

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Ana Maria da Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS
DENGUE CIRCULANTES EM PERNAMBUCO:
IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS**

RECIFE
2013

Ana Maria da Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE
CIRCULANTES EM PERNAMBUCO: IMPLICAÇÕES
EPIDEMIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

Orientadores:

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil

Dra. Marli Tenório Cordeiro

Dr. Ernesto Torres Azevedo Marques Júnior

RECIFE

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586c Silva, Ana Maria da.

Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas / Ana Maria da Silva. — Recife: A. M. da Silva, 2013.

127 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadores: Laura Helena Vega Gonzales Gil, Marli Tenório Cordeiro, Ernesto Torres Azevedo Marques Júnior.

1. Dengue. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Genótipos. 4. Sequenciamento. 5. Filogenia. I. Gil, Laura Helena Vega Gonzáles. II. Cordeiro, Marli Tenório. III. Marques Júnior, Ernesto Torres Azevedo. IV. Título.

616.98

Ana Maria da Silva

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE
CIRCULANTES EM PERNAMBUCO: IMPLICAÇÕES
EPIDEMIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 25/03/2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil (Orientadora)
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Maria Cynthia Braga
CPqAM – FIOCRUZ

Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dedico este trabalho a
minha mãe, Josefa André,
Com amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Laura Gil, pela orientação, confiança, paciência, amizade e apoio; pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ensino.

À Dra. Marli Tenório, pelo incentivo, confiança e amizade; por sua postura prudente e coerente, compartilhando sua experiência em todos os momentos.

Ao Dr. Ernesto Marques, pelas oportunidades dadas, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio e pelo aprendizado.

Às amigas do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM, Viviane e Cássia, pela dedicação e presteza com que realizaram as numerosas reações de sequenciamento.

À amiga Janaína por seu empenho e colaboração nos intermináveis experimentos. “E por não precisarmos realizar PCR na véspera da defesa!”

Ao Dr. Josélio Araújo por sua disponibilidade e solicitude em ajudar nas análises das sequências genômicas.

Ao Laboratório Central de Pernambuco (LACEN) por ter cedido amostras do banco de vírus.

À FACEPE e ao CNPq pelo apoio financeiro, e ao PDTIS pela estrutura tecnológica necessária aos sequenciamentos.

Aos colegas do LaViTE, pela amizade, solidariedade e cooperação. Meus mais sinceros agradecimentos a esses queridos companheiros de todas as horas, que considero como uma verdadeira família.

Às amigas Doris, Geórgia, Andréa Rangel, Rita Maia e Patrícia Fitton pelo carinho, cumplicidade e apoio.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica e da biblioteca do CPqAM, pela presteza e por toda boa vontade com que sempre se dispuseram a ajudar.

Aos professores da pós-graduação pelas orientações e contribuição para a elaboração deste trabalho.

Aos colegas do curso do doutorado por toda a cooperação e convivência.

Aos colegas do Laboratório do Hospital Barão de Lucena, em particular à Dra. Amélia Lacerda, aos companheiros do setor de Bioquímica e dos momentos de interação durante o cafezinho.

À amiga e chefe, Dra. Ana Lima, pela compreensão, incentivo e apoio.

Aos colegas do Laboratório Municipal do Recife, particularmente aos companheiros do setor de sorologia e à amiga Frinéa pelo apoio e abraços cheios de carinho e energia positiva.

Ao amigo Lindinaldo pelas dicas e ajuda nas instalações dos programas de computador. É mesmo muito bom poder contar com o apoio de um amigo nos momentos difíceis.

Às amigas Andréa Barbosa, Ana Lisa e Marta Mônica, companheiras de todas as horas.

Às amigas Andréa Marta, Sandra, Lúcia e Gilcely pelo exemplo contínuo de reconhecimento, generosidade e solidariedade.

À minha família pela compreensão e apoio, principalmente à minha mãe, pela confiança, otimismo, incentivo e amor, sempre.

Minha sincera gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

E a Deus, infinito amor, misericórdia e justiça, por tudo.

Qualquer que seja o verbo que eu utilize em relação às conquistas, o mais apropriado será conjugá-lo sempre na primeira pessoa do plural: lutamos, aprendemos, sofremos, vivemos, crescemos e vencemos.

Este trabalho é fruto da compreensão, do apoio, do carinho, do espírito de solidariedade de todos vocês.

“ As coisas importantes para um homem saber e cujo conhecimento é necessário para sua felicidade não são talvez muito numerosas; contudo, seja qual for esse número, elas são um bem que lhe pertence, que ele tem direito de reivindicar onde quer que o encontre e do qual não podemos privá-lo sem cometer o mais injusto de todos os roubos, pois é um desses bens comuns a todos, cuja transmissão não priva aquele que o dá.”

Jean-Jacques-Rousseau

SILVA, Ana Maria da. **Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas.** 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

Dengue (DENV) é a arbovirose de maior prevalência em humanos no mundo. Estudos moleculares são necessários para melhor entendimento de sua origem e história evolucionária. Análises filogenéticas e epidemiológicas sugerem que genótipos mais virulentos estão substituindo os de menor impacto epidemiológico. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente os sorotipos 1, 2 e 3 do DENV isolados no estado de Pernambuco, de 1995 a 2010, através do sequenciamento e análise de variações do genoma completo do vírus. Os isolados de DENV-1 foram incluídos no genótipo V e três linhagens foram observadas: a linhagem I se relacionou com a cepa BR-90, oriunda do Rio de Janeiro; a linhagem II com isolados da Colômbia e Venezuela; a linhagem III mostrou relação com cepas das Ilhas Virgens e de Cingapura, sugerindo possível origem a partir do Caribe e/ou Ásia. Para o DENV-2 foi identificado o genótipo Sudeste Asiático/Americano. Duas linhagens foram observadas, a linhagem I teve sua origem provável a partir da Venezuela e foi substituída pela linhagem II, que possivelmente se originou da Jamaica. Os isolados de DENV-3 foram incluídos no genótipo III cuja origem possivelmente se deu pela introdução de uma cepa do Rio de Janeiro, oriunda das ilhas do Caribe. Substituições em nucleotídeos e aminoácidos foram encontradas ao longo dos genomas, as quais podem estar envolvidas em importantes alterações em funções das proteínas virais, mas nenhuma associação com a forma clínica da doença ou tipo de infecção foi identificada. Apenas alterações nucleotídicas em 5'UTR de DENV-3 previu estrutura secundária diferente. Alterações nucleotídicas e estruturais em 3'UTR não se relacionaram com a gravidade da doença. A pressão evolucionária observada foi seleção purificadora. Foram identificadas mutações que são específicas dos isolados e/ou linhagens de Pernambuco, que podem ser elementos virais genéticos que contribuem para sua contínua circulação na região e seu potencial epidêmico.

Palavras-chave: Dengue. Epidemiologia molecular. Genótipo. Análise de Sequência. Filogenia.

SILVA, Ana Maria da. **Molecular characterization of dengue circulating in Pernambuco: epidemiological implications.** 2013. Thesis (PhD of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Dengue (DENV) is the most prevalent arboviral disease of humans in the world. Molecular studies are necessary to better understand its origin and evolutionary history. Phylogenetic and epidemiological analysis suggest that more virulent genotypes are replaced from those with less epidemiological impact. The present work objectives to do genetic characterization of DENV 1, 2 and 3 serotypes, from Pernambuco state strains, 1995 to 2010, through sequencing and complete virus genome variation analysis. The DENV-1 isolates studied were grouped on genotype V and three lineages were observed: lineage I that is related with BR-90 strain, arising from Rio de Janeiro. The lineage II presented to be related with Colombia and Venezuela strains. About lineage III, shows relation with Virgins Islands and also Singapore strains, which suggest possible origin from Caribbean and Asia. For DENV-2 were identified the Southeast Asian and American genotype. About two observed lineages, type I had probable origin from Venezuela and was replaced by lineage II, which possible is from Jamaica. The DENV-3 isolates were included on genotype III whose origin is Caribbean Islands. Nucleotides and aminoacids substitutions were observed along genomes and they could be involved with relevant changes in virus proteins functions, but none association with dengue clinical forms or infection type were identified. Only nucleotide changes in DENV-3 5'UTR predicted different secondary structure. Nucleotides and structures changes in 3'UTR did not show relation with severity disease. The evolutionary pressure observed was purifying selection. It were identified mutations that were Pernambuco isolates and/or lineage specific, which could be genetic viral elements that contribute to continuous movement in the region and its epidemic potential.

