (Nogueira et al. 1990, Nogueira & Eppinhaus 2011). Immediately after DENV-4 was isolated, an intensive study was conducted to monitor the distribution of the virus. Nine other DENV-4 cases from the neighbourhoods of Cafubá, São Francisco, São Domingos and Engenho do Mato were confirmed by laboratory analysis (Fig. 1A).

The development of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR techniques has significantly reduced the processing time required to permit the detection of both the virus in the early stages of the infection in humans and its transmission by viral vectors. The DENV-4 cases that were investigated in this study were initially detected by conventional RT-PCR, which is established as a routine diagnostic test for all suspected acute dengue cases. Conventional RT-PCR results are usually released 24-48 h after samples are received in the laboratory. Additionally, for novel serotypes, all DENV-4 cases were re-tested separately using genotyping primers to confirm the new genotype. Concomitantly, cases were subjected to MAC-ELISA, NS1 ELISA and virus isolation. Because the cases studied consisted of patients in the acute phase of disease, MAC-ELISA was able to con-

firm only two out of nine cases. Samples were obtained from both of these patients within four days after the onset of symptoms. Samples from all of the other cases were acquired within the first and second days after the onset of symptoms. The most common technique used to serologically diagnose dengue is still based on the detection of anti-DENV IgM using MAC-ELISA (Huang et al. 2001). However, one of the limitations of this method is that there are variations in the detection rate during the acute phase of disease.

A previous study showed that the NS1 capture ELISA has a higher detection rate during the first four days after the onset of symptoms compared with the MAC-ELISA (Lima et al. 2010). In this study, both of the NS1 tests confirmed four out of the nine cases up until the fourth day after the onset of symptoms. During the acute phase of disease, the NS1 protein exists as a secreted and membrane-associated protein. Both forms of the protein have been demonstrated to be immunogenic (Young et al. 2000). High levels of NS1 have been demonstrated to circulate during the acute phase of dengue infection and they are found in the serum of patients with both primary and secondary DENV infections until the ninth day after the onset of symptoms (Young et al. 2000).

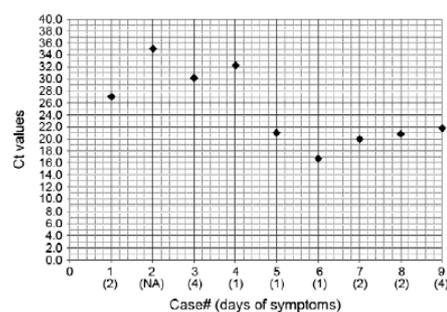


Fig. 2: Simplexa™ Dengue real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification on dengue type 4 cases (n = 9) from Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil according to the number of days after the onset of the symptoms. Cycle threshold (Ct) values are shown. NA: not available.

TABLE
Human dengue virus type 4 cases laboratorial investigation in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil

Dengue cases	Routine laboratorial diagnosis methodologies positive/tested				Newly available diagnosis methodology positive/tested	
	MAC-ELISA	Virus isolation	NS1 ELISA	NS1 Ag STRIP	Conventional RT-PCR	Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR
Males (n = 6)	2/6	4/6	3/6	2/6	6/6	6/6
Females (n = 3)	0/3	1/3	1/3	2/3	3/3	3/3
Total [n (%)]	2/9 (22.2)	5/9 (55.5)	4/9 (44.4)	4/9 (44.4)	9/9 (100)	9/9 (100)

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Despite the increased time required to produce a final result, virus isolation is still the “gold-standard” technique for the diagnosis of dengue infection. After the inoculation of C6/36 cells with the viral isolates, DENV-4 could be recovered and genotyped in five of the human cases. This technique is important because virus can be isolated from the supernatant and used for molecular epidemiologic studies by partial or complete viral genome sequencing. Sequencing and phylogenetic analysis have characterised Brazilian DENV-4 as belonging to genotype II (de Sousa et al. 2011).

All individual macerates were initially subjected to conventional RT-PCR, virus isolation and Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR. Of the 19 total adult mosquitoes (13 males and 6 females) that were collected, DENV-4 was identified by conventional RT-PCR in a single female *Ae. aegypti* mosquito (1/72; 1.4%) that was captured in one of the residences (15.2). Due to the nature of the genetic material of these mosquitoes, there were many non-specific bands that were visualised on the agarose gel (Fig. 3); therefore, all of the macerates were separately retested using conventional RT-PCR with all four typing primers (TS1, TS2, TS3 and TS4). The same *Ae. aegypti* female, designated 15.2.4/11, was also the only mosquito that was found to be positive for DENV-4 when all macerates were subjected to the Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR assay and the mosquito was identified as having a Ct value of 23.5 (Fig. 4). No viruses were recovered from any of the 72 macerates when viral isolation using C6/36 cells was attempted. Real-time RT-PCR detected 1.08×10^3 copies/mL of DENV-4 in the macerate from the single *Ae. aegypti* female that was naturally infected.

A single *Ae. aegypti* female collected at a residence in site #1 was identified to be positive for DENV-4 infection by molecular techniques. Additionally, we performed both a NS1 capture ELISA and a NS1 Ag Strip test on all of the 47 macerates that were available from the same

location. The same female mosquito (15.2.4/11) was positive by both of the NS1 tests. Interestingly, both tests also detected NS1 in a macerate from an *Ae. aegypti* male mosquito (15.2.3). The use of the NS1 antigen capture kit for the detection of DENV antigens from *Ae. aegypti* mosquitoes has recently been demonstrated (Tan et al. 2011). However, none of the other techniques that were available could confirm infection or verify the infecting serotype. The transovarial transmission of DENV, which occurs when the virus is transmitted to the progeny of an infected female, has been reported previously (Khin & Khin 1983, Joshi et al. 2002, Le Goff et al. 2011).

DENV detection rates from *Aedes* mosquitoes by RT-PCR may vary depending on the geographical location, epidemiological background or the vector population. In Taiwan, only 0.2% of *Ae. aegypti* females that were analysed were positive for DENV (Chen et al. 2010). However, it has been shown that 16.1% of the *Ae. aegypti* females that were collected from Mexican schools were infected with DENV (García-Rejón et al. 2011). In Brazil, previous studies showed that 17% of the *Ae. aegypti* mosquitoes were infected in a DENV-3 surveillance program that was initiated during an epidemic in the city of Manaus, located in the northern region of Brazil (Pinheiro et al. 2005). Conversely, only 0.1% of adult mosquitoes were found to be infected with DENV-3 in an entomological surveillance study performed in RJ during the inter-epidemic year of 2006 (unpublished observations). In Recife, located in northeastern Brazil, 10% of the tested pools were infected and, despite the

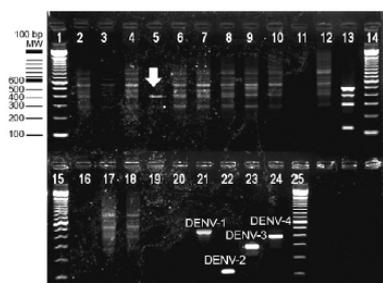


Fig. 3: conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction agarose gel electrophoresis analysis from *Aedes aegypti* adult mosquitoes, individually macerated from the entomological surveillance performed in nine residential and non-residential locations in the São Domingos neighbourhood, Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil in 2011. Lanes 1, 14, 15, 25: 100 bp molecular weight (Invitrogen); 2-12, 16-19: *Ae. aegypti* macerates; 5: dengue virus type 4 (DENV-4) positive *Ae. aegypti* individually macerated; 13: DENV-1-4 positive controls mix; 20: negative control (water); 21-24: DENV-1-4 positive controls, respectively.

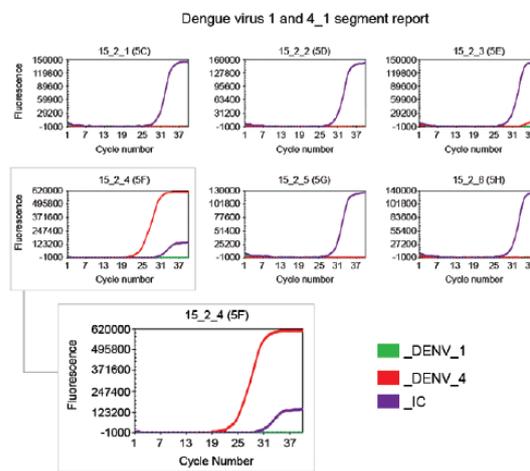


Fig. 4: Simplexa™ Dengue real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification on *Aedes aegypti* mosquitoes collected in the neighbourhood of São Domingos, Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil and individually macerated. Experiment report sheet after reaction. Samples 5C-E, G, H: negative *Ae. aegypti* macerates samples #15.4.1/11, #15.4.2/11, #15.4.3/11, #15.4.5/11 and #15.4.6/11, respectively; 5F: *Ae. aegypti* female #15.2.4/11 positive for dengue virus type 4 (DENV-4) at a cycle threshold of 23.5; red line: DENV-4 probe fluorophore CFR610; purple line: internal control (IC); green line: probe fluorophore Q670.

predominance of DENV-3 in human cases of dengue infection, both DENV-2 and DENV-1 were also detected in mosquitoes (Guedes et al. 2010).

During an entomological surveillance program performed in RJ by our group in 2001, DENV-1 was also detected in *Ae. aegypti* mosquitoes when the presence of DENV-3 was being investigated. Likewise, DENV-1 was also detected during a DENV-4 surveillance study in RR in 2010 (MG de Castro et al., unpublished observations). It has been suggested that a predominant serotype may persist for one or two years until it is replaced by a new serotype (Chow et al. 1998). In the present study, infection with DENV-4 in humans and mosquitoes was confirmed during an explosive DENV-1 epidemic in RJ, as well as in other Brazilian states. During this epidemic, approximately 87% of the confirmed dengue cases that were reported in 2011 were confirmed to be DENV-1 infections (MS/SVS 2011).

Real-time RT-PCR methods have been established as a more rapid and sensitive technique for the detection and quantification of DENV in clinical samples (Drosten et al. 2002, Lai et al. 2007). In this study, we used quantitative real-time RT-PCR to quantify the DENV-4 viral titre (1.08×10^3 copies/mL) from a single *Ae. aegypti* female mosquito that was naturally infected and individually macerated.

We also evaluated, for the first time, the effectiveness of the Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR kit for the detection and genotyping of DENV in both human cases and *Ae. aegypti* samples. All of the DENV-4 human cases that were analysed in this study were confirmed using a commercial real-time RT-PCR kit. The Ct values that were observed ranged from 16.8-35.1 (mean \pm 25.0). The Ct values in a real-time PCR assay are inversely proportional to the amount of target nucleic acid that is present in the sample. Because all of the samples were obtained during the acute phase of disease (2 samples within 4 days of the onset of symptoms, 3 samples within 2 days of the onset of symptoms, 3 samples within 1 day of the onset of symptoms and 1 sample in which the timing was unknown), high viraemia levels would be expected, resulting in lower Ct values (Fig. 2). From all of the *Ae. aegypti* macerates that were subjected to the Simplexa™ Dengue real-time RT-PCR analysis, only female 15.2.4/11 was positive for DENV-4 and was observed to have a low Ct value (23.5). This suggests that there was a high viral load in the single female (Fig. 3).

Despite the confirmation of DENV-4 cases in RJ, a major DENV-1 epidemic was established at the same time. In December 2011, a new DENV-4 case was identified in Niterói and confirmed by the laboratory methods that were available. This case was identified eight months after the first cases were confirmed. Therefore, our overall results with regard to the laboratory diagnosis and entomological surveillance of dengue using molecular techniques, such as conventional RT-PCR and real-time RT-PCR, show that these approaches are fast, reliable, sensitive and specific for dengue serotype surveillance. Furthermore, these techniques were found to still be effective when a new serotype is introduced or when a serotype re-emerges during a dengue epidemic of a different serotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Mauro Menezes Muniz, Roberto Costa Peres, Reginaldo Rego, Marcelo Celestino dos Santos, Renato Carvalho de Andrade, Wellington C Silva, Eliane Saraiva Machado de Araújo, Bianca de Santis and José da Costa Farias Filho, for technical assistance, and to Focus Diagnostics, represented by Medivax, Brazil, for providing the Simplexa Dengue kits for evaluation.

REFERENCES

- Chen CF, Shu PY, Teng HJ, Su CL, Wu JW, Wang JH, Lin TH, Huang JH, Wu H 2010. Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR green-based reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay during 2004-2007 in southern Taiwan. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 1017-1025.
- Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, Lam-Phua SG, Tan BT 1998. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg* 58: 578-586.
- de Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, Suzuki A, Silveira VR, Silva SJ, Azevedo RM, Tolentino FM, Assis JC, Bassi MG, Dambrós BP, Tumieto GL, Gregianini TS, Souza LT, Timenetsky M do C, Santos CL 2011. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1439.
- Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S 2002. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 40: 2323-2330.
- García-Rejón JE, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores LF, López-Urbe MP, Najera-Vazquez M del R, Nuñez-Ayala G, Beaty BJ, Eisen L 2011. Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Merida, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 84: 489-496.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A 1984. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158-165.
- Guedes DR, Cordeiro MT, Melo-Santos MA, Magalhaes T, Marques E, Regis L, Furtado AF, Ayres CF 2010. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis* 47: 67-75.
- Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, Yao CW, Shiao M 2001. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol* 65: 553-560.
- Igarashi A 1978. Isolation of a singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531-544.
- Joshi V, Mourya DT, Sharma RC 2002. Persistence of dengue-3 virus through transovarial passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 67: 158-161.
- Khin MM, Khin AT 1983. Transovarial transmission of dengue-2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg* 32: 590-594.
- Lai YL, Chung YK, Tan HC, Yap HF, Yap G, Ooi EE, Ng LC 2007. Cost-effective real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) to screen for dengue virus followed by rapid single-tube multiplex RT-PCR for serotyping of the virus. *J Clin Microbiol* 45: 935-941.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545-551.

Apêndice 11.2

- Le Goff G, Revollo J, Guerra M, Cruz M, Barja Simon Z, Roca Y, Vargas Florès J, Hervé JP 2011. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite* 18: 277-280.
- Lima M da R, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, dos Santos FB 2010. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e738.
- Lourenço-de-Oliveira R, Honório NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JCR, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RMR 2002. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 799-800.
- Mendez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, Parra B 2006. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 74: 678-683.
- Nogueira RMR, Eppinghaus ALF 2011. Dengue virus type 4 arrives in the State of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 255-256.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, de Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 925-926.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 253.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Souza RW, Zagne SM, Schatzmayr HG 1993. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 111: 163-170.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araújo ESM, de Filippis AMB, de Souza RV, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira Filho G 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 297-304.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias MFDB, Farias Filho JC 1988. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 219-225.
- Osanaí CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil P 1983. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 25: 53-54.
- Pinheiro VCS, Tadei WP, Barros PMSS, Vasconcelos PFC, Cruz ACR 2005. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 833-839.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245-246.
- MS/SVS - Ministério de Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde 2011. Balanço dengue - Semana Epidemiológica. Available from: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_072011.pdf.
- Tan CH, Wong PS, Li MZ, Vythilingam I, Ng LC 2011. Evaluation of the dengue NS1 Ag Strip® for detection of dengue virus antigen in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 789-792.
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva, Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17: 938-940.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 38: 1053-1057.



RESEARCH

Open Access

Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil

Márcia Gonçalves de Castro¹, Fernanda Bruycker de Nogueira², Rita Maria Ribeiro Nogueira², Ricardo Lourenço-de-Oliveira¹ and Flávia Barreto dos Santos^{2*}

Summary

Background: Dengue, a mosquito-borne viral infection caused by one of the four dengue virus (DENV) serotypes (DENV-1 to 4), replicate alternately on the mosquito vector and human host and are responsible for infections throughout tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, the disease has become a major public health problem and the introduction of DENV-3 in 2000 in Rio de Janeiro (RJ) was associated with severe dengue epidemics. The potential emergence of strains associated with severe disease highlights the need for the surveillance of DENV in human host and vectors.

Methods: Aiming to contribute for DENV phylogenetic and vector-virus-human host studies, we sequenced the entire genome of one DENV-3 isolated from naturally infected *Aedes aegypti* from RJ in 2001 and characterized the 3' UTR from strains isolated from mosquitoes and humans. Mosquitoes were pooled and submitted to virus isolation in *Ae. albopictus* C6/36 cells and the infecting serotype was identified by immunofluorescence using type-specific monoclonal antibody. Sequence analysis was performed using BioEdit software, the multiple alignments were performed using CLUSTAL W and the phylogenetic analysis by MEGA 5, using the Neighbor-joining method. Secondary structure prediction was performed by using the MFOLD program.

Results: Exclusive substitutions and a substitution leading to a stop codon on the NS5 gene were observed in the DENV-3 isolated from a naturally infected *Ae. aegypti* and fully sequenced. As an 8- nucleotides deletion was observed within the 11- nucleotides (nts) insertion on the variable region (VR) from the 3' UTR in this isolate, we further sequenced other DENV-3 from both mosquitoes and humans. The majority of DENV-3 from RJ analyzed were characterized by the 11-nts insertion in the VR of the 3' UTR, despite the observation of strains carrying the 8-nts deletion. The latter presented similar secondary structures, however not all strains presenting the 11-nts insertion were similar in the predicted secondary structure.

Conclusions: The phylogeny based on the analysis of the complete genome and 3'UTR characterized the DENV-3 isolated from both vector and human host as belonging to Genotype III (GIII), despite the differences observed on the 3' UTR. Further studies are needed to address the role of those mutations in the transmission of the different viral populations and vector competence.

Keywords: Dengue virus type 3, *Aedes aegypti*, 3'UTR

* Correspondence: flaviab@ioc.fiocruz.br

²Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil
Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Castro et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Dengue is a mosquito-borne viral infection caused by one of the four dengue virus serotypes (DENV-1 to 4), belonging to genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. The viruses replicate alternately on the mosquito vector, mainly (*Ae. aegypti*) and human host and are responsible for infections throughout tropical and subtropical regions of the world [1,2].

The rapid global spread of the four DENV serotypes in the last 50 years resulted in the dispersal of genotypes associated with increased disease severity [3]. In Brazil, dengue has been a major public health problem since DENV-1 introduction and spread in 1986 [4], however the introduction of the genotype III of DENV-3, in December 2000, in Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro (RJ), caused one of the most severe epidemics reported in the country in 2002 [5-7]. Despite the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in that area, DENV-3 was the only serotype detected in pools of *Ae. aegypti* during an entomological surveillance performed [8].

Sequencing of distinct DENV genomic regions has identified five genotypes for DENV-3: Genotypes I to III (GI to GIII) which are responsible for most DENV-3 human infections and have been associated with both dengue fever (DF) and dengue haemorrhagic fever (DHF) epidemics in Southeast Asia, Indian Subcontinent, South Pacific and East Africa and Americas, and Genotypes IV and V (GIV and GV) which were not associated with DHF epidemics and are only represented by few early sequences from Americas, South Pacific and Asia [9-13].

The DENV genome is composed by a positive single-stranded RNA of approximately 11 kb in length with an open reading frame encoding for the viral polyprotein, which is cleaved into three structural proteins (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4 and NS5) flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs) of about 100 and 400 nucleotides, respectively [1]. The flaviviruses UTRs are predicted to form secondary stem-loop (SL) structures, which are highly conserved and play a role in viral replication [14-18].

According to predicted secondary structures, the DENV 3'UTR can be divided into three domains [18]. The domain I, which is located immediately after the NS5 stop codon, is considered the most variable region (VR) within the viral 3'UTR, as it shows large heterogeneity in both length and nucleotide sequences [19-21]. Mutations and deletions within these regions may alter infectivity and reduce efficiency of viral replication [22,23] and differences between strains in these regions may correlate with DENV virulence and pathogenicity [24-27]. Furthermore, deletions and nucleotide variations were also described in the VR within the same serotype [28-30]. Domain II is of moderate conservation, comprising several hairpins motifs and where conserved sequence (CS2) and repeated CS2 (RCS2) are present. Domain III is the most conserved

region of the 3'UTR with CS1 followed by a terminal stem-loop (3'SL) [18].

Here, aiming to contribute for the studies on human host-virus-vector interactions, we fully sequenced the genome of one DENV-3 isolated from naturally infected field-caught mosquitoes in RJ and characterized the viral 3'UTR in comparison to other sequenced DENV-3 isolated from naturally infected mosquitoes and human hosts.

Material and Methods

Ethical Statement

All human DENV-3 strains belong to a previously gathered collection from the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ, RJ, Brazil obtained from acute phase human serum through the passive surveillance system from an ongoing Project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Ministry of Health, Brazil.

Ae. aegypti examined in this study were collected by the staff of the Dengue Control State Program for the determination of house infestation index, virological and entomological surveillance. No special permission or written consent is required for house entrance for mosquito collection and larval site treatment.

Viral strains

The DENV-3 strains isolated from *Ae. aegypti* adult mosquitoes ($n=4$) and human hosts ($n=10$) naturally infected in RJ were collected from epidemics occurred from 2001 to 2008. The first Brazilian DENV-3 strain (BR74886/02) isolated from a human fatal case fully sequenced [31] was used for comparison purposes and detailed information on the strains is provided on Table 1.

DENV-3 human cases

From 2001 to 2008, the Laboratory of Flavivirus, as a Regional Reference Laboratory for the Brazilian Ministry of Health, received a total of 16,185 dengue suspected cases for routine diagnosis. Virus isolation was attempted in 9,405 cases and DENV-3 was the infecting serotype in 52.8% of the positive isolates. The samples analyzed in this study were chosen randomly and representative of each year, during and after the 2002 epidemic in RJ.

DENV-3 entomological surveillances

The three DENV-3 strains isolated (BR73354/01, BR73356/01 and BR73636/01) in 2001 from naturally infected *Ae. aegypti* adult mosquitoes used in this study were collected during an entomological survey performed in 35 districts of Nova Iguaçu, RJ, from July 2000 to June 2001. The other DENV-3 strain (BR81200/06) was isolated from naturally infected *Ae. aegypti* adult mosquitoes collected during an entomological survey conducted on 7 districts with different infestation

Table 1 Brazilian DENV-3 isolated from naturally infected vectors and human cases analyzed in this study

Strain	Origin State*	Year of isolation	Source	GenBank accession number	Sequence analyzed	Reference
BR73354/01	RJ	2001	Mosquitoes	FJ177308	Complete genome	This study
BR73356/01	RJ	2001	Mosquitoes	JN383345	3'UTR	This study
BR73636/01	RJ	2001	Mosquitoes	JN383346	3'UTR	This study
BR81200/06	RJ	2006	Mosquitoes	JN383344	3'UTR	This study
BR70562/01	RJ	2002	Human serum	JN380902	3'UTR	This study
BR74792/02	RJ	2002	Human serum	JN380899	3'UTR	This study
BR74916/02	RJ	2002	Human serum	JN380901	3'UTR	This study
BR74947/02	RJ	2002	Human serum	JN380904	3'UTR	This study
BR77515/03	RJ	2003	Human serum	JN380900	3'UTR	This study
BR78969/04	RJ	2004	Human serum	JN380905	3'UTR	This study
BR80740/05	RJ	2005	Human serum	JN380906	3'UTR	This study
BR80996/06	RJ	2006	Human serum	JN380903	3'UTR	This study
BR83904/07	RJ	2007	Human serum	JN380898	3'UTR	This study
BR072/08	RJ	2008	Human serum	JN380907	3'UTR	This study
BR74886/02	RJ	2002	Human liver	AY679147	Complete genome	Miagostovich et al., 2006

*RJ: Rio de Janeiro.

index, randomly chosen in the municipality of Rio de Janeiro, RJ, from March 2005 to February 2006. Briefly, adult mosquitoes were collected twice a week, alternately in the morning and in the afternoon with manual and battery backpack aspirators and with nets, both indoor and in the yards and gardens, close to the dwellings. Mosquitoes were identified using a key as previously described [32], pooled according to gender, date, district of collection and stored in liquid nitrogen at the same day of collection. A total of 503 *Ae. aegypti* mosquitoes (352 females and 151 males) collected in 2000–2001 and 874 *Ae. aegypti* females collected in 2005–2006 were pooled (74 pools of 9–17 mosquitoes/pool in 2000–2001 and 27 pools of 2–10 mosquitoes/pool, in 2005–2006) and all pools were submitted for virus isolation. Only positive pools were submitted to RT-PCR, for DENV serotype confirmation.

Preparation of vectors

Mosquitoes' pools were macerated in 1 ml of Leibovitz L-15 medium (Sigma) plus antibiotics (penicillin-streptomycin, 10,000 units - Invitrogen) and centrifuged (6,000 rpm at 4°C for 30 min). Supernatant was transferred to an Eppendorf tube containing 100 mL of streptomycin / fungizone and penicillin, kept in an ice bath for 1 hour and centrifuged (3,000 rpm at 4°C for 15 min). Supernatant was transferred to an Eppendorf tube containing 0.3ml of fetal calf serum (Invitrogen) and frozen (-70°C).

Virus isolation

Virus isolation was performed by inoculation into monolayers of C6/36 *Aedes albopictus* cells [33] in Leibovitz L-15

medium (Sigma) supplemented with 2% fetal calf serum (Invitrogen) and 0.2 mM of nonessential amino acids (Invitrogen). Cells were incubated at 28°C for 5 to 7 days and observed for cytopathic effects. Isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies [34] and infected supernatant was clarified by centrifugation and virus stocks stored in 1-mL aliquots at -70°C.