Keywords: Dengue. Molecular Epidemiology. Genotype. Sequence Analysis. Phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Casos notificados e internações por dengue/FHD, 1986-2010 | 23 |
| Figura 2 | Organização do genoma do vírus dengue | 28 |
| Quadro 1 | Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-1 | 46 |
| Quadro 2 | Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-2 | 47 |
| Quadro 3 | Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-3 | 48 |
| Figura 3 | Árvore filogenética baseada em 83 seqüências do genoma completo de DENV-1. | 58 |
| Quadro 4 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas estruturais) | 60 |
| Quadro 5 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas não estruturais - NS1 e NS2A) | 61 |
| Quadro 6 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas não estruturais - NS2B a NS5) | 62 |
| Quadro 7 | Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-1 entre os isolados de Pernambuco e BR/90. | 64 |
| Figura 4 | Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-1 | 65 |
| Figura 5 | Árvore filogenética baseada em 115 seqüências do genoma completo de DENV-2. | 69 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 8 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas estruturais) | 71 |
| Quadro 9 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas não estruturais - NS1 a NS2B) | 72 |
| Quadro 10 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas não estruturais - NS3 e NS4A) | 73 |
| Quadro 11 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS4B) | 74 |
| Quadro 12 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS5) | 75 |
| Quadro 13 | Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-2 entre os isolados de Pernambuco e BR/08 | 79 |
| Figura 6 | Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-2 | 80 |
| Figura 7 | Árvore filogenética DENV-2 baseada em 186 sequências do genoma completo de DENV-3 | 85 |
| Quadro 14 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-3 (proteínas estruturais) | 87 |
| Quadro 15 | Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-3 (proteínas não estruturais) | 88 |
| Quadro 16 | Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-3 entre os isolados de Pernambuco e BR/02 | 90 |
| Figura 8 | Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 5'UTR de DENV-3 | 91 |
| Figura 9 | Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-3 | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Número de casos notificados de dengue no estado de Pernambuco, sorotipos circulantes e predominantes, por ano, 1995 a 2012 | 22 |
| Tabela 2 | Amostras de DENV-1 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo | 56 |
| Tabela 3 | Identidade entre sequências de amostras de DENV-1 isoladas no estado de Pernambuco e a sequência BR/90 | 59 |
| Tabela 4 | Pressões de seleção em DENV-1 com base em cada gene | 63 |
| Tabela 5 | Amostras de DENV-2 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo | 66 |
| Tabela 6 | Identidade entre sequências de amostras de DENV-2 isoladas no estado de Pernambuco e a sequência BR/08 | 70 |
| Tabela 7 | Pressões de seleção em DENV-2 com base em cada gene | 82 |
| Tabela 8 | Amostras de DENV-3 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo | 83 |
| Tabela 9 | Identidade entre sequências de amostras de DENV-3 isoladas no estado de Pernambuco e a sequência BR/02 | 86 |
| Tabela 10 | Pressões de seleção em DENV-3 com base em cada gene | 89 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| A | Adenina |
| ADE | <i>Antibody-dependent enhancement</i> |
| C | Citosina |
| cDNA | DNA complementar |
| CPqAM | Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães |
| CS | <i>Complementary or Cyclization sequences</i> |
| D | Dengue |
| DALY | <i>Disability-adjusted life years</i> |
| DC | Dengue clássica |
| DCC | Dengue clássica com complicações |
| DENV | Dengue vírus |
| DENV-1 | Dengue vírus sorotipo 1 |
| DENV-2 | Dengue vírus sorotipo 2 |
| DENV-3 | Dengue vírus sorotipo 3 |
| DENV-4 | Dengue vírus sorotipo 4 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxinucleotídeo 5'-trifosfato |
| ELISA | Enzimainunoensaio |
| FHD | Febre hemorrágica da dengue |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| G | Guanina |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| LACEN-PE | Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco |
| LaViTE | Laboratório de Virologia e Terapia Experimental |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |

| | |
|--------|---|
| NPT | Núcleo de Plataforma Tecnológica |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana de Saúde |
| ORF | <i>Open reading frame</i> |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RT-PCR | Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase |
| SCD | Síndrome do choque da dengue |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SL | <i>Stem Loop</i> |
| T | Timina |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TPB | <i>Tryptose Phosphate Broth</i> |
| UTR | <i>Untranslated region</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos da dengue | 18 |
| 1.2 Aspectos clínicos e fisiopatológicos | 23 |
| 1.3 Diagnóstico da Dengue | 27 |
| 1.4 Aspectos moleculares dos vírus dengue | 27 |
| 1.5 Ecologia, evolução e filogenia da dengue | 30 |
| 1.5.1 Classificação em genótipos | 33 |
| 2 OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 Objetivo Geral | 40 |
| 2.2 Objetivos específicos | 40 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 Fontes de dados | 42 |
| 3.2 Tamanho da amostra | 42 |
| 3.3 Espécimes biológicos para análise | 42 |
| 3.4 Isolamento de vírus | 43 |
| 3.5 Diagnóstico Molecular | 43 |
| 3.5.1 Extração de RNA de soro sanguíneo | 43 |
| 3.5.2 Identificação do sorotipo viral por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) | 44 |
| 3.6 Sequenciamento genético dos isolados virais | 44 |
| 3.6.1 Passagem dos vírus em células C6/36 e extração de RNA do sobrenadante da suspensão de células | 44 |
| 3.6.2 Amplificação do genoma viral por RT-PCR para sequenciamento | 44 |
| 3.6.3 Reação de Sequenciamento | 50 |
| 3.7 Análise das sequências obtidas | 50 |
| 4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 52 |
| 5 RESULTADOS | 54 |

| | |
|--|------------|
| 5.1 Seleção de amostras para amplificação e sequenciamento | 55 |
| 5.2 Análise de DENV-1 | 55 |
| 5.2.1 Análise Filogenética de DENV-1 | 56 |
| 5.2.2 Análise das sequências de DENV-1 | 57 |
| 5.2.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-1 | 63 |
| 5.2.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-1 | 63 |
| 5.3 Análise de DENV-2 | 66 |
| 5.3.1 Análise Filogenética de DENV-2 | 66 |
| 5.3.2 Análise das sequências de DENV-2 | 67 |
| 5.3.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-2 | 68 |
| 5.3.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-1 | 82 |
| 5.4 Análise de DENV-3 | 82 |
| 5.4.1 Análise Filogenética de DENV-3 | 83 |
| 5.4.2 Análise das sequências de DENV-3 | 84 |
| 5.4.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-3 | 89 |
| 5.4.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-3 | 89 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO | 94 |
| | |
| 7 CONCLUSÕES | 106 |
| 8 PERSPECTIVAS | 109 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 110 |
| | |
| ANEXOS | |
| Anexo A- Termo de Anuência Secretaria do Estado de Pernambuco | |
| Anexo B - Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP | |
| Anexo C - Autorização para uso da coleção de vírus do LaViTE | |
| Anexo D - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM/FIOCRUZ | |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos da dengue

A dengue é uma doença infecciosa, debilitante, causada pelo vírus dengue (DENV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, presentes nas áreas tropicais e subtropicais mais povoadas do mundo (GUBLER; CLARK, 1995).

A dengue é atualmente um problema de saúde pública de importância mundial. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco e entre 50 a 100 milhões sejam infectadas com o DENV anualmente, resultando em cerca de 500.000 casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) com taxa de letalidade em torno de 5%. Mais preocupante ainda é a previsão de que nos próximos anos, devido ao crescimento populacional e ao aquecimento global, mais da metade da população mundial estará vivendo em áreas endêmicas do dengue (GUBLER, 2002). Em termos de anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade (*disability-adjusted life years*, DALYs), uma morte por dengue representa 28 DALYs (CATTAND et al., 2006).