RNA extraction

Viral RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and stored at -70°C for DENV typing and sequencing. For the viral 3'UTR sequencing, the RNA was extracted directly from serum and mosquitoes macerate, previously detected by RT-PCR. For the full genome sequencing of the DENV-3 strain BR73354/01, the RNA was extracted from the first passage in cell culture.

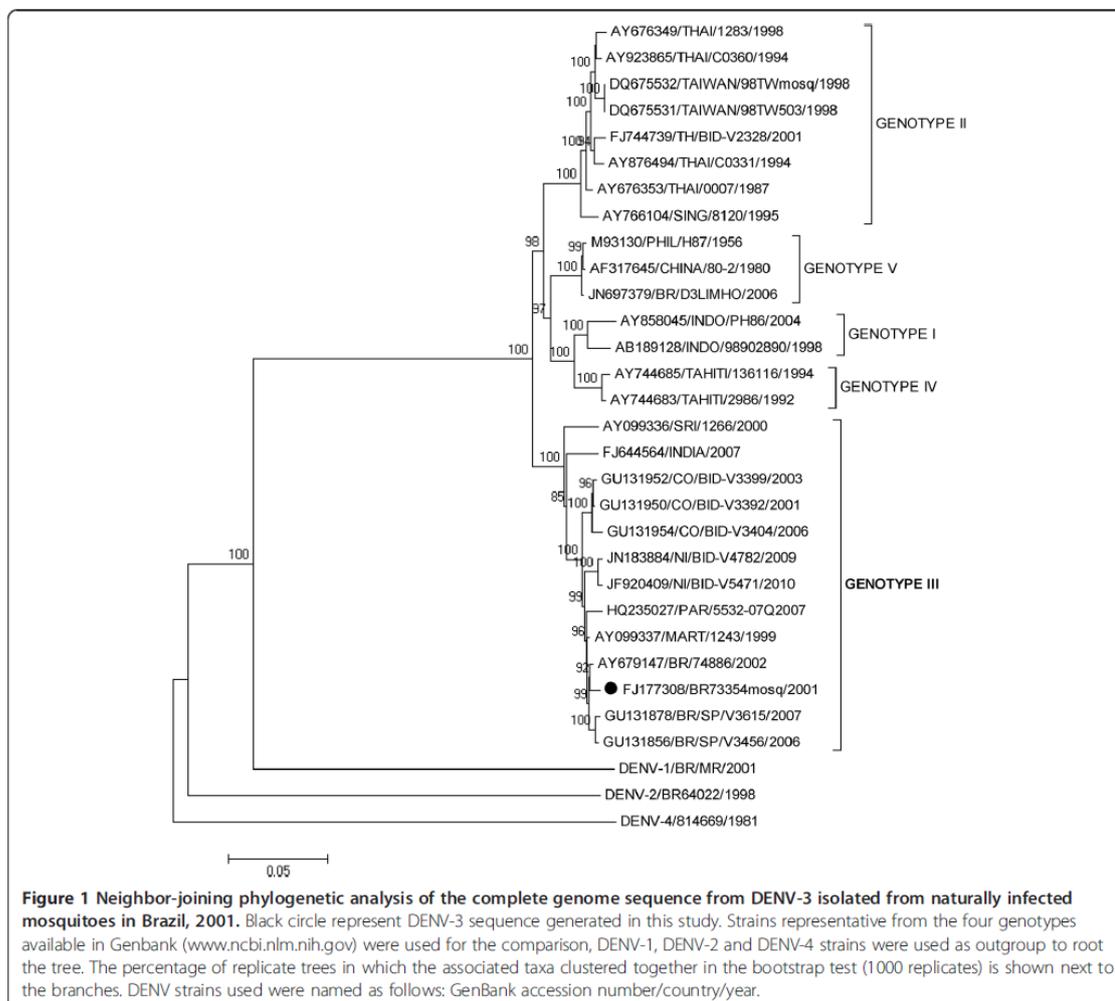
RT-PCR (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction)

RT-PCR for detecting and typing DENV was performed as described previously [35].

Sequencing and phylogenetic analysis

PCR products were sequenced in both directions using the BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit (Applied Biosystems). The mosquitoes' DENV-3 full-length genome sequence and 3'UTR sequences obtained in this study were deposited in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) and are described on Table 1. Sequence and similarity identity

Apêndice 11.3



analysis was performed using BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). The multiple alignments were performed using CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the phylogenetic analysis by MEGA 5 software (www.megasoftware.net), using the Neighbor-joining method, according to the Tamura-Nei model, with a bootstrap of 1,000 replications for the analysis of the complete genome. For the 3'UTR analysis, the Maximum likelihood method, according to the Kimura-2 model was chosen as determined by the best-fit substitution model provided by MEGA 5. Strains representative from the five genotypes available in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) were used for the comparison, DENV-1 (GenBank accession number #AF513110), DENV-2 (#AF489932) and DENV-4 (# AF326573) strains were used as outgroup to root the tree.

Secondary structure analysis

The predicted secondary structures were generated by MFOLD web server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) with default folding parameters and folding predictions at 37°C on the VR from the 3' UTR of DENV-3.

Results and discussion

The DENV-3 was re-introduced in Latin America in 1994, after an absence of 17 years, being initially isolated in Panama and spreading throughout Central America [36,37] to Caribbean [38-40] and South America [6,28,41-43]. However, some phylogenetic studies point to its introduction through Mexico [44] a few years earlier [13]. This introduction caused by the genotype III of DENV-3, originally from the Southeast Asia and

Apêndice 11.3

Table 2 Amino acid differences among selected Brazilian DENV-3 and strains representative of the DENV-3 genotypes, compared to the prototype H87

Genotypes	GV	GIII					GI	GII	GIV
Gene	Strain Position	PHIL/ H87/ 1956 human	BR/ 74886/ 2002 human	BR/73354/ 2001 mosquitoes	BR/SP/ V3456/ 2006 human	BR/SP/ V3615/ 2007 human	INDO/ PG86/ 2004 human	TAIWAN/ TWmosq/ 1998 mosquitoes	TAHITI/ 136116/ 1994 human
Capsid	C ₁₀₈	M	I	I	I	I			
	C ₁₁₂	T	A	A	A	A			
prMembrane	prM ₈₆	H	R	R	R	R			
Envelope	E ₈₁	I	V	V	V	V			
	E ₁₂₄	S	P	P	L	L	L	P	
	E ₁₃₂	H	Y	Y	Y	Y		Y	
	E ₁₆₉	A	T	T	T	T	V	V	V
	E ₂₇₀	T	N	N	N	N		N	
	E ₃₀₁	L	T	T	T	T	S		
	E ₃₈₀	I			T	T			
	E ₃₈₃	K		N	N	N			
	E ₄₅₂	I	V	V	V	V			
	NS1	NS1 ₈₄	I			V			
NS1 ₉₄		T	I		I	I	I	I	I
NS1 ₁₃₉		S	N		N	N	N	N	N
NS1 ₃₃₉		N	S	S	S	S			
NS2A	NS2A ₃₇	L	F	F	F	F			
	NS2A ₁₅₈	I	M	M	M	M			
	NS2A ₁₇₅	I	V	V	V	V		V	
	NS2A ₁₉₅	T	A	A	A	A			
NS2B	NS2B ₆₀	V	I	I	I	I			
	NS2B ₁₀₉	I	V	V	V	V			
NS3	NS3 ₁₁₅	I	T	T	T	T			
	NS3 ₄₅₂	V	A	A	A	A		A	
NS4A	NS4A ₉₉	D	E	E	E	A			
NS4B	NS4B ₂₁	V	I	I	I	I			
	NS4B ₁₃₈	V	I	I	I	I			
NS5	NS5 ₉₇	V		L					
	NS5 ₉₈	T		S					
	NS5 ₁₀₁	R		*STOP					
	NS5 ₁₀₅	K		T					
	NS5 ₁₁₂	E		A					
	NS5 ₁₁₄	V		R					
	NS5 ₁₁₇	S		P					
	NS5 ₁₂₇	M		R					
	NS5 ₁₃₁	D		E					
	NS5 ₁₃₃	F		D					
NS5 ₁₃₅	L		P						
NS5 ₂₂₉	S	A	A	A	A	A			

Apêndice 11.3

Table 2 Amino acid differences among selected Brazilian DENV-3 and strains representative of the DENV-3 genotypes, compared to the prototype H87 (Continued)

NS5 ₂₃₃	M		R					
NS5 ₂₈₈	S	N	N	N	N			
NS5 ₃₆₅	P	S	S	S	S			
NS5 ₃₇₁	K	R	R	R	R			
NS5 ₃₇₄	E	G	G	G	G			
NS5 ₃₈₉	R		K	K	K		K	
NS5 ₄₂₂	R	K	K	K	K			
NS5 ₄₂₉	E	D	D	D	D			
NS5 ₅₈₅	K	T	T	T	T			
NS5 ₆₃₉	L	P	P	P	P			
NS5 ₇₆₃	T	S	S	S	S	A	S	A
NS5 ₈₃₅	DN	N	N	N				

Blank cells indicate amino acid similarities to the prototype strain H87 (GenBank accession number M93130). *STOP: stop codon.

characterized by an increased virulence, coincided with the occurrence of a higher number of severe and DHF cases [37,45-47].

In Brazil, the first DENV-3 was isolated in December of 2000 in Nova Iguaçu, RJ [5] when the *Ae. aegypti* infestation level was 8.1% and, 58% of those mosquitoes were resistant to temephos at that time [8,48]. Due to the role of the city of Nova Iguaçu in dengue epidemiology, after the DENV-1 introduction in 1986 [4], field studies were conducted for detection of DENV in field-caught vectors [8,49]. The potential emergence of strains associated with severe disease highlights the need for the surveillance of DENV in human host and vectors, as the detection of DENV in infected field-caught vectors is considered a useful tool for the early prediction of epidemics and detection of new serotypes/genotypes introductions [50,51].

The entomological surveillance performed in the first semester of 2001 in Nova Iguaçu, RJ, resulted in the isolation of three DENV-3 strains from the districts of Santa Efigênia (BR73354/01), California (BR73356/01) and Morro Agudo (BR73636/01) isolated from three pools (9 mosquitoes/pool) of naturally infected *Ae. aegypti* females [8]. In January 2006, one DENV-3 strain (BR81200/06) was isolated from one *Ae. aegypti* pool composed of three females, collected indoors in the Vargem Pequena neighborhood, west region of RJ.

In order to access the differences among Brazilian DENV-3, we sequenced and deposited on Genbank (FJ177308) the entire genome sequence of one virus isolated from naturally infected *Ae. aegypti* (BR73354/01) and compared to the Brazilian strain 74886/02 (AY679147), isolated from the liver of a fatal case during the DENV-3 epidemic occurred in 2002 [31]. The nucleotide similarity was 99.3% and the phylogeny based on the analysis of the complete coding region characterized the Brazilian strain as belonging to genotype III (Indian Subcontinent), Figure 1.

Amino acid substitutions were observed throughout the entire coding region, when the Brazilian DENV-3 strains were compared to the prototype PHIL/H87/1956 and strains representative of the other genotypes. Some substitutions were exclusive to the Brazilian DENV-3 strains analyzed (Table 2) and some were shared among the Brazilian strains and the strain isolated from *Ae. aegypti* in Taiwan in 1998 (TAIWAN/TWmosq/1998), Table 2. Exclusive substitutions to the DENV-3 Brazilian strains analyzed in this study were observed on the capsid, prM and envelope genes. Besides those others observed were also shared by other genotype III strains previously analyzed [11].

On the NS1 gene only one residue substitution was observed, and substitution on NS2A and NS2B were also reported. On the NS3 gene, a substitution on only NS3₁₁₅ was exclusive to the Brazilian DENV-3. On NS4B, the same substitution was observed on positions NS4B₂₁ and NS4B₁₃₈. However, on the NS5 gene, besides the ten substitutions exclusive to the Brazilian DENV-3, substitutions exclusive to the Brazilian DENV-3 isolated from *Ae. aegypti* (BR73354/2001) were observed almost consecutively, on NS5₉₇ and NS5₉₈. On NS5₁₀₁, the substitution resulted in a stop codon and other substitutions throughout NS5 were also observed. Despite this, the original macerate was re-inoculated in C6/36 cells culture and the DENV -3 infection confirmed by the presence of cytopathic effect and a positive RT-PCR. The presence of genome-defective DENV-3 containing either stop codons or deletions *in vivo* has been reported previously [52].

Despite the use of the E gene for DENV phylogenetic and evolutionary studies [9,12,28,53-62] due to its biological properties and selective pressure imposed by the host immune response, the role of sequences heterogeneity in other genomic regions which includes the non-structural genes and the genome UTRs cannot be excluded [53].

Apêndice 11.3

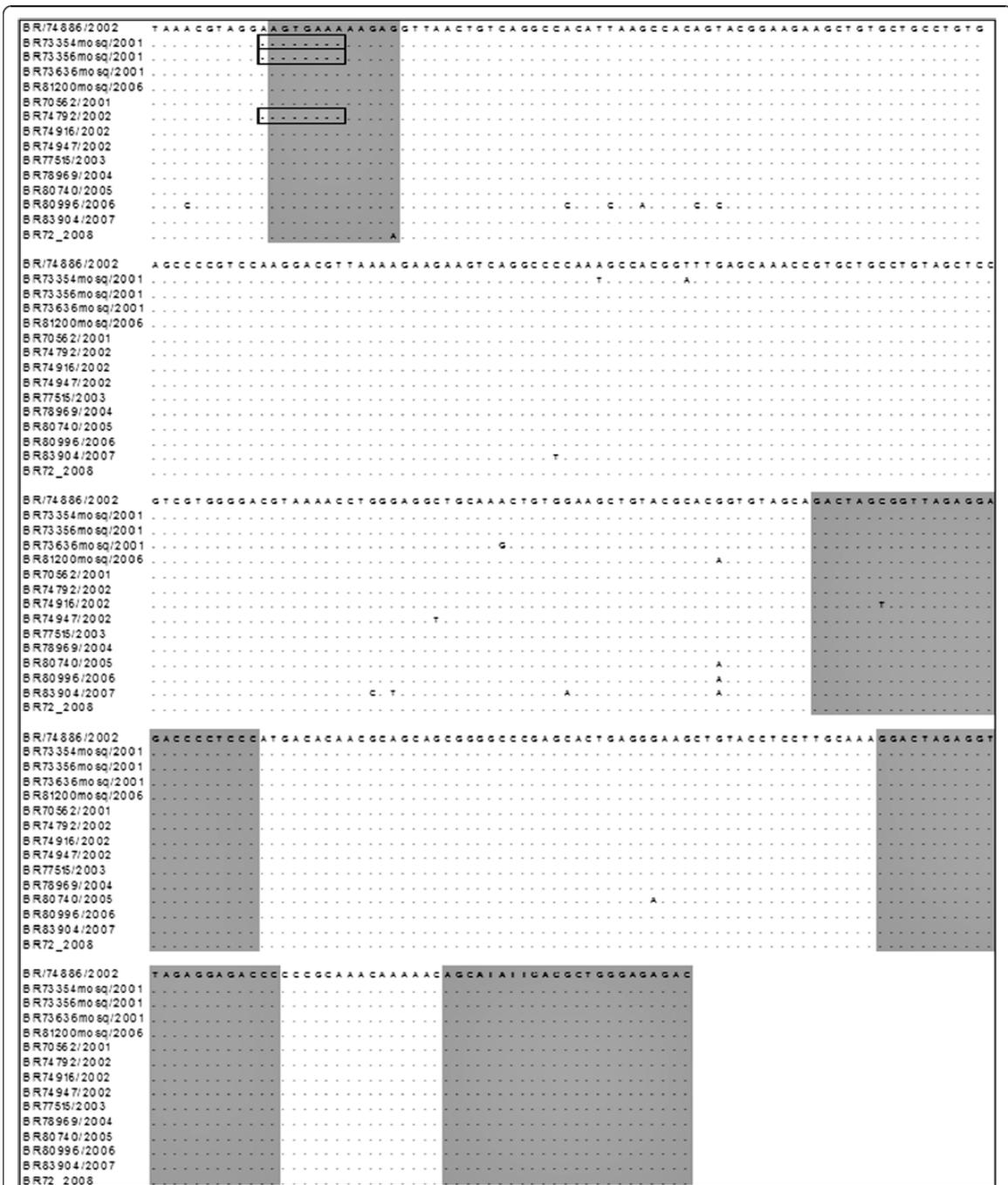
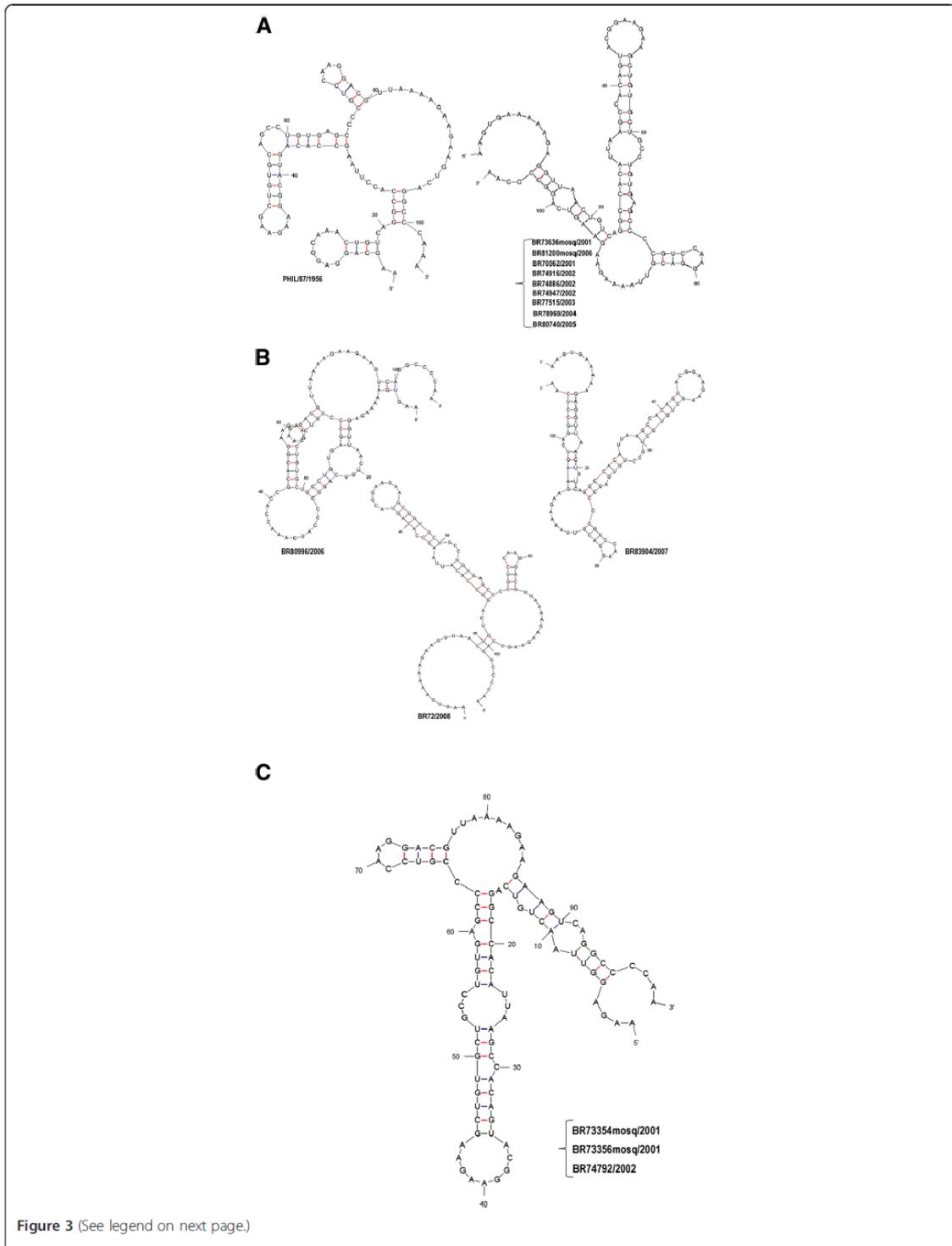


Figure 2 Multiple nucleotide sequence alignment of the Brazilian DENV-3 3'UTR from additional strains isolated from mosquitoes *Ae. aegypti* ($n=4$) and humans ($n=10$) from 2001 to 2008. Dots (.) indicate identity among strains based on the Brazilian strain BR74886/02, characterized by the 11 nucleotides insertion on the variable region (VR). Dashes (-) indicate gaps in the alignment. The 8 nucleotides deletion characteristic to strains isolated from mosquitoes BR73354mosq/2001, BR73356mosq/2001 and from a strain isolated in human (BR74792/2002) are marked by black squares. Eleven nucleotide insertion and conserved sequence regions (RCS2, CS2 and CS1) are gray-shaded.

Apêndice 11.3



(See figure on previous page.)

Figure 3 On (A) the predicted secondary structure of the variable region (VR) from Brazilian DENV-3 strains isolated from humans and mosquitoes *Ae. Aegypti* (nucleotides 1 to 108) presenting the 11-nucleotides insertion and compared to the prototype PHIL/87/1956 (nucleotides 1–104). On (B) the predicted secondary structures from the Brazilian strains (nucleotides 1 to 108) presenting the 11-nucleotides insertion, but with nucleotides substitutions differing from the strains on (A) and on (C) the structures from the sequences (nucleotides 1 to 100) with the 8-nucleotides deletion.

Previous studies have suggested that the sequence and secondary structures of the 5' and 3'UTR of flaviviruses play an important role in viral replication and differences in these regions may influence viral virulence [24,26,27,63]. Mutations and deletions within these regions may alter infectivity and reduce efficiency of viral replication [22,23]. Furthermore, the domain I from the DENV 3'UTR is considered the most variable region (VR) from the 3'UTR [18] and can serve as a good marker for DENV evolution [19–21].

The analysis of the 3'UTR of the strain BR73354/01 genome showed an 8-nucleotides deletion within the 11-nucleotides insertion on the VR, previously observed for the Brazilian DENV-3 strain isolated from humans [31] and common to genotype III DENV-3 strains from the Latin America/Caribbean and Sri Lanka regions [27,64]. Nucleotides substitutions exclusive to the BR73354/01 were observed on positions 10,383 and 10,391 from the 3'UTR. One substitution on the RCS2 and one on the CS2 were shared by all Brazilian DENV-3 when compared to the prototype.

We additionally analyzed and deposited on GenBank the 3'UTR sequences from other three DENV-3 strains isolated from naturally infected *Ae. aegypti* isolated in 2001 and 2006 in RJ (BR73356/01, BR73636/01 and BR81200/06) and from ten DENV-3 isolated from humans from 2001 to 2008. The strain BR73356/01 presented the same 8-nucleotides deletion observed for the strain BR73354/01. However, the other two strains also isolated from mosquitoes in RJ (BR73636/01 and BR81200/06) presented the 11-nucleotides insertion common to the human strains. The analysis of the 3'UTR from DENV-3 isolates from humans showed that nine out of ten strains also presented the 11-nucleotides previously described. However, one of the strains isolated in Rio de Janeiro in 2002 (BR74792/02) showed the same 8-nucleotides deletion observed on the mosquito strains (Figure 2). Previous studies have shown deletions and nucleotide variations in the VR within a same serotype [28,29]. Despite those observations, it was also shown a high conservation on the 3'UTR RCS2, CS1 and CS2 conserved regions (Figure 2, gray-shadowed areas) among all the Brazilian strains analyzed. This was quite expected as domain II is of moderate conservation and domain III, the most conserved region of all [18]. Therefore, we focused on the VR of the 3'UTR, aiming to better characterize those mutations by predicting the secondary structures of that region. Not all strains presenting the 11-

nucleotides insertion were similar in structure (Figure 3A and 3B). In fact, despite the 11-nucleotides insertion, the strain BR72/2008 presented a unique secondary structure (Figure 3B). The only difference from the latter is a nucleotide substitution (G → A) on the 11-nucleotides insertion region, when compared to all other Brazilian sequences analyzed (Figure 2). The strain BR80996/2006, also showed a unique secondary structure due to the nucleotides substitution presented in the VR, despite the presence of the insertion shared with the other strains. The slight difference presented by the strain BR83904/2007, was due to a substitution (C → T) exclusive to this sequence. Furthermore, all three sequences with the 8-nucleotides deletion (BR73354 mosq/2001, BR73356 mosq/2001 and BR74792/2002) presented the same secondary structure (Figure 3C).

Phylogenetic studies based on the 5' and 3'UTR have shown to be very useful for molecular epidemiological studies [19,21,27,28,65]. The Maximum-Likelihood phylogenetic tree of Brazilian DENV-3 strains isolates from naturally infected *Ae. aegypti* mosquitoes and humans based on the 3'UTR sequence analysis places those strains as belonging to genotype III, corroborating the findings of the full-length genome analysis (data not shown).

Conclusions

Here, we analyzed the coding region and the 3'UTR of DENV-3 from both human host and mosquitoes and described insertions, deletions and a substitution leading to stop codon formation. The majority of DENV-3 in this study was characterized by the 11-nucleotide insertion in the 3'UTR, despite the observation of strains carrying the 8-nucleotide deletion. In spite the presence of distinct viral variants, it is suggested that the major variant is transmitted. However, how those distinct viral populations are maintained or transmitted is not fully understood, therefore the availability of viruses isolated from both hosts are crucial for the better comprehension of the vector-virus-human host interactions and for quasispecies investigations. Furthermore, the analysis of those distinct viral populations in experimentally infected mosquitoes may help to elucidate those observations.