O vírus dengue foi isolado pela primeira vez no Japão, de soldados japoneses acometidos de doença febril (KIMURA; HOTTA, 1944). Na mesma época, pesquisadores americanos isolaram o mesmo vírus de soldados americanos provenientes do Havaí. Posteriormente, foi isolado outro sorotipo proveniente de Nova Guiné (SABIN; SCHLESINGER, 1945). Os isolamentos foram realizados através da inoculação de amostras de sangue em camundongos. Os primeiros isolados foram denominados DENV-1 e o isolado de Nova Guiné foi denominado DENV-2. O DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (HAMMON et al., 1960).

Há relatos documentados na enciclopédia chinesa, publicada durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.), de uma doença semelhante à dengue, referida como "veneno da água". Além disso, uma epidemia semelhante à dengue é relatada por volta dos anos 1789 – 1790, ocorrida em Batavia (Jakarta), Cairo e Filadélfia, indicando que a distribuição global da dengue tem existido por mais de 200 anos (MAIHURU, 2004).

A primeira epidemia bem documentada que se tornou conhecida como febre hemorrágica aconteceu em Manila nos anos 1953/1954, seguida por outra ainda maior em Bangkok, em 1958 (HOLMES; TWIDDY, 2003).

Até a Segunda Guerra Mundial, as pandemias de dengue aconteciam a cada 10-30 anos e não era frequente a ocorrência de epidemia em uma mesma localidade. Este padrão epidêmico sofreu alterações durante e após a Segunda Guerra Mundial. Mudanças ecológicas decorrentes do incremento da atividade econômica e urbanização no sudeste da Ásia nessa época, criaram condições ideais para o aumento da transmissão de doenças cujos vetores são mosquitos, montando o cenário onde a pandemia global de dengue foi iniciada (GUBLER, 1997; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

Apesar da elevada transmissão epidêmica e hiperendemicidade (circulação simultânea de múltiplos sorotipos do vírus), a epidemia de febre hemorrágica da dengue manteve-se localizada no Sudeste da Ásia, devido principalmente aos programas de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas que visavam o controle da febre amarela urbana nas décadas de 50 e 70 (GUBLER, 2002; RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Esse programa, coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) foi finalizado no início dos anos 70. Ao final dessa década, o *Aedes aegypti* se disseminou na maioria dos países americanos (GUBLER, 2002). O número de países com epidemia de dengue aumentou significativamente entre os anos 80 e 90, à medida que novos sorotipos e diferentes genótipos do vírus foram introduzidos (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). A reinfestação das regiões pelo *Aedes aegypti* e a introdução de novos sorotipos em populações susceptíveis são claros presságios do aumento de transmissão (HALSTEAD, 1997).

Uma importante característica das epidemias de dengue nas Américas durante os anos 60 e 70 foi a circulação de um único sorotipo, em um dado momento, em uma determinada região (hipoendemicidade) (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

Na América Latina, a reemergência da dengue ocorreu durante os anos 60 no Caribe e Venezuela e nos anos 70 na Colômbia (GUZMÁN; KOURI, 2003). Antes de 1975, apenas o DENV-2 e o DENV-3 circulavam nas Américas, causando epidemias nas Ilhas do Caribe (1969), na Jamaica e em Porto Rico (1963), respectivamente (SCHATZMAYR, 2008).

Em 1977, o DENV-1 foi responsável pelas epidemias de dengue ocorridas na Jamaica e em Cuba e em 1978, na Venezuela e em Porto Rico, espalhando-se nos anos seguintes pelo Caribe, México, Estados Unidos (Texas), América Central e norte da América do Sul. Até então, as epidemias, ainda que com as mais variadas extensões, apresentaram sempre as características clínicas de dengue clássica (SCHATZMAYR, 2008).

A primeira e mais grave epidemia de dengue hemorrágica nas Américas ocorreu em 1981, em Cuba, com mais de 10 mil casos graves e 158 mortes, das quais 101 eram crianças. O sorotipo responsável por essa epidemia foi o DENV-2 (GUZMÁN et al., 1999).

Ainda em 1981, o DENV-4 foi introduzido no Caribe oriental que, da mesma forma que o DENV-1, espalhou-se para as demais ilhas do Caribe, México, América Central e norte da América do Sul (SCHATZMAYR, 2008).

A dengue é considerada endêmica em mais de 100 países, distribuídos na Ásia tropical, África, Austrália, América Central e América do Sul, causando altos índices de infecção (GUBLER, 2002). Nas Américas, no período de 2001 a 2007, foram notificados cerca de 2,8 milhões de casos de dengue. O Brasil notificou cerca de 98,5% desses casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

No Brasil, os primeiros casos de dengue, com confirmação laboratorial, ocorreram em Boa Vista (Roraima), em 1982, com o isolamento dos sorotipos 1 e 4 (OSANAI et al., 1983). Esse surto não trouxe maiores consequências para as distintas regiões brasileiras, em virtude de ter ficado restrito à região norte do país, ao contrário do ocorrido quatro anos após, em 1986, quando se deu a reintrodução do DENV-1 no país, mais precisamente pelo Rio de Janeiro (SCHATZMAYR et al., 1986).

Encontrando um ambiente favorável, uma população humana susceptível ao vírus e uma importante densidade populacional do principal transmissor da doença, o DENV estabeleceu-se definitivamente no país, mudando radicalmente o perfil epidemiológico da doença no território brasileiro, principalmente após a introdução do DENV-2, em 1990 (NOGUEIRA et al., 1990), e do DENV-3, no final do ano 2000 (NOGUEIRA et al., 2001), ambos também pelo Rio de Janeiro.

No início do segundo semestre de 2010, o DENV-4 foi identificado como autóctone no estado de Roraima, após vinte e nove anos sem registro de sua circulação no país. Em seguida foram registrados casos desse sorotipo nos estados do Amazonas (dezembro de 2010), seguido pelos estados do Pará, Piauí, Ceará, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo ainda no primeiro semestre de 2011 (BRASIL, 2011a).

Em Pernambuco, a primeira epidemia de dengue ocorreu em 1987. Esta, foi controlada no mesmo ano e teve como sorotipo responsável o DENV-1. Após um período de sete anos sem ocorrência de casos autóctones, a dengue voltou a ocorrer de forma epidêmica e endêmica a partir de 1995, com a introdução do DENV-2. Em 2002, verificou-se a introdução do DENV-3 no estado, quando foram notificados 116.245 casos, com confirmação de 340 casos da FHD e 20 óbitos. A taxa de incidência aumentou de 134 casos por 100.000 para 1.438/100.000 habitantes, em 1995 e 2002, respectivamente (CORDEIRO et al., 2007a).

De 1995 a 2007 foram notificados no estado cerca de 400.000 casos, tendo sido registradas importantes epidemias nesse período, com vários casos de dengue hemorrágica e óbitos, com alternância dos sorotipos 1, 2 e 3 (Tabela1) (CORDEIRO et al., 2007a).

Em 2008, foram notificados 41.137 casos, com 391 casos suspeitos de FHD, dos quais, 105 casos foram confirmados como FHD, com uma letalidade de 10,5%, e 192 casos, dengue com complicações (DCC) e letalidade de 5,7%. O monitoramento de circulação viral detectou a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente, em 11,4%, 25,7% e 62,9% das amostras com isolamento viral (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2009).

No ano de 2009, o estado de Pernambuco notificou 8.191 casos de dengue. Foram confirmados quatro casos de FHD, treze de DCC. Não houve óbitos. Os sorotipos DENV-2 e DENV-3 foram isolados em proporções semelhantes, não tendo sido identificado o predomínio de um sorotipo (BRASIL, 2010a).