Competing interest

The authors have no conflict of interest.

Authors' contributions

FBS, RMRN and RLO designed the study. MGC, FNB performed the experiments, MGC, FBS and RLO wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Financial support

CNPq, CAPES, FIOCRUZ, FIOCRUZ/PAPES V and FAPERJ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgements

We thank to the field staff of the Sanitary District of Nova Iguaçu/Vector Control Program for its help on the vectors collection. To Mauro Menezes, Wellington Silva, Anieli Ferreira, José da Costa Farias Filho, Jaqueline Simoes and Clarice R Santos for technical assistance.

Author details

¹Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil. ²Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brasil.

Received: 15 February 2012 Accepted: 27 December 2012
 Published: 2 January 2013

References

- Lindenbach B, Rice C, PH KDH: **Flaviviridae: The viruses and their replication.** In *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:991–1041.
- Whitehead S, Blaney J, Durbin A, Murphy B: **Prospects for a dengue virus vaccine.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:518–528.
- Kyle J, Harris E: **Global spread and persistence of dengue.** *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**:71–92.
- Schatzmayr HG, Nogueira RM, da Rosa AP T: **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro—1986.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986, **81**:245–246.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG: **Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro.** *Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96**:925–926.
- Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, de Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, *et al.*: **Dengue virus type 3, Brazil, 2002.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1376–1381.
- Miagostovich MP, dos Santos FB, de Simone TS, Costa EV, Filippis AM, Schatzmayr HG, Nogueira RM: **Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001.** *Braz J Med Biol Res* 2002, **35**:869–872.
- Lourenco-de-Oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, Silva WC, Leite PJ, Nogueira RM: **Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002, **97**:799–800.
- Landotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW: **Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses.** *J Gen Virol* 1994, **75**(Pt 1):65–75.
- Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG: **Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period.** *Virology* 2002, **301**:148–156.
- King C, Chao D, Chien L, Chang G, Lin T, Wu Y, Huang J: **Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3.** *Virology* 2008, **376**:563.
- Araújo JM, Bello G, Schatzmayr HG, Santos FB, Nogueira RM: **Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**:526–529.
- Araújo J, Nogueira R, Schatzmayr H, Zanotto P, Bello G: **Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3.** *Infect Genet Evol* 2009, **9**:716–725.
- Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH: **The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure.** *Virology* 1986, **153**:113–121.
- Proutski V, Gould EA, Holmes EC: **Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:1194–1202.
- Markoff L: **5' and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA.** *Adv Virus Res* 2003, **59**:177–228.
- Alvarez D, De Lella Ezcurra A, Fucito S, Gamamik A: **Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication.** *Virology* 2005, **339**:200–212.
- Iglesias NG, Gamamik AV: **Dynamic RNA structures in the dengue virus genome.** *RNA Biol* 2011, **8**:249–257.
- Shurtleff AC, Beasley DW, Chen JJ, Ni H, Suderman MT, Wang H, Xu R, Wang E, Weaver SC, Watts DM, *et al.*: **Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses.** *Virology* 2001, **281**:75–87.
- Klungthong C, Putnak R, Mammen M, Li T, Zhang C: **Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes.** *J Virol Methods* 2008, **154**:175–181.
- Pankhong P, Weiner D, Ramanathan M, Nisalak A, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Attatippaholkun W: **Molecular Genetic Relationship of the 3' Untranslated Region Among Thai Dengue-3 Virus, Bangkok Isolates, During 1973–2000.** *DNA Cell Biol* 2009, **28**(10):481–491.
- Men R, Bray M, Clark D, Chanock RM, Lai CJ: **Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys.** *J Virol* 1996, **70**:3930–3937.
- Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX: **Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus.** *J Virol* 1998, **72**:2132–2140.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C Ramos C, Rico-Hesse R: **Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis.** *J Virol* 1999, **73**:4738–4747.
- Cologna R, Rico-Hesse R: **American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells.** *J Virol* 2003, **77**:3929–3938.
- Clyde K, Kyle J, Harris E: **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.** *J Virol* 2006, **80**:11418–11431.
- Silva R, de Silva A, Harris E, MacDonald G: **Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions.** *Virus Res* 2008, **135**:320–325.
- Aquino V, Anatriello E, Gonçalves P, DA Silva E, Vasconcelos P, Vieira D, Batista W, Bobadilla M, Vazquez C, Moran M, Figueiredo L: **Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:710–715.
- Roche C, Cassar O, Laille M, Murgue B: **Dengue-3 virus genomic differences that correlate with in vitro phenotype on a human cell line but not with disease severity.** *Microbes Infect* 2007, **9**:63–69.
- Vasilakis N, Weaver S: **The history and evolution of human dengue emergence.** *Adv Virus Res* 2008, **72**:1–76.
- Miagostovich M, dos Santos F, Fumian T, Guimarães F, da Costa E, Tavares F, Coelho J, Nogueira R: **Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:307–313.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R: *Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
- Igarashi A: **Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses.** *J Gen Virol* 1978, **40**:531–544.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A: **Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses.** *Am J Trop Med Hyg* 1984, **33**:158–165.
- Lancioti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vomdam AV: **Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**:545–551.
- Harris E, Sandoval E, Xet-Mull AM, Johnson M, Riley LW: **Rapid subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS)-PCR.** *Virology* 1999, **253**:86–95.
- Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kobayashi N: **Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996–1998.** *Arch Virol* 2001, **146**:1381–1390.
- Rigau-Pérez JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ, Hudson SM, Vomdam V, Reiter P, Cano MP, Clark GG: **The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **67**:355–362.
- Peyrefitte C, Pastorino B, Bessaud M, Gravier P, Tock F, Couissinier-Paris P, Martial J, Huc-Anais P, Césaire R, Grandadam M, Tolou H: **Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003–2004.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:757–761.
- Rodríguez-Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Kouri G, Gould EA, Halstead S, Guzman MG: **Dengue virus type 3, Cuba, 2000–2002.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:773–774.

41. Uzcategui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcategui R, Holmes EC, Gould EA: **Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination.** *J Gen Virol* 2001, **82**:2945–2953.
42. Ocazonez R, Cortés F, Villar L, Gómez S: **Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:725–731.
43. Barero P, Mistchenko A: **Genetic analysis of dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina.** *Virus Res* 2008, **135**:83–88.
44. Briseño-García B, Gómez-Dantés H, Argott-Ramírez E, Montesano R, Vázquez-Martínez AL, Ibáñez-Bernal S, Madrigal-Ayala G, Ruiz-Matus C, Flisser A, Tapia-Conyer R: **Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue-3 in Mexico.** *Emerg Infect Dis* 1996, **2**:133–135.
45. Istúriz RE, Gubler DJ, BredelCastillo J: **Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean.** *Infect Dis Clin North Am* 2000, **14**:121–140.
46. Messer WB, Vitarana UT, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala LD, Ramesh R, Withana N, Gubler DJ, De Silva AM: **Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever.** *AmJTrop Med Hyg* 2002, **66**:765–773.
47. Dash P, Parida M, Saxena P, Abhyankar A, Singh C, Tewari K, Jana A, Sekhar K, Rao P: **Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: implications for increased incidence of DHF & DSS.** *Viol J* 2006, **3**:55.
48. Braga IA, Lima JB, Soares SS, Valle D: **Aedes aegypti resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**:199–203.
49. Honório NA, Lourenço-De-Oliveira R: **[Frequency of Aedes aegypti and Aedes albopictus larvae and pupae in traps, Brazil].** *Rev Saude Publica* 2001, **35**:385–391.
50. Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, Lam-Phua SG, Tan BT: **Monitoring of dengue viruses in field-caught Aedes aegypti and Aedes albopictus mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing.** *AmJTrop Med Hyg* 1998, **58**:578–586.
51. Kow CY, Koon LL, Yin PF: **Detection of dengue viruses in field caught male Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR.** *J Med Entomol* 2001, **38**:475–479.
52. Wang WK, Lin SR, Lee CM, King CC, Chang SC: **Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies.** *J Virol* 2002, **76**:4662–4665.
53. Chao D, King C, Wang W, Chen W, Wu H, Chang G: **Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra.** *Viol J* 2005, **2**:72.
54. Podder G, Breiman R, Azim T, Thu H, Velathanthiri N, Mai Q, Lowry K, Aaskov J: **Origin of dengue type 3 viruses associated with the dengue outbreak in Dhaka, Bangladesh, in 2000 and 2001.** *AmJTrop Med Hyg* 2006, **74**:263–265.
55. Kochel T, Aguilar P, Felices V, Comach G, Cruz C, Alava A, Vargas J, Olson J, Blair P: **Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000–2005.** *Infect Genet Evol* 2008, **8**:682–688.
56. Amarilla A, de Almeida F, Jorge D, Alfonso H, de Castro-Jorge L, Nogueira N, Figueiredo L, Aquino V: **Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus.** *Viol J* 2009, **6**:113.
57. Villabona-Arenas C, Miranda-Esquivel D, Jimenez R: **Phylogeny of dengue virus type 3 circulating in Colombia between 2001 and 2007.** *Trop Med Int Health* 2009, .
58. de Mora D, Andrea L, Alvarez M, Regato M, Fajardo A, Recarey R, Colina R, Khan B, Cristina J: **Evidence of diversification of dengue virus type 3 genotype III in the South American region.** *Arch Virol* 2009, **154**:699–707.
59. Ramírez A, Fajardo A, Moros Z, Gerder M, Caraballo G, Camacho D, Comach G, Alarcón V, Zambrano J, Hernández R, *et al*: **Evolution of dengue virus type 3 genotype III in Venezuela: diversification, rates and population dynamics.** *Viol J* 2010, **7**:329.
60. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I: **Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Cote d'Ivoire.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:1770–1772.
61. Ospina MC, Diaz FJ, Osorio JE: **Prolonged co-circulation of two distinct Dengue virus Type 3 lineages in the hyperendemic area of Medellín, Colombia.** *Am J Trop Med Hyg* 2010, **83**:672–678.
62. Chen R, Vasilakis N: **Dengue—quo tu et quo vadis?** *Viruses* 2011, **3**:1562–1608.
63. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R: **Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes.** *J Virol* 2005, **79**:853–859.
64. Peyrefitte CN, Couissinier-Paris P, Mercier-Perennec V, Bessaud M, Martial J, Kenane N, Durand JP, Tolou HJ: **Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies).** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:5195–5198.
65. Aquino J, Tang W, Ishii R, Ono T, Eshita Y, Aono H, Makino Y: **Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001–2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance.** *Virus Res* 2008, **137**:266–270.

doi:10.1186/1743-422X-10-3

Cite this article as: Castro *et al*: Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil. *Virology Journal* 2013 **10**:3.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010

Nieli Rodrigues da Costa Faria, Rita Maria Ribeiro Nogueira, Ana Maria Bispo de Filippis, Jaqueline Bastos Santos Simões, Fernanda de Bruycker Nogueira, Monique da Rocha Queiroz Lima, Flavia Barreto dos Santos*

Flavivirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Manguinhos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

In Brazil, dengue has been a major public health problem since its introduction in the 1980s. Phylogenetic studies constitute a valuable tool to monitor the introduction and spread of viruses as well as to predict the potential epidemiological consequences of such events. Aiming to perform the molecular characterization and phylogenetic analysis of DENV-2 during twenty years of viral activity in the country, viral strains isolated from patients presenting different disease manifestations ($n=34$), representing six states of the country, from 1990 to 2010, were sequenced. Partial genome sequencing (genes C/prM/M/E) was performed in 25 DENV-2 strains and full-length genome sequencing (coding region) was performed in 9 strains. The percentage of similarity among the DENV-2 strains in this study and reference strains available in Genbank identified two groups epidemiologically distinct: one represented by strains isolated from 1990 to 2003 and one from strains isolated from 2007 to 2010. No consistent differences were observed on the E gene from strains isolated from cases with different clinical manifestations analyzed, suggesting that if the disease severity has a genetic origin, it is not only due to the differences observed on the E gene. The results obtained by the DENV-2 full-length genome sequencing did not point out consistent differences related to a more severe disease either. The analysis based on the partial and/or complete genome sequencing has characterized the Brazilian DENV-2 strains as belonging to the Southeast Asian genotype, however a distinction of two Lineages within this genotype has been identified. It was established that strains circulating prior DENV-2 emergence (1990–2003) belong to Southeast Asian genotype, Lineage I and strains isolated after DENV-2 emergence in 2007 belong to Southeast Asian genotype, Lineage II. Furthermore, all DENV-2 strains analyzed presented an asparagine (N) in E₃₉₀, previously identified as a probable genetic marker of virulence observed in DHF strains from Asian origin. The percentage of identity of the latter with the Dominican Republic strain isolated in 2001 combined to the percentage of divergence with the strains first introduced in the country in the 1990s suggests that those viruses did not evolve locally but were due to a new viral Lineage introduction in the country from the Caribbean.