Em 2010, Pernambuco notificou 34.590 casos de dengue. Destes, 261 foram de FHD, com 24 óbitos e 868 de DCC. Os sorotipos isolados foram DENV-1 e DENV-2, com predomínio do sorotipo 1. Com a circulação de DENV-2, já vinha sendo observado um aumento na proporção de casos graves, particularmente em crianças e adolescentes. Acredita-se que a recirculação do DENV-1 seja um dos fatores envolvidos no aumento de casos observado em 2010, em virtude da baixa circulação desse sorotipo ao longo dessa década (BRASIL, 2010b).

A evolução da dengue está associada à expansão global na última metade do século XX, devido à distribuição global do vetor antropofílico, *Aedes aegypti*, o aumento do tamanho da população humana, urbanização descontrolada, expansão do comércio e viagens internacionais (CHEN; VASILAKIS, 2011).

A incidência de dengue varia com o período chuvoso e aumento da temperatura. Historicamente, casos de dengue têm sido registrados, predominantemente, nas populações urbanas, onde a alta densidade demográfica e a curta distância para voo do vetor são condições que favorecem a transmissão viral (GUHA-SAPIR; SCHIMMER, 2005; HALSTEAD, 1997). Numerosos fatores têm sido propostos na iniciação e manutenção de uma epidemia: a cepa do vírus, a densidade vetorial, o comportamento e competência da população do mosquito vetor, a susceptibilidade da população humana (fatores genéticos e imunidade pré-existente) e a introdução do vírus dentro de uma comunidade receptiva (MCBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

Tabela 1 - Número de casos notificados de dengue no estado de Pernambuco, sorotipos circulantes e predominantes, por ano, 1995 a 2012.

| Ano | Nº de casos Notificados | Sorotipos Circulantes | Sorotipo Predominante |
|--------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1995 | 9.982 | D1;D2 | D2 |
| 1996 | 22.722 | D1;D2 | D2 |
| 1997 | 32.627 | D1;D2 | D1 |
| 1998 | 52.633 | D1;D2 | D1 |
| 1999 | 35.099 | D1;D2 | D1 |
| 2000 | 27.949 | D1;D2 | D1 |
| 2001 | 17.112 | D1;D2 | D1 |
| 2002 | 116.245 | D1;D2;D3 | D3 |
| 2003 | 26.083 | D1;D2;D3 | D3 |
| 2004 | 6.337 | D3 | D3 |
| 2005 | 12.290 | D1;D3 | D3 |
| 2006 | 18.595 | D2;D3 | D3 |
| 2007 | 22.380 | D1;D2;D3 | D3 |
| 2008 | 41.137 | D1;D2;D3 | D3 |
| 2009 | 8.191 | D2;D3 | D2;D3 |
| 2010 | 34.590 | D1;D2 | D1 |
| 2011 | 12.602 | D1;D2;D3;D4 | D1 |
| 2012* | 27.393 | D1;D2;D3;D4 | D4 |

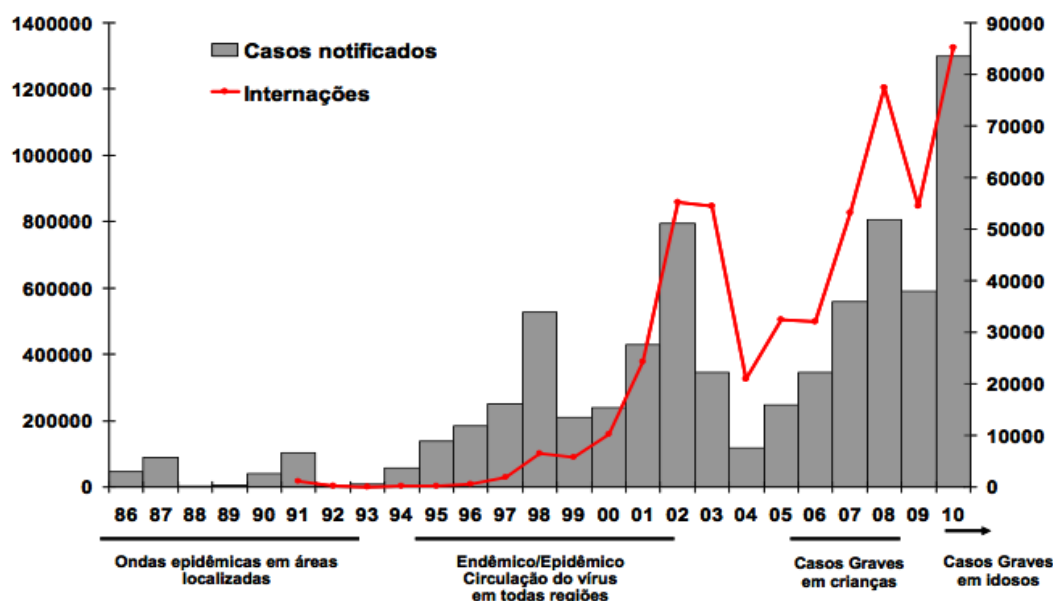
Fonte: SVS/SES-PE (2011).

Nota: SINAN: a partir de 1999. * Janeiro a Abril/2012 (BRASIL, 2012a).

As epidemias de dengue geralmente ocorrem de forma explosiva em localidades onde a população é susceptível ao vírus. Durante essas epidemias são observadas variações na taxa de transmissão, no percentual da população envolvida e na gravidade da doença. A taxa de ataque pode ser alta, de 80 a 90%, porém comumente atinge 40 a 50% da população (HALSTEAD et al., 2001).

Todos os grupos, independentemente de sexo e idade, são atingidos igualmente pela doença. Entretanto, nos países asiáticos, a FHD acomete, preferencialmente, crianças e adolescentes, indivíduos menores de 15 anos (WICHMANN et al., 2004), ao contrário do que se vinha observando no Brasil (CORDEIRO et al., 2007b; SIQUEIRA et al., 2005). Contudo, esse panorama tem mudado no Brasil à medida que a população adulta vai se tornando imune aos sorotipos circulantes (Figura 1).

Figura 1 – Casos notificados e internações por dengue/FHD, no Brasil, 1986-2010.



Fonte: BRASIL (2011b)

1.2 Aspectos clínicos e fisiopatológicos

As fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* são responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode infectar várias pessoas (GUBLER, 1997). O mosquito se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia (até o quinto/sexto dia após a infecção) e pode transmitir a doença para um indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus pelo resto de sua vida (HALSTEAD, 2008).

A dengue pode ocorrer de forma assintomática ou sintomática. Ela se apresenta com uma grande variedade de sintomas, que vão desde a forma leve, a dengue clássica (DC), até a febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue (FHD/SCD) (GUBLER; CLARK, 1995). Manifestações clínicas, não usuais, também têm sido relatadas, como as manifestações neurológicas (SOLOMON et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2002).

A dengue em sua forma clássica é uma doença febril, não fatal, com duração de 5 a 7 dias. O período de incubação do vírus no homem pode variar de 3 a 14 dias, mas usualmente é de 5 a 7 dias (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1995). Os principais sinais e sintomas consistem de febre súbita, dor retro-orbitária associada com o movimento

dos olhos e congestão conjuntival, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, exantema máculo-papular generalizado, prurido, astenia, náuseas, vômitos, dor abdominal, sabor metálico nos alimentos, mudança no estado psicológico, podendo ocorrer depressão pós-doença. Em alguns casos, ocorre um segundo pico de febre que pode durar dois a três dias, desaparecendo em seguida (DIETZ et al., 1990).

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma leve da doença, a dengue clássica que tem uma evolução benigna. Em uma proporção menor dos casos, entre 1 a 2%, a doença apresenta evolução muito mais grave, como a febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue. Esta segunda forma da doença se caracteriza pelo aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas que podem evoluir para insuficiência circulatória e choque hipovolêmico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Normalmente, a FHD tem taxa de mortalidade entre 1 a 10%, requerendo hospitalização e um cuidadoso controle hemodinâmico dos pacientes. Não se conhece, ao certo, os fatores determinantes para a ocorrência da FHD. Contudo, algumas consagradas teorias, baseadas no estudo de diversas epidemias ocorridas no mundo, procuram explicar o fenômeno (HALSTEAD, 1970; ROSEN, 1977).