Citation: Faria NRdC, Nogueira RMR, de Filippis AMB, Simões JBS, Nogueira FdB, et al. (2013) Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3): e2095. doi:10.1371/journal.pntd.0002095

Editor: Ann M. Powers, Centers for Disease Control and Prevention, United States of America

Received: August 7, 2012; **Accepted:** January 22, 2013; **Published:** March 14, 2013

Copyright: © 2013 Faria et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors want to thank FIOCRUZ, CNPq, FAPERJ and CAPES for the financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: flaviab@ioc.fiocruz.br

Introduction

Dengue viruses (DENV) are the most important human arboviruses worldwide, transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. *Aedes aegypti* is the main vector. Explosive epidemics have become a public health problem, economic impact, socially and politically significant [1,2].

Currently it is estimated that 70 to 500 millions dengue infections occur annually in 124 endemic countries. Nearly 3.6 billion people (55% of world population) are at risk of contracting the disease (DVI). The rapid global spread of DENV in the last 50 years resulted in the dispersal of genotypes associated with increased severity [3].

The four serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4) are closely related yet antigenically distinct and contain a positive-sense RNA genome that is translated as a single

polyprotein and post-translationally cleaved into three structural proteins, capsid (C), premembrane (prM) and envelope (E), and seven nonstructural proteins, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5. The RNA genome is packaged in an icosahedral capsid, and the nucleocapsid is surrounded by a lipid bilayer containing the E and M proteins [4,5].

DENV infection causes a spectrum of clinical disease ranging from an acute debilitating, self-limited febrile illness - dengue fever (DF) - to a life-threatening syndrome - dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) [6]. Despite the similar disease manifestations, the DENV are genetically diverse with approximately 40% of amino acid sequence divergence. Distinct DENV genotypes can be characterized when the genetic divergence are higher than to 6% [7].

A recent analysis of 1,827 complete E gene sequences supported the existence of six genotypes for DENV-2: Asian genotype I,

Author Summary

In Brazil, the first dengue haemorrhagic cases were reported after the DENV-2 introduction in Rio de Janeiro, which spread to other states in the country. Aiming to perform the molecular characterization and phylogenetic analysis of DENV-2 during twenty years of viral activity in the country, strains isolated from patients presenting different disease manifestations were sequenced. Phylogeny characterized the DENV-2 as belonging to the Southeast Asian genotype, however a distinction of two lineages within this genotype has been identified. Furthermore, all strains presented an asparagine in E₃₉₀, previously identified as a probable genetic marker of virulence. The results show a temporal circulation of genetically different viruses in Brazil, probably due to the introduction of a new viral lineage from the Caribbean, which lead to the re-emergence of this serotype after 2007, causing the most severe epidemic already described in the country.

Asian genotype II, Southeast Asian/American genotype, Cosmopolitan genotype, American genotype and the Sylvatic genotype, the most genetically distinct genotype. Furthermore, the Southeast Asian/American genotype's topologies suggested a spatial division of this genotype into two major subclades [8].

In the Americas, the first DHF epidemics in the 80's were due to the introduction of the Southeast Asian/American genotype which replaced the American genotype and more severe cases with higher viremia were reported [9–11].

In Brazil, the disease has become a public health problem with explosive epidemics after the introduction of DENV-1 in 1986 in Rio de Janeiro [12]. However, the first DHF/DSS cases were only reported after the DENV-2 introduction in 1990 in the country [13,14]. From 1990 until the 26th epidemiological week of 2010, a total of 5,481,921 cases, including 17,203 cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) and 1954 deaths were reported in the country [15].

Aiming to perform the phylogeny of the DENV-2 and its impact in the disease severity during 20 years of viral activity in Brazil, strains isolated from DF, DHF/DSS and fatal cases occurred since its introduction in 1990 until 2010, were analyzed. In this scenario, the partial sequencing (C/prM/M/E genes) of 25 DENV-2 strains was performed. To determine whether the evolutionary relationships observed for the C/prM/M/E genes were applicable to the complete genome, we further fully sequenced the coding regions of nine DENV-2 strains. In order to avoid mutations introduced by *in vitro* passages of the virus in cell cultures we used DENV-2 strains extracted directly from serum or originally isolated from cell cultures.

Materials and Methods**Ethical statement**

The strains analyzed in this study belong to a previously-gathered collection from the Laboratory of Flavivirus, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, obtained from human serum through the passive surveillance system performed by the Laboratory from an ongoing Project approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 274/05), Ministry of Health-Brazil. Samples were chosen anonymously, based on the laboratorial results and clinical manifestations input on the Laboratory database.

Viral strains

Viral strains consisted of DENV-2 ($n=34$) isolated during epidemics occurred from 1990 to 2010 in six states in Brazil (Table 1). Each sample was accompanied by identification form containing clinical and epidemiological data. All strains were determined as DENV-2 serotype by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and/or virus isolation from DF ($n=19$), DHF ($n=3$), DSS ($n=1$) and fatal cases ($n=4$; 1 from DF, 2 from DHF and 1 with no classification available). Seven cases were not classified due to data unavailability.

RNA extraction

Viral RNA was extracted from infected cell culture supernatant or directly from the patients' serum using QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions and stored at -70°C for DENV typing and sequencing.

RT-PCR (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction)

RT-PCR for detecting and typing DENV was performed as described previously [16]. Briefly, consensus primers were used to anneal to any of the four DENV types and amplify a 511-bp product in a reverse transcriptase-polymerase reaction. A cDNA copy of a portion of the viral genome was produced in a reverse transcriptase reaction. After a second round of amplification (nested PCR) with type-specific primers, DNA products of unique size for DENV-2 (119 bp) were generated.

Dengue virus isolation

Virus isolation was performed by inoculation into C6/36 *Aedes albopictus* cell line [17] and isolates were identified by indirect fluorescent antibody test (IFAT) using serotype-specific monoclonal antibodies [18]. Briefly, patients' sera were inoculated into C6/36 *Aedes albopictus* cell monolayers in L-15 Medium (Leibovitz, Sigma) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS, Invitrogen) and 0.2 mM of nonessential amino acids (Invitrogen). Cells were incubated at 28°C for 5 to 7 days and observed for cytopathic effects. Infected supernatant was clarified by centrifugation and virus stocks stored in 1-mL aliquots at -70°C until use.

Sequencing

Reverse transcription (RT) was performed using 5 μL of extracted RNA in 25 μL of AccessQuick RT-PCR System (Promega Corporation) and specific oligonucleotides primers (Table 1). To amplify the C/prM/M/E region of 2,325 bp, specific primers (1 to 4) were used to produce 4 overlapping amplicons of approximately 900 bp and to amplify the complete coding region (10,173 bp), 15 overlapping amplicons of approximately 900 bp (1 to 15). Thermocycling conditions consisted of a single step of 42°C for 60 minutes and 40 cycles of denaturation at 94°C (30 seconds), annealing at 56°C or 63°C (60 seconds) depending on the set of primers, extension at 72°C (2 minutes) and a final extension at 72°C (10 minutes). Amplification was conducted using a Model 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). PCR products were purified from 1.0% agarose gels using QIAquick Gel extraction Kit or QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) and used as template for cycle sequencing. Sequencing reactions were performed as recommended in the BigDye Dideoxy Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and the products were analyzed using an automated 3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Partial sequences (C/prM/M/E) and complete coding sequences for the unprocessed polyprotein (5' and 3' noncoding regions excluded) were deposited in GenBank (Table 2).

Table 1. Primers used for amplification of the partial and complete genes (coding region) from Brazilian DENV-2.

Primers Designation	Sense A (5'→3')	Anti-sense B (5'→3')	Position in the genome (according to AF489932)	Amplicon (pb)	Tm (°C) A/B
1	CGT GGA CCG ACA AAG ACA GA	GGA GCG ACG GCT GTC AGT AA	14–906	892	62/64
2	GAT CAG TGG CAC TCG TTC CA	CTC CCG GTAGCCATGGTAAC	708–1586	878	62/62
3	ATG GCA CTG TCA CGA TGG AG	CAC TAT CAG CCTGCACCATAGCT	1467–2405	938	62/63
4	GGA TCC CTG GGA GGA GTG TT	TCC ATT GCT CCA GAG GGT GT	2202–3106	904	63/63
5	GAC TCA AAA CTC ATG TCA GCG G	GTG CTT TGG GAA AGG AGT GC	2958–3800	842	62/62
6	GGG CGT TAC CAT GAC GGA T	GCC CAT GAT GGT TCA ATC CTT	3656–4709	1053	63/63
7	AAT TAC GGC AGC AGC ATG GT	GGA GGA GTG GCT GTC ATG AAA	4475–5456	981	63/63
8	CAG CCA TCA GAA CCG AGC A	CCA CCT TCT GTC TGC GTA GTT G	5254–6185	931	64/62
9	ACA CAC CTG AAG GAA TCA TTCCTA G	TGA CAA ATG TTG TAG CCA CGG	6016–6948	932	62/62
10	AGC CAT CCT CAC AGT GGT GG	TCT CAG TTT TGC TGA GCC TCG	6791–7737	946	64/63
11	CTA TTT GGC CCG AGC TGG A	TTT CAA TTC CAA TGT TGC GG	7508–8354	846	63/62
12	ATG GAG GAG CTT TAG TGA GGA ATC	CGT GCT CCA AGC CAC ATG TA	8170–8994	824	61/63
13	GAA ATC GGC TCG TGA GGC T	TCA TCT TGG TTT CTG CAT GGG	8825–9746	921	63/63
14	GAC AGT CAC AGA AGA AAT CGC TGT	CTA TGG CTT GAT CCG ACC TGA	9473–10304	831	62/62
15	CGG CTC ATT GAT TGG GCT AA	TTC TGT GCC TGG AAT GAT GCT	10109–10662	553	63/63

doi:10.1371/journal.pntd.0002095.t001

Sequences and phylogenetic analysis

The analysis of similarities, percentage of identity and divergence among the strains analyzed were performed using Megalin Program (DNAsar, www.dnastar.com). The multiple alignment was performed using CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) and the phylogenetic analysis by MEGA 4 software (www.megasoftware.net), using the Maximum Likelihood method (ML), according to the Tamura-Nei model, with a bootstrap of 1,000 replications. Strains representative from the five genotypes available in Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) were used for the comparison, DENV-1 (GenBank accession number GU370049), DENV-3 (accession number EF629369), and DENV-4 (accession number AF289029) strains were used as outgroup to root the trees (Table 3).

Results

In this study, the strains BR64022/98 isolated in the 90's and Jamaica 1983 were considered as reference strains for comparison purposes. The percentage of similarity among the 25 DENV-2 strains ranged from 80.3 to 99.9% when those compared to each other and to strains representative of the different genotypes available on GenBank. The partial genome sequencing analysis characterized the Brazilian DENV-2 strains from this study as belonging to the Southeast Asian genotype, however a distinction of two Lineages within this genotype has been identified. It was observed that strains circulating prior DENV-2 emergence (1990–2003) belong to Southeast Asian genotype, Lineage I and strains isolated after DENV-2 emergence in 2007 belong to Southeast Asian genotype, Lineage II (Figures 1 and 2). Furthermore, the latter were more closely related to strains from the Dominican Republic (DR59/01), representative from the Southeast Asian genotype, Lineage II.

When the 25 DENV-2 strains were compared to the strain BR64022/98, amino acid substitutions leading to change in the biochemical properties were observed on the C and prM genes. On the E gene, a total of twelve substitutions were observed, with nine resulting in a change on the amino acid change of biochemical property (Supplementary material 1). No consistent

differences were observed on the E gene from strains isolated from cases with different clinical manifestations analyzed, suggesting that if the disease's severity has a genetic origin, it is not only due to the differences observed on the E gene.

To determine whether possible amino acids differences on other genes were related to disease severity, we fully analyzed (coding region) DENV-2 strains (n = 9), representative of DF cases isolated from 1990 to 1999 and strains isolated from fatal cases occurred after the DENV-2 re-emergence after 2007 until 2010. The strain 0450/2008, representative of the DENV-2 re-emergence isolated from a DF secondary case who evolved to death was fully sequenced and its comparison to the strain from the Dominican Republic (DR59/2001), representative of the DENV-2 re-emergence, showed 22 amino acid substitutions. Likewise, the strain 0690/2008 isolated from a DHF case occurred also during the re-emergence of DENV-2 had nine amino acid substitutions when compared to the strain DR59/2001, with seven of those leading to amino acid biochemical property change (Table S1).

The DENV-2 strain 0337/2008 isolated from a newborn presenting a high anti-DENV IgG titer who evolved to death, infected probably due transplacental transmission as his mother was diagnosed with acute DENV infection, showed substitutions on NS2A, NS4A and NS5, which were shared with the other two strains isolated from fatal cases (Table S2). The results obtained by the DENV-2 full-length genome sequencing did not point out consistent differences related to a more severe disease.