Existem fortes evidências de que a forma clínica da dengue hemorrágica esteja correlacionada a uma infecção secundária (sequencial), por um sorotipo diferente da infecção anterior. Esta correlação sugere o envolvimento do sistema imune no aumento da gravidade da dengue e patogenia da FHD (HALSTEAD, 1989).

As principais hipóteses de mecanismos imunopatogênicos da FHD estão relacionadas ao fenômeno imunológico conhecido como “pecado antigênico original”. Estas hipóteses se baseiam no fato de que a memória imunológica induzida pela infecção primária do dengue por um sorotipo, não seria capaz de controlar a infecção por outro sorotipo. Isto se deveria à presença de vários epitopos não protetores, reconhecidos pelos linfócitos B e T, que reagiriam de forma cruzada entre os sorotipos. A presença de epitopos similares, porém não idênticos, com afinidades alteradas pelos anticorpos e linfócitos T, seriam os determinantes de uma resposta imunológica anormal e deletéria (HALSTEAD, 1989).

O favorecimento da infecção dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement/ADE*), ou imuno-amplificação da infecção dependente de anticorpos, supõe que anticorpos pré-existentes reagindo cruzadamente não neutralizariam a infecção, mas facilitariam a entrada viral em células que possuem receptores para a porção Fc da molécula de imunoglobulina. Isso pode resultar em um aumento mais rápido na intensidade da carga

viral e uma maior propensão ao desenvolvimento da FHD (HALSTEAD, 1997; ROTHMAN, 2004; STEPHENSON, 2005).

Ainda segundo Halstead (1997), a presença de anticorpos anti-dengue, adquiridos passivamente por anticorpos maternos, IgG heterotípicos, em crianças menores de um ano com infecção primária poderão predispor-las ao processo de imuno-amplificação, aumentando o risco de desenvolver a forma mais grave da doença.

Outros mecanismos imunológicos também têm sido associados à FHD, como o excesso de formação de complexos imunológicos, produção de auto-anticorpos contra proteínas das vias de coagulação e também das células endoteliais (ROTHMAN; ENNIS, 1999).

Segundo Rosen (1977), os fatores de risco para a FHD estão relacionados com a cepa e o sorotipo do vírus envolvido. Estudos apontam fatores que estariam associados a uma maior virulência de determinados genótipos (HOLMES; BURCH, 2000). Além desses, outros fatores poderiam estar envolvidos, como a idade e a predisposição genética do indivíduo (GUBLER; CLARK, 1995; GUZMÁN et al., 2002), doenças crônicas pré-existentes, como asma brônquica, diabetes mellitus, anemia falciforme (BRAVO et al., 1987).

Muito provavelmente, a combinação de vários desses fatores pode estar envolvida, requerendo que todos os aspectos sejam investigados exaustivamente, até que sejam totalmente elucidados.

Qualquer um dos quatro sorotipos pode causar desde a enfermidade febril indiferenciada até as formas mais graves. A infecção causada por um dos quatro sorotipos proporciona ao indivíduo imunidade permanente ao vírus responsável pela infecção, entretanto não lhe confere imunidade cruzada, de modo que as pessoas que vivem em áreas endêmicas, onde circulam todos os sorotipos, poderão ter as quatro infecções durante suas vidas (DIETZ et al., 1990; GUBLER; CLARK, 1995).

Os casos mais graves da dengue, FHD/SCD, são confirmados através de critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que os classifica de acordo com a gravidade em graus I a IV, como descrito a seguir:

Grau I - febre com dois ou mais dos seguintes sinais: dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia e artralgia, prova do laço positiva, contagem de plaquetas inferior a $100.000/\text{mm}^3$ e um aumento de hematócrito, maior ou igual a 20%.

Grau II - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau I, mais sangramentos espontâneos.

Grau III - os mesmos sinais e achados laboratoriais do grau II, mais falhas circulatórias (pulso fraco, hipotensão e agitação).

Grau IV - os mesmos sinais e achados laboratoriais, mais choque profundo com pulso e pressão indetectáveis.

A FHD de grau III e IV é também chamada de Síndrome do Choque de Dengue.

Mudanças na epidemiologia da dengue levaram a problemas com o uso dessa classificação, tais como: dificuldade em aplicar os critérios em situações clínicas e o aumento de casos graves que não preenchiam os critérios para FHD. Diante dessa situação, um grupo de *experts* tem sugerido um novo modelo para classificar a forma clínica da dengue que utiliza critérios para definir casos de dengue e níveis de gravidade: dengue com ou sem sinais de alerta e três graus de dengue grave (1. extravasamento plasmático grave; 2. hemorragia grave; e 3. comprometimento grave de órgãos). Este modelo vem sendo testado em 18 países e tem demonstrado ser de uso prático para a decisão médica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Não existe um tratamento específico para dengue. O tratamento recebido pelos pacientes é de suporte e inclui repouso, hidratação, antipiréticos, analgésicos e antieméticos. Em casos mais graves deve ser adicionada a reposição de fluidos e eletrólitos para correção de fluidos perdidos e acidose (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Os esforços para controlar a dengue dependem, em grande parte, da compreensão da patogenicidade do vírus e sua dinâmica de transmissão. Segundo Halstead (1997), uma das mais prováveis explicações para as diferenças na viremia e expressão clínica da doença, entre surtos, seria a variação de cepas dentro dos sorotipos e a sua introdução na população.

Estudos de campo, aperfeiçoamento no isolamento e identificação do vírus, bem como os avanços na caracterização molecular, têm sugerido que a variação genética entre cepas pode estar relacionada com as diferenças observadas na expressão clínica e nas características epidemiológicas da doença (DEUBEL, 1997; GUBLER, 1997).

Apesar de grandes esforços, o controle ou prevenção da dengue baseado no combate ao mosquito vetor tem se mostrado ineficiente, sendo de difícil sustentação em longo prazo e de custo elevado. A implementação de sistemas eficazes de vigilância e o desenvolvimento de uma vacina efetiva são consideradas ações prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (LIGON, 2004).

A pesquisa e desenvolvimento de uma vacina enfrenta grandes desafios: a existência de quatro sorotipos patogênicos que competem e interagem no nível imunológico e a falta de um modelo animal para dengue. Várias vacinas candidatas estão em desenvolvimento, algumas delas encontram-se na fase de teste clínico e têm demonstrado serem seguras, mas

necessitam ainda demonstrar maior eficácia (GIBBONS; VAUGHN, 2002; HALSTEAD, 2012; SABCHAREON et al., 2012).

Enquanto não houver uma vacina efetiva disponível para a população, o controle efetivo do mosquito, envolvendo a comunidade e a vigilância epidemiológica laboratorial são as melhores estratégias para prevenir epidemias de dengue e reduzir o impacto social de FHD/SCD (DE SIMONE et al., 2004).

1.3 Diagnóstico da Dengue

O diagnóstico da infecção pelo DENV é feito com base em dados clínicos, epidemiológicos e testes laboratoriais para detecção do vírus, de antígeno ou RNA viral e/ou anticorpos específicos. Os métodos usuais para confirmar as infecções por dengue são isolamento viral, transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), detecção de anticorpos (IgM e IgG) anti-dengue e antígeno NS1 por testes imunoenzimáticos (ELISA) (GUZMÁN et al., 2010; GUZMÁN; KOURI, 2004; HANG et al., 2009).

O emprego de técnicas como a RT-PCR e a pesquisa de antígeno NS1, vieram solucionar o problema relacionado ao tempo requerido para a obtenção dos resultados laboratoriais: anticorpos IgM não são geralmente detectados nos primeiros dias da infecção e, para o isolamento viral é necessário mais de uma semana de incubação do vírus e posterior identificação do sorotipo.

1.4 Aspectos moleculares dos vírus dengue

Dengue é um vírus esférico, com um diâmetro de 40 a 50 nm, envelopado, cujo genoma é constituído por um RNA de fita simples e polaridade positiva, de aproximadamente 11kb, flanqueado pela estrutura 5' *cap* tipo I (m7GpppAmp) com cerca de 96 nucleotídeos e uma extremidade 3' terminal não-poliadenilada com aproximadamente 450 nucleotídeos. As estruturas secundárias das regiões 5' *UTR* (*untranslated region*, região não codificadora) e 3' *UTR* estão envolvidas na replicação viral, tradução e empacotamento do genoma do vírus (ALVAREZ et al., 2005; CHAMBERS et al., 1990; HENCHAL; PUTNAK, 1990).

A estrutura secundária da 5' *UTR* consiste de uma haste com uma pequena alça no topo da estrutura e uma ramificação lateral. A conservação dessa estrutura pode estar relacionada à participação e relevância da 5' *UTR* na replicação viral (MARKOFF, 2003).

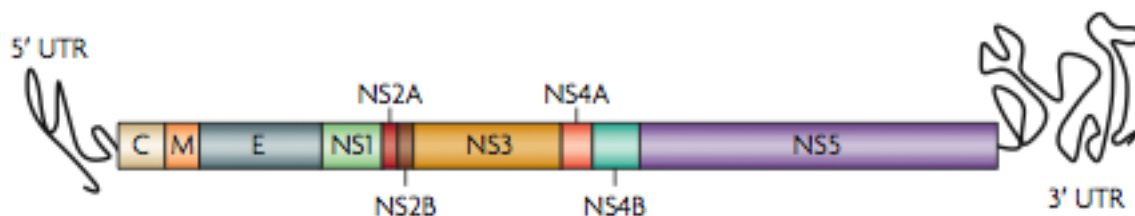
A 3'UTR contém vários elementos conservados, denominados CS1 (*complementary or cyclization sequences*), CS2 e RCS2 (CS2 repetida), bem como uma estrutura conhecida como 3'SL (*stem loop*, haste-alça), que é conservada entre todos os membros da família *Flaviviridae* e crítica para a viabilidade do vírus (MARKOFF, 2003). Tem sido proposto que a 3'UTR forma estruturas secundárias conservadas que interagem com fatores nucleicos ou proteínas virais e/ou do hospedeiro para formar um complexo envolvido na regulação da transcrição e replicação do RNA e que pode também intensificar a eficiência da tradução (ZHOU et al., 2006).

O ciclo de replicação tem início após a entrada dos vírus na célula por endocitose, através da interação da proteína viral do envelope com receptores da membrana plasmática. A síntese de proteínas virais específicas está associada ao retículo endoplasmático rugoso, e a replicação do RNA está localizada na região perinuclear (ALVAREZ et al., 2005; CHAMBERS et al., 1990; HENCHAL; PUTNAK, 1990).

As partículas virais imaturas e partículas subvirais, ambas não infecciosas, são transportadas pela rede trans-Golgi. Partículas virais imaturas são clivadas pela furina protease do hospedeiro, resultando em partículas maduras (infecciosas). Partículas subvirais também são clivadas pela furina e juntamente com as partículas maduras são subsequentemente liberadas por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O genoma viral tem uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), codificando uma longa poliproteína (Figura 2) que, depois de processada, gera três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (ROTHMAN, 2004).

Figura 2 - Organização do genoma do vírus dengue



Fonte: Guzmán et al (2010).

A proteína C contém 112 a 127 aminoácidos e cerca de 13,5 kD. É carregada positivamente devido ao grande número de resíduos de lisina e arginina. Possui um domínio

hidrofóbico que interage com membranas celulares, sendo atribuído à mesma um papel na montagem viral. A proteína C nascente apresenta um domínio hidrofóbico C-terminal que atua como uma sequência sinal transmembrana para a translocação da prM para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Uma clivagem proteolítica específica do precursor glicosilado prM (22 kDa) durante a morfogênese viral leva à formação da proteína M (8kDa), que contém 75 aminoácidos. A clivagem de prM resulta no rearranjo de estruturas oligoméricas na superfície do vírion que promove a infectividade do vírion maduro. Acredita-se que a prM proteja a proteína E da reorganização induzida por pH e fusão prematura durante a secreção, servindo, possivelmente, como uma chaperona para empacotamento apropriado e montagem da proteína E na superfície do vírus (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A proteína E, com 51 a 60 kDa, é a principal proteína estrutural do vírus e contém de 494 a 501 aminoácidos. É responsável por atividades biológicas do ciclo viral, tais como: montagem da partícula viral, interação com receptores celulares e fusão de membrana, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes e possuir atividade hemaglutinante (CHANG, 1997).

Considerando ainda que a superfície viral seja composta principalmente pelas proteínas M e E entrelaçadas, estes antígenos são capazes de induzir resposta por anticorpos neutralizantes. A interação entre C, M e E resulta na própria conformação estrutural do vírus (CHANG, 1997).

A glicoproteína NS1 (46 kDa) é a primeira proteína não estrutural com 353 a 354 aminoácidos, altamente conservada, atuando na fase precoce da infecção viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008). É expressa sob três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático que co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na membrana e uma forma secretada (sNS1) (LINDENBACH; RICE, 2003). Essa forma secretada, assim como a glicoproteína E, é um alvo dominante da imunidade humoral e pode ter papel significativo na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A região codificadora NS2 consiste de duas proteínas, NS2A (22 kDa, com 218 a 231 aminoácidos) e NS2B (14,5 kDa; 130 a 132 aminoácidos). A NS2A é necessária para o correto processamento proteolítico de NS1. Já a proteína NS2B está envolvida na função protease do complexo NS2B-NS3 (CHANG, 1997).

NS3 (70 kDa) é uma proteína com 618 a 623 aminoácidos, altamente conservada entre os flavivírus. Dentre as proteínas não estruturais é a melhor caracterizada. Ela tem sido

implicada na interação com a proteína de ligação do receptor nuclear humano, que modula o tráfego intracelular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi; possui atividade de helicase e de protease. Epítomos de NS3 são comumente encontrados no repertório de linfócitos T citotóxicos específicos contra o vírus dengue (CHANG, 1997; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

As proteínas NS4A (cerca de 16 kDa; 149 a 150 aminoácidos) e NS4B (27 kDa; 248 a 256 aminoácidos) estão implicadas na localização apropriada de proteínas virais e montagem do vírion (LINDENBACH; RICE, 2003). Também tem sido relatada a capacidade de NS4A, juntamente com NS2A, de bloquear a tradução de sinal mediada por interferon (IFN). NS4B é um potente inibidor de sinalização de interferon β (IFN- β) e interferon γ (IFN- γ) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Bartenschlager e Miller (2008) têm sugerido que NS2A, NS4A e NS4B servem para ancorar a replicase viral às membranas celulares.

A proteína NS5 (105 kDa) é a maior entre as proteínas dos *Flavivirus*, com 900 a 905 aminoácidos. Ela serve como RNA polimerase viral RNA-dependente. NS5 também pode induzir a transcrição e tradução de interleucina-8 (IL-8) (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2003).

A sequência de aminoácidos entre as várias proteínas é altamente conservada entre os DENV e estas regiões podem corresponder aos domínios envolvidos em funções biológicas determinantes para o ciclo biológico do vírus. Em contraste, algumas regiões são altamente variáveis, possivelmente refletindo uma rápida evolução, forte seleção imune de epítomos ou mesmo restrições na estrutura secundária do RNA (DEUBEL, 1997).

Considerando-se a proporção relativa de variação de aminoácidos entre os genes na poliproteína do vírus, a ordem é NS2A, C, NS1, NS2B, E, NS4A, NS5, M, NS3, NS4B, partindo-se da mais para a menos variável (HOLMES, 2006).