A substitution on E₃₉₀ (N→D) was reported as resulting in a reduction in viral replication in macrophages and dendritic cells [19] whereas E₃₉₀ (D→N) resulted in enhanced replication, maturation and activation of macrophages, enhancement of the immune response with an increased production of cytokines, increased vascular permeability and consequently a greater chance of developing DHF [20]. All DENV-2 strains analyzed presented an asparagine (N) in E₃₉₀, previously identified as a probable genetic marker of virulence observed in DHF strains from Asian origin.

The percentage of identity of the re-emergent DENV-2 with the Dominican Republic strain isolated in 2001 combined to the

Table 2. DENV-2 used in this study for partial ($n=25$) and complete coding region ($n=9$) sequencing.

Strain #	Year of isolation	State of origin	Clinical manifestation	Immune response	Age	Gender	Sequence region	Access number GenBank
44298	1991	BA	DF	S	NA	Fem	C/prM/W/E	HQ012508
48578	1994	CE	NA	ND	NA	Male	C/prM/W/E	HQ012509
51222	1995	RJ	NA	ND	NA	Fem	C/prM/W/E	HQ012510
52477	1995	RJ	NA	ND	NA	Fem	C/prM/W/E	HQ012511
55769	1996	RS*	DF	ND	10	Male	C/prM/W/E	HQ012512
55803	1996	BA	NA	S	NA	Fem	C/prM/W/E	HQ012513
58448	1997	RN	DF	ND	NA	Male	C/prM/W/E	HQ012514
59382	1997	RN	DHF/Fatal	ND	NA	Male	C/prM/W/E	HQ012515
63291	1998	RJ	DF	ND	16	Male	C/prM/W/E	HQ012516
64625	1999	RJ	DF	ND	34	Male	C/prM/W/E	HQ012517
66985	2000	RJ	DF	ND	39	Male	C/prM/W/E	HQ012518
67955	2000	RJ	DHF	ND	27	Male	C/prM/W/E	HQ012519
69221	2001	RJ	DF	ND	28	Male	C/prM/W/E	HQ012520
72308	2001	RJ	DF	ND	62	Fem	C/prM/W/E	HQ012521
75103	2002	RJ	DF	ND	61	Masc	C/prM/W/E	HQ012522
76012	2002	ES	NA	ND	41	Fem	C/prM/W/E	HQ012523
77395	2003	ES	NA	ND	50	Male	C/prM/W/E	HQ012524
86977	2007	RJ	DHF	ND	7	Male	C/prM/W/E	HQ012525
88034	2007	RJ	DF	ND	12	Male	C/prM/W/E	HQ012526
0030	2008	RJ	DF	S	13	Male	C/prM/W/E	HQ012527
0832	2008	RJ	DHF	S	8	Fem	C/prM/W/E	HQ012528
066	2009	BA	DF	ND	1 month	Male	C/prM/W/E	HQ012529
0145	2009	ES	DF	ND	16	Male	C/prM/W/E	HQ012530
023	2010	RJ	DF	ND	73	Male	C/prM/W/E	HQ012531
0199	2010	RJ	DSS	S	50	Fem	C/prM/W/E	HQ012532
39145	1990	RJ	DF	ND	41	Fem	Complete CR	HQ012538
41768	1990	RJ	DF	ND	10	Male	Complete CR	HQ012533
42727	1991	RJ	DF	P	NI	Fem	Complete CR	HQ012534
48622	1994	CE	NA	ND	NI	Fem	Complete CR	HQ012535
61310	1998	RJ	DF	ND	47	Fem	Complete CR	HQ012536
64905	1999	RJ	DF	ND	52	Fem	Complete CR	HQ012537
0337	2008	RJ	Fatal	S	5 days	NA	Complete CR	NA
0450	2008	RJ	DF/Fatal	S	46	Male	Complete CR	NA
0690	2008	RJ	DHF/Fatal	S	32	Male	Complete CR	HQ026763

BA: Bahia, CE: Ceará, RJ: Rio de Janeiro, RS: Rio Grande do Sul, RN: Rio Grande do Norte, ES: Espírito Santo; DF: Dengue Fever; DHF: Dengue Hemorrhagic Fever; DSS: Dengue Shock Syndrome; Fem: Female; Male; C/prM/W/E: Capsid/pré-membrane/Membrane/Envelope; Complete CR: Complete coding region; *Imported case; NA: Not available; ND: Not done; P: primary infection; S: secondary infection.
doi:10.1371/journal.pntd.0002095.t002

percentage of divergence with the strains first introduced in the country in the 90's suggests that those viruses did not evolved locally but were due to a new viral Lineage introduction in the country from the Caribbean.

Discussion

In the Americas, the first DENV-2 was isolated in 1953 in Trinidad [21] and the first DHF epidemic caused by this serotype occurred in Cuba in 1981 after the introduction of DENV-2 genotype originated in Southeast Asia [10,22]. Epidemics studies showed that the DENV-2 introduced in Brazil, Colombia, Venezuela and Mexico had a common ancestor with isolates

from Southeast Asia, suggesting the direct transmission from that region to the Americas [23].

In Brazil, the first DHF/DSS cases were reported after the DENV-2 introduction in Rio de Janeiro [13,24,25], which spread to other states in the country. Phylogenetic analysis of DENV-2 strains circulating at that time confirmed the genotype circulating in Southeast Asia [26,27]. This observation was further corroborated in an extensive analysis of viruses from the states of Rio de Janeiro (1990 and 1995), Ceará (1994), Bahia (1994 and 1999), Maranhão (1996 and 1998), Mato Grosso (1997), Pará (1998), Rio Grande do Norte (1998), Paraíba (1999) Sergipe (1999), Espírito Santo (1995 and 2000) and forty strains isolated in Pernambuco (1995–2002) [28,29].

Table 3. Strains representative of the different DENV-2 genotypes and strains used as outgroup for comparison purposes.

Strain #	Year of isolation	Country	Genotype	GenBank Accession #
BR64022	1998	Brazil	Southeast Asia (Lineage I)	AF489932
BID-V3496	1990	Venezuela	Southeast Asia (Lineage I)	GQ868540
N.1409	1983	Jamaica	Southeast Asia (Lineage I)	M20558
BID-V2683	1999	Nicaragua	Southeast Asia (Lineage II)	GQ199895
BID-V2996	2007	Nicaragua	Southeast Asia (Lineage II)	GQ199868
BID-V595	2006	Puerto Rico	Southeast Asia (Lineage II)	EU482726
BID-V1439	2005	Puerto Rico	Southeast Asia (Lineage II)	EU687216
DR23/01	2001	Dominican Republic	Southeast Asia (Lineage II)	AB122020
DR59/01	2001	Dominican Republic	Southeast Asia (Lineage II)	AB122022
BID-V3653	2008	Brazil	Southeast Asia (Lineage II)	GU131885
China-04	1985	China	Asian II	AF119661
New Guinea C	1944	New Guinea	Asian II	AF038403
Strain 44	1989	China	Asian II	AF204177
TB16i	2004	Indonesia	Asian I	AY858036
98900666 DSS DV-2	1998	Indonesia	Asian I	AB189124
IQT1797	1995	Peru	American	AF1100467
strain 131	1992	Mexico	American	AF1100469
isolate 1328	1977	Puerto Rico	American	EU056812
Dak Ar D75505	1991	Senegal	Sylvatic	EF457904
DENV-1-SGEH(D1)1494Y08	2008	Singapore	-	GU370049
BRDEN3 290-02	2002	Brazil	-	EF629369
DENV-4-Guangzhou B5	2000	China	-	AF289029

doi:10.1371/journal.pntd.0002095.t003

After seven years without activity in Brazil, DENV-2 re-emerged in April of 2007 in the state of Rio de Janeiro causing the more severe dengue epidemic in the country in 2008 [30,31]. Phylogenetic analysis of DENV-2 circulating in 90's and after its re-emergence identified two distinct lineages within the Southeast Asian genotype [32].

In the present study, the analysis based on the sequencing of the C/prM/M/E genes (2,325 bp) from 25 DENV-2 Brazilian isolates divided those strains in two distinct groups, one formed by DENV-2 isolated from 1991 to 2003 and another with strains isolated from 2007 to 2010 following the re-emergence of this serotype in the country. Corroborating previous phylogeny [26–29] strains isolated from 1991 to 2003 were classified as Southeast Asian genotype, Lineage I and presenting similarities with the Brazilian strain BR64022/98 and the strain Jamaica/83. However, the strains isolated between 2007 and 2010, showed higher similarity with the strain DR59/01, from the Dominican Republic, representing the Southeast Asian genotype, Lineage II, corroborating the analysis by Oliveira *et al* [32]. A study by Aquino *et al* [33] demonstrated that DENV-2 strains from Paraguay could also be grouped into two distinct lineages within the Southeast Asian genotype and suggested the introduction of a new lineage possibly associated a serotype shift from DENV-3 to DENV-2, as observed in Brazil in 2007 and 2008 [31].

The absence of DENV-2 circulation in the years prior to its re-emergence and the high similarity observed between those viruses and the strain isolated in the Dominican Republic in 2001, suggests the introduction of a new lineage of DENV-2 causing the 2008 epidemic in Brazil. Romano *et al* [34] also demonstrated that

DENV-2 strains isolated in Sao Paulo State in 2010 were in a monophyletic group with the strains circulating in Rio de Janeiro in 2007 and 2008 and that those were closely related to strains isolated in Cuba and Dominican Republic, with a small genetic distance, suggesting that this new lineage of DENV-2 re-emerged in of Brazil may have been imported the Caribbean. Although genetic variants of DENV have been implicated in disease severity in the past [35,36], it was with the advance of evolutionary studies based on phylogenetic analysis combined to epidemiological data that genotypes within the distinct serotypes were associated with a greater or lesser disease severity [11,37–40].

The strain isolated from a DHF case in 2000 (strain RJ/67922/2000) presented an exclusive substitution on prM₁₄₃ (I→I) when compared to the other strains analyzed in this study. However, substitutions related to DHF/DSS cases were identified on prM₁₆ and prM₈₁ [41].

Substitutions were found on the residues E₁₂₉ (V→I) and E₁₃₁ (L→Q), and these are related to the division of the Southeast Asian genotype in two distinct clades, corroborating the observations that amino acids on E₁₂₉ and E₁₃₁ are in critical markers for genetic classification of DENV [33,42].

All 34 strains analyzed in this study presented an asparagine (N) on E₃₉₀, previously characterized as a probable trigger for DHF detected in strains of Asian origin [43]. Mutations on the flaviviruses domain III of E protein can induce virulence or attenuation of the virus to escape from the immune system [44,45] and in this study, changes were observed throughout this domain (aa 297 to 394). The DHF case, which culminated in death (59382/1997) showed amino acid differences only in

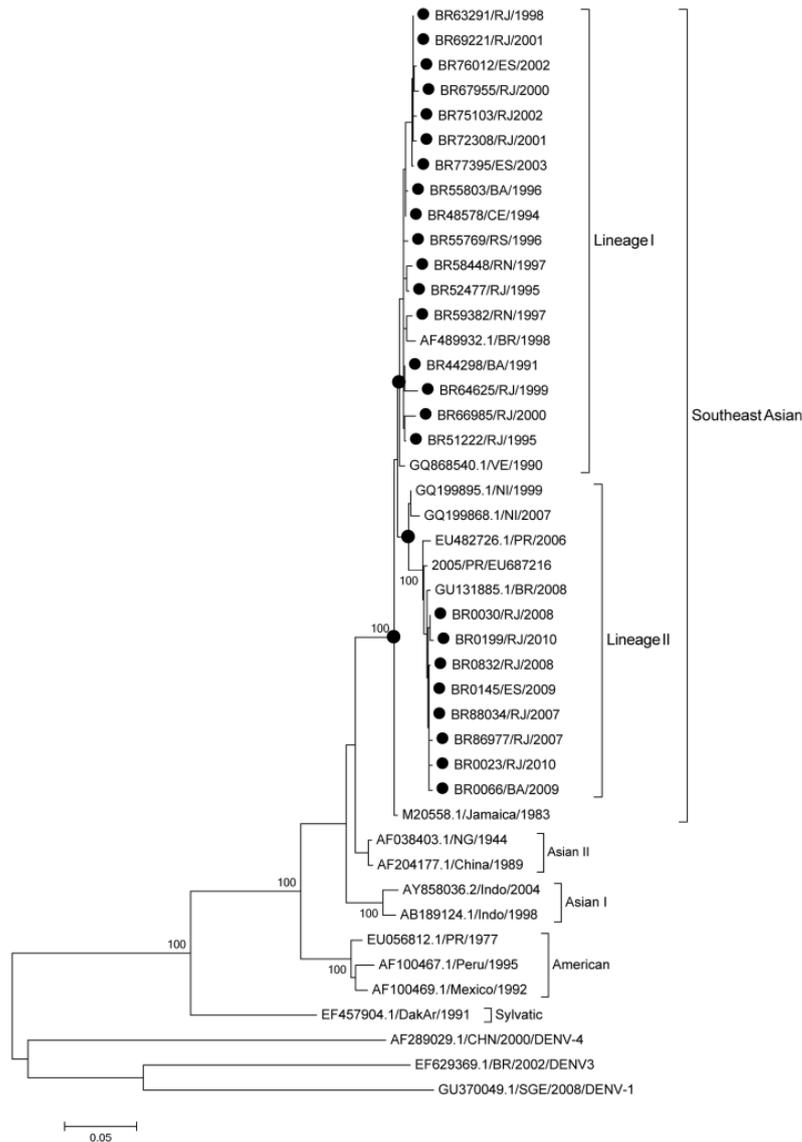


Figure 1. Maximum likelihood phylogeny based on the C/prM/E genes of 25 Brazilian DENV-2, 1991–2010. Black circles represent DENV-2 sequences generated in this study. Strains representative from the four genotypes available in Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) were used for the comparison, DENV-1, DENV-3 and DENV-4 strains were used as outgroup to root the trees. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. DENV strains used were named as follows: Country/strain number/state/year. RJ: Rio de Janeiro, ES: Espírito Santo, CE: Ceará, BA: Bahia, RS: Rio Grande do Sul, RN: Rio Grande do Norte. doi:10.1371/journal.pntd.0002095.g001

the E gene, but those differences were shared with other DF cases strains, when they were compared to the strain BR64022/98.

In this study, a substitution on prM₃₉ was observed on the strain 0690/2008 isolated from a DHF case with a fatal outcome, on the strain 55769/1996 from a DF case and on the strain 0199/2010. Catteau *et al* [46] demonstrated that the intracellular production of M ectodomain of all four DENV serotypes of DENV induce apoptosis in host cells. The carboxy terminus of prM protein with

nine amino acids (aa 32–40) of some flaviviruses was designated as Apopto M [46] and appears to play an important role in inducing apoptosis and cytopathic effects [46–48].

Several changes were observed along the NS protein genes. Studies conducted by Yábar, [49] show that mutations in NS1 are related to the development of DHF/DSS cases when they were compared to patients with DF.

Despite the functional importance of mutations in NS genes remains unknown, future studies can elucidate their role in the

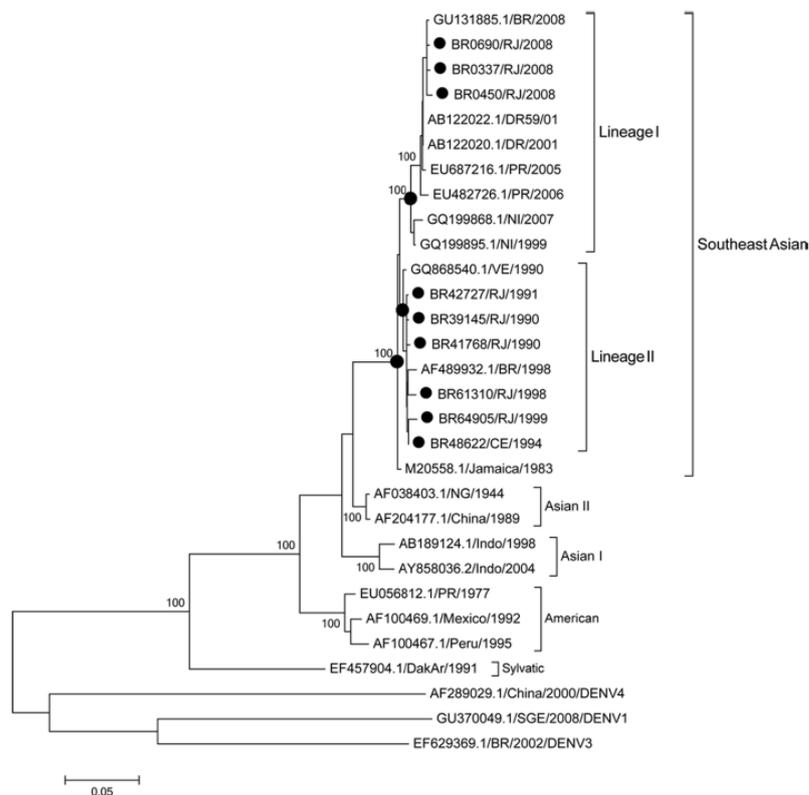


Figure 2. Maximum likelihood phylogeny based on the complete coding region sequencing of 9 Brazilian DENV-2, 1990–2008. Black circles represent DENV-2 sequences generated in this study. Strains representative from the four genotypes available in Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) were used for the comparison, DENV-1, DENV-3 and DENV-4 strains were used as outgroup to root the trees. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. DENV strains used were named as follows: Country/strain number/state/year. RJ: Rio de Janeiro and CE: Ceará. doi:10.1371/journal.pntd.0002095.g002

emergence of strains and/or pathogenesis of the disease. It was not possible to correlate the role of Lineage II emergence with an increased severity of cases observed in the period between the years 2007–2010. Furthermore, the occurrence of secondary infection may have been the risk factor for the development of more severe cases.

In conclusion, this result shows a temporal circulation of genetically different viruses in Brazil probably due to the introduction of a new viral lineage from the Caribbean which lead to the re-emergence of this serotype after 2007. In 2007–2008, DENV-2 was responsible for most severe epidemic already described in the country, with 787,726 cases reported and 491 deaths [31]. Moreover, the Caribbean has been suggested as an important region for the circulation of DENV-2, importation and exportation of strains from and to Central America and South America [42,50,51].

In the past 20 years, DENV-2 activity in Brazil has contributed significantly to changes in the disease morbidity and sudden age shift [30]. In dengue endemic countries, displacement of DENV serotypes, genotypes and lineages have been reported previously and have been associated with changes in the disease severity [40,52–55]. This emphasizes the need of straightening virological

surveillance to monitor the emergence or re-emergence of DENV strains with pathogenic potential to cause epidemics.

Supporting Information

Table S1 Molecular characterization of DENV-2 strains isolated in Brazil based on the partial genes analysis. (DOCX)

Table S2 Molecular characterization of DENV-2 isolated in Brazil based on the complete coding region analysis. (DOCX)

Acknowledgments

To José da Costa Farias Filho and Leda Maria do Santos for virus isolation and identification, to Joselio Araujo for primer design. To Simone Alves Sampaio and Eliane Saraiva M de Araújo for laboratorial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FBdS RMRN AMBdF. Performed the experiments: NRdCF JBSS FdBN MdRQL. Analyzed the

data: NRdCF FdBN. Contributed reagents/materials/analysis tools: RMRN. Wrote the paper: NRdCF FBdS.

References

- Gubler DJ, Meltzer M (1999) Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res* 53: 35–70.
- Gubler D (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330–342.
- Kyle J, Harris E (2008) Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol* 62: 71–92.
- Heinz FX, Collet MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, et al. (2000) Family *Flaviviridae*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, et al., editors. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press 859–878 p.
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA et al., editors. *Fields Virology*, 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 991–1041.
- WHO (2009) *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, Switzerland: WHO.
- Twiddy SS, Farrar JJ, Vinh Chau N, Wills B, Gould EA, et al. (2002) Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298: 63–72.
- Chen R, Vasilakis N (2011) Dengue—quo tu et quo vadis? *Virus Res* 156: 162–168.
- Lewis J, Chang G, Lanciotti R, Kinney R, Mayer L, et al. (1993) Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology* 197: 216–224.
- Guzman M, Deubel V, Pelegrino J, Rosario D, Marrero M, et al. (1995) Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. *Am J Trop Med Hyg* 52: 241–246.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, et al. (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244–251.
- Schatzmayr H, Nogueira R, Travassos da Rosa A (1986) An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro—1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245–246.
- Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Schatzmayr H (1990) Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 253.
- Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Souza R, Zagne S, et al. (1993) Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol Infect* 111: 163–170.
- SVS/MS (2010) *Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de situação e tendências - 2010*. http://www.dengue.org.br/informe_da_dengue_2010.pdf.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545–551.
- Igarashi A (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol* 40: 531–544.
- Gubler D, Kuno G, Sather G, Velez M, Oliver A (1984) Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 33: 158–165.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, et al. (1999) Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738–4747.
- Pryor MJ, Carr JM, Hocking H, Davidson AD, Li P, et al. (2001) Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 65: 427–434.
- Anderson C, Downs W, Hill A (1956) Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. *Science* 124: 224–225.
- Kouri G, Guzmán M, Bravo J (1987) Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 821–823.
- Rico-Hesse R (2003) Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315–341.
- Zagne S, Alves V, Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, et al. (1994) Dengue haemorrhagic fever in the state of Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 677–679.
- Vasconcelos PF, de Menezes DB, Melo LP, Pessa ET, Rodrigues SG, et al. (1995) A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 37: 253–255.
- Miagostovich M, Nogueira R, Schatzmayr H, Lanciotti R (1998) Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 625–626.
- dos Santos F, Miagostovich M, Nogueira R, Edgil D, Schatzmayr H, et al. (2002) Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 991–995.
- Pires Neto R, Lima D, de Paula S, Lima C, Rocco I, et al. (2005) Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res* 38: 843–852.
- Cordeiro M, Freese E, Schatzmayr H, Nogueira R (2008) Vinte Anos de Evolução da Dengue no Estado de Pernambuco. Recife: Editora Universitária, UFPE. 225 p.
- Teixeira M, Costa MC, Barreto F, Barreto M (2009) Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25 Suppl 1: S7–18.
- SVS/MS (2009) *Informe Epidemiológico da Dengue - Semanas de 1 a 52 de 2009*. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_epidemiologico_semana_1a52_09_revisado.pdf.
- Oliveira M, Galvao Araujo J, Ferreira OJ, Ferreira D, Lima D, et al. (2010) Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16: 576–578.
- Aquino J, Tang W, Ishii R, Ono T, Eshita Y, et al. (2008) Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001–2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res* 137: 266–270.
- Romano C, de Matos A, Araújo E, Villas-Boas L, da Silva W, et al. (2010) Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One* 5: e11811.
- Rosen L (1977) The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26: 337–343.
- Gubler D, Reed D, Rosen L, Hitchcock JJ (1978) Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg* 27: 581–589.
- Rico-Hesse R (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174: 479–493.
- Rico-Hesse R (2007) Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* 44: 1462–1466.
- Messer W, Vitarana U, Sivananthan K, Elvtigala J, Preethimala L, et al. (2002) Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 66: 765–773.
- Messer W, Gubler D, Harris E, Sivananthan K, de Silva A (2003) Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9: 800–809.
- Pandey B, Morita K, Kinney R, Kumatori A, Hasebe F, et al. (2003) Effect of Single Amino Acid Mutation in PrM Region of Dengue 2 Virus Associated with Increased Pathogenicity. In: *Proceedings of the 10th Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition; 7–9 December 2003; Dhaka, Bangladesh*.
- Bennett S, Holmes E, Chirivella M, Rodriguez D, Beltran M, et al. (2006) Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol* 87: 885–893.
- Leitmeyer K, Vaughn D, Watts D, Salas R, Villalobos I, et al. (1999) Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738–4747.
- Sánchez I, Ruiz B (1996) A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol* 77 (Pt 10): 2541–2545.
- Lin C, Wu S (2003) A functional epitope determinant on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein interacted with neutralizing-antibody combining sites. *J Virol* 77: 2600–2606.
- Catteau A, Kalinina O, Wagner M, Deubel V, Courageot M, et al. (2003) Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J Gen Virol* 84: 2781–2793.
- Marianneau P, Flamand M, Deubel V, Desprès P (1998) Induction of programmed cell death (apoptosis) by dengue virus in vitro and in vivo. *Acta Cient Venez* 49 Suppl 1: 13–17.
- Xiao S, Zhang H, Guzman H, Tesh R (2001) Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis* 183: 1437–1444.
- Varas CY (2000) Caracterización molecular de la secuencia parcial del gen de la glicoproteína NS1 del virus dengue 1 proveniente de Máncora, Peru. *Rev Med Exp* 18: 35–38.
- Carrington CV, Foster JE, Pybus OG, Bennett SN, Holmes EC (2005) Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas. *J Virol* 79: 14680–14687.
- McElroy KI, Santiago GA, Lennon NJ, Birren BW, Henn MR, et al. (2011) Endurance, refuge, and reemergence of dengue virus type 2, Puerto Rico, 1986–2007. *Emerg Infect Dis* 17: 64–71.
- Zhang C, Mammen MP, Chinnawitwipisan P, Klungthong C, Rodpradit P, et al. (2005) Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 79: 15123–15130.
- Li DS, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, et al. (2010) Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007–2009. *Emerg Infect Dis* 16: 123–125.
- Añez G, Morales-Betoulle ME, Ríos M (2011) Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. *PLoS One* 6: e27459.
- Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Ginting AP, et al. (2011) Displacement of the predominant dengue virus from type 2 to type 1 with a subsequent genotype shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008–2010. *PLoS One* 6: e27322.