1.5 Ecologia, evolução e filogenia do vírus dengue

Cada um dos quatro sorotipos do DENV é mantido em dois ciclos de transmissão ecológica e evolucionariamente distintos: o ciclo silvestre, que envolve primatas não humanos e mosquitos *Aedes* arbóreos (oeste da África e Sudeste da Ásia) e o ciclo humano, que envolve o homem e os mosquitos *Aedes aegypti* domésticos e *Aedes albopictus* peridomésticos (ambientes tropicais e subtropicais) (VASILAKIS et al., 2011). Também tem sido sugerida uma transmissão transovariana como mecanismo de manutenção em ambos

ciclos de transmissão, principalmente durante prolongadas estações secas ou períodos interepidêmicos (CHEN; VASILAKIS, 2011).

Os seres humanos têm sido repetidamente expostos ao DENV silvestre, e o processo de transmissão por *cross-species* (mudança de espécie hospedeira) resultou em quatro cadeias de transmissão em humanos, representada pelas linhagens DENV-1 a DENV-4 que circulam hoje (VASILAKIS et al., 2011).

A probabilidade de um vírus mudar de espécie hospedeira é função tanto da proximidade ecológica, como espacial e da relação filogenética entre as espécies doadora e receptora. Um importante componente filogenético para o sucesso da transmissão *cross-species* do DENV silvestre é o fato dele ser intrinsecamente capaz de melhor replicar em células humanas e se disseminar em populações com vírus oriundos de reservatórios de espécies divergentes. A base evolucionária para este efeito é que quanto menos divergências existam entre elementos-chaves da interação vírus-hospedeiro, como receptores celulares que são usados pelos vírus e os componentes virais que são usados contra as defesas do hospedeiro, menos mutações são requeridas para adaptação do vírus ao novo hospedeiro, logo, mais facilmente se dá a mudança para espécies fronteiras (STREICKER et al., 2010).

No caso do DENV o processo de emergência foi facilitado tanto pela mudança de hospedeiro (primatas não humanos para humanos), como pela mudança de vetor (mosquitos *Aedes* arbóreos para mosquitos *Aedes* domésticos e peridomésticos) (CHEN; VASILAKIS, 2011).

É difícil dizer com precisão, quando e onde ocorreu o processo de *cross-species* que levou à emergência da infecção do DENV em humanos. Com base nos dados disponíveis é impossível identificar, conclusivamente, se o DENV se originou na África ou na Ásia. Acredita-se que a chegada do DENV nas Américas, no final do século XVIII, esteja relacionada com o tráfico de escravos, o que se leva a associar que o DENV surgiu nas florestas do Centro e Oeste da África, de onde esses escravos eram oriundos e os primatas não humanos eram abundantes. No entanto, uma origem africana é inconsistente com a distribuição da diversidade no ciclo silvestre e a prevalência da dengue em humanos (VASILAKIS et al., 2011).

As cepas de DENV silvestres e humanas apresentam menos de 20% de divergência ao longo do genoma. As taxas evolucionárias médias entre elas são aproximadamente as mesmas, de $0,5 \times 10^{-3}$ a 1×10^{-3} substituições de nucleotídeos por sítio, por ano. Esses dados levam à medição de uma escala de tempo da evolução em centenas a milhares de anos. Pode-se com isso concluir que, até poucas centenas de anos atrás, dengue era primariamente uma

doença silvestre, causando apenas esporádicas epidemias em humanos e apresentando um padrão semelhante ao padrão atual da febre amarela. No entanto, um completo entendimento da origem e história evolucionária do DENV requer maiores estudos filogenéticos, sobretudo com vírus silvestres, incluindo toda a diversidade de flavivírus (HOLMES; TWIDDY, 2003).

Como na maioria dos arbovírus, a maior parte dos sítios de nucleotídeos no genoma do DENV estão sujeitos à seleção purificadora. Isto reflete na medida do número relativo de substituições não sinônimas (d_N) e sinônimas (d_S) por sítio, com valores médios de $d_N/d_S < 0,1$ ao longo do genoma do DENV (VASILAKIS et al., 2011).

Em relação aos mecanismos de evolução, tal como acontece com outros vírus RNA, o vírus dengue tende a apresentar altas taxas de mutação devido a uma RNA polimerase intrinsecamente suscetível a erros, sendo esta a base fundamental da diversidade genética do DENV. Apesar da abundante variação genética, não se observa a formação de *quasispecies* (mistura de variantes moleculares) (ÃNEZ, 2007).

A migração (fluxo gênico) é outra forma importante de se introduzir diversidade genética em populações virais. Sorotipos e genótipos podem ser introduzidos em amplas áreas geográficas, onde cepas geneticamente distintas já são endêmicas, aumentando enormemente a diversidade genética e levando a maiores variações de aptidão (*fitness*) (CHEN; VASILAKIS, 2011).

A diversidade genética do DENV também é mantida pelo crescente tamanho e densidade da população hospedeiro/vetor, uma vez que possibilitam o aumento da taxa de transmissão e conseqüente população viral e quantidade de replicação (CHEN; VASILAKIS, 2011).

Embora haja controvérsias, é teoricamente possível que ocorra a recombinação como mecanismo evolutivo no DENV, uma vez que o mesmo tem sido demonstrado em outros membros da família *Flaviviridae*. Além disso, existe possibilidade real de recombinação, dada a enorme quantidade de mosquitos e humanos infectados. Apesar disso, não existe nenhuma evidência sólida que possa atribuir a emergência de cepas à recombinação. Isso significa que se a recombinação ocorre, ela geralmente não confere nenhuma vantagem significativa (ÃNEZ, 2007).

A variabilidade genética entre os vírus dengue foi demonstrada por várias metodologias, tais como a análise antigênica através de painel de anticorpos monoclonais (MONATH et al., 1986), hibridização de cDNA-RNA (BLOK, 1985), hibridização utilizando peptídeos sintéticos, análise de fragmentos obtidos com endonucleases de restrição de produtos de RT-PCR (VORNDAM; KUNO; ROSADO, 1994).

Atualmente, a técnica de sequenciamento possibilita uma melhor análise das relações genéticas entre as amostras virais. Investigações realizadas na década de 90 sobre a evolução filogenética dos diversos sorotipos do vírus dengue identificaram subtipos e genótipos, por meio de sequenciamento de fragmentos do RNA viral, demonstrando a evolução molecular ocorrida dentro de um mesmo sorotipo (DEUBEL, 1997). Essas diferenças genotípicas parecem estar associadas com a diferença de virulência (KURANE; TAKASAKI, 2001; PIRES NETO et al., 2005).

Em 1990, Rico-Hesse realizou a análise da variação intra-serotípica do DENV, utilizando um fragmento de 240 bases da região E/NS1 para medir a diversidade genética de DENV-1 e DENV-2, reconhecendo um número de genótipos distintos. Com base nesse estudo, a autora definiu como genótipo um grupo de vírus dengue que tem menos de 6% de divergência dentro de uma determinada região do genoma (RICO-HESSE, 1990). Daí em diante vários estudos têm sido realizados utilizando o comprimento total da proteína E (aproximadamente 1495 pb) como marcador genético (LANCIOTTI et al., 1994; RICO-HESSE, 1997; RICO-HESSE, 1998; GONÇALVES et al., 2002). Com o avanço da tecnologia, o sequenciamento automático permitiu a utilização de genomas completos para obtenção de filogenias mais precisas e robustas (CHEN; VASILAKIS, 2011).

1.5.1 Classificação em genótipos

Não existe uniformidade na classificação dos vírus dengue em grupos genéticos, ou genótipos, como ocorre com a classificação do vírus em sorotipos, apesar de existir uma tentativa de uniformizá-la. A classificação em genótipos pode variar à medida que os métodos de sequenciamento e os tipos de análises sobre a evolução molecular desses vírus se aperfeiçoam, mas a maioria delas leva em conta a origem geográfica dos isolados primários das amostras virais analisadas, ainda que se observe uma tendência em baseá-la em análises filogenéticas mais robustas (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

De acordo com a classificação de Rico-Hesse (2003), os quatro sorotipos do vírus dengue possuem os seguintes genótipos: **Genótipos do DENV-1:** Tailândia; Ásia; Pacífico Sul; Américas/África; Malásia (Silvestre); **Genótipos do DENV-2:** Malásia/Índia Subcontinental; Sudeste da Ásia; Américas; Oeste da África; **Genótipos do DENV-3:** Sudeste da Ásia/Pacífico Sul; Tailândia; Índia Subcontinental; Américas e **Genótipos do DENV-4:** Indonésia; Sudeste da Ásia; Malásia.

Em 2011, Chen e Vasilakis, utilizando sequências da proteína E completa, disponíveis no GenBank, apresentaram a classificação mais utilizada atualmente. Esta classificação considera a área geográfica dos isolados virais e, em alguns casos, também sua implicação com a gravidade da doença:

a) Genótipos do DENV-1:

- Genótipo I: representando cepas do Sudeste da Ásia, China e Oriente Médio (Arábia Saudita);
- Genótipo II: representando duas cepas coletadas na Tailândia durante os anos de 1950 e 1960. Estas cepas não têm sido isoladas desde então, sugerindo sua extinção ou circulação com baixa frequência em nichos ambientais, levando a não detecção pelos sistemas de vigilância;
- Genótipo III (Silvestre?): representando cepas isoladas na Malásia em 1972 e 2005;
- Genótipo IV: representando as cepas do Japão, Coreia, China, Mianmar, Malásia e Indonésia; ilhas do oeste do Pacífico (Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí) e Austrália. As cepas oriundas do Caribe (1975 - 1985) também são incluídas neste genótipo;
- Genótipo V: representando as cepas das Américas, Oeste da África e Ásia. Inclui também as cepas isoladas das Ilhas dos arquipélagos do Oceano Índico (Comorros, La Reunion e Seicheles).

b) Genótipos do DENV-2

- Genótipo asiático I: representando cepas da Tailândia, incluindo uma cepa de referência isolada na Tailândia em 1964 de um paciente com dengue grave; Malásia; Camboja; Mianmar; Vietnã; e Austrália;
- Genótipo asiático II: representando isolados da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México. Este genótipo inclui a cepa protótipo de Nova Guiné, isolada em 1944;
- Genótipo sudeste asiático/americano: representando dois clados. Uma em que todas as cepas foram coletadas no Sudeste da Ásia; e a outra, das amostras coletadas na América Central e América do Sul e Caribe durante os últimos trinta anos;

- Genótipo cosmopolita, previamente denominado genótipo IV: representando cepas distribuídas em uma larga área geográfica, incluindo leste e oeste da África, Oriente Médio, subcontinente indiano, Ilhas do Pacífico e Austrália;
- Genótipo americano, previamente denominado genótipo V: representando as cepas oriundas das Américas Central e do Sul, Caribe e cepas mais antigas coletadas no subcontinente indiano e ilhas do Pacífico;
- Genótipo silvestre: representando cepas de humanos, mosquitos arbóreos e primatas não humanos coletadas no Oeste da África e Sudeste Asiático. Este genótipo é o mais geneticamente distinto e existe como uma linha basal para todas as outras linhagens de DENV-2, o que reforça a hipótese de que ele representa o genótipo ancestral.

c) Genótipos do DENV-3:

- Genótipo I: representando isolados das áreas marítimas do Sudeste da Ásia, principalmente Indonésia, Cingapura, Malásia, Filipinas e Taiwan, e Ilhas do Pacífico Sul;
- Genótipo II: representando quase todas as cepas coletadas na Tailândia de 1962 até recentemente, em várias epidemias; uma única cepa de Cingapura coletada em 1995; um isolado da Indonésia coletado em 1998; Taiwan; Vietnã; Bangladesh; Camboja; China; Japão e Mianmar;
- Genótipo III: representando isolados da Sri Lanka, Índia, Japão, Taiwan, Cingapura, Samoa, leste da África, América Central e do Sul e Caribe;
- Genótipo IV: representando cepas coletadas em Porto Rico (décadas de 60 e 70) e em Tahiti;
- Genótipo V: representando a cepa protótipo (H87-1956) das Filipinas, um isolado do Japão (1973), cepas da China (coletada em 1987 e 2009) e cepas do Brasil (2002-2004). Questiona-se se essas cepas isoladas no Brasil e na China não sejam na realidade um resultado de contaminações laboratoriais, dada a rápida taxa de substituição de nucleotídeos do DENV.

d) Genótipos do DENV-4

- Genótipo I: representando cepas das Filipinas, Tailândia, Vietnã, Mianmar, Malásia, Sri Lanka, Índia e várias amostras de casos importados do Japão, China

- e Brasil. Este genótipo inclui a cepa protótipo (H241) isolada das Filipinas em 1956;
- Genótipo II: representando cepas de todas as partes do Sudeste da Ásia (Indonésia, Malásia, Cingapura), China, Ilhas do oeste do Oceano Pacífico, Austrália, Caribe e Américas;
 - Genótipo III: representado por cinco cepas recentes isoladas na Tailândia entre 1997 e 2001;
 - Genótipo IV: representando as únicas três cepas silvestres conhecidas de DENV-4, isoladas de macacos sentinelas na Malásia durante os anos 70.

Como se pode observar, alguns genótipos têm se tornado mais cosmopolitas que outros por infectar humanos em vários continentes (África, Ásia, Oceania e América Latina), enquanto outros genótipos são mais restritos geograficamente. À medida que mais dados de sequências são incluídos é possível que sejam identificados mais genótipos, ou mesmo que desapareçam (HOLMES, 2006, 2009).

Dada a robustez dos estudos realizados para a classificação sugerida por Chen e Vasilakis (2011), ainda que não utilize o genoma completo, optou-se por utilizar esta classificação no presente estudo.

Epidemiologicamente, os vírus dengue podem ser classificados em baixo, médio ou alto impacto; isto é, alguns vírus podem permanecer num ciclo silvestre de pequena ou baixa transmissibilidade nos seres humanos, outros produzem somente DC e alguns genótipos estão associados ao potencial de causar a FHD/SCD. As análises filogenéticas e epidemiológicas sugerem que os genótipos mais virulentos estão substituindo aqueles de menor impacto epidemiológico (LEITMEYER et al; 1999; RICO-HESSE, 2003).

Em nível local, as análises filogenéticas têm demonstrado um processo contínuo de mudança com o qual linhagens individuais ou *clades* de vírus frequentemente surgem, persistem por um período de tempo, e então desaparecem. Devido a *bottlenecks* regulares no tamanho da população viral, associados com a flutuação sazonal do tamanho e densidade da população do vetor, ocorre uma seleção purificadora que remove todas as cepas virais contendo mutações deletérias. Geralmente, uma *clade* pode desaparecer após circular em uma determinada área por vários anos e ser substituída por uma nova *clade*, às vezes associada a um surto epidêmico (CHEN; VASILAKIS, 2011).

A evolução molecular dos diversos sorotipos tem apresentado um grande impacto na sua virulência para o homem e na epidemiologia da doença em todo o mundo. O

monitoramento do deslocamento dos vírus para diferentes áreas geográficas é um fator importante para o conhecimento epidemiológico da doença. O mapeamento das epidemias constitui outro valioso elemento de investigação, permitindo identificar os caminhos prováveis dos vírus dengue e a sua relação com as diversas epidemias (LANCIOTTI et al., 1994; RICO-HESSE et al., 1997; RICO-HESSE, 2009).

Segundo Rico-Hesse (1990), caracterizar geneticamente, bem como estimar o índice de possíveis mutações ocorridas durante a passagem natural do vírus é muito importante, principalmente quando se estudam amostras de vírus que circularam em uma mesma área geográfica por anos consecutivos.

A caracterização genética das amostras virais associadas às epidemias, bem como a determinação da variabilidade genética e padrões de transmissão destes isolados, são fundamentais para se estabelecer uma eventual associação genótipo/virulência e desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle da doença. (MIAGOSTOVICH et al., 1998, 2002; RICO-HESSE et al., 1997, 1998; SANTOS et al., 2002).

Este estudo surgiu da necessidade de se aprofundar a abordagem molecular apresentada por Cordeiro (2008), em um trabalho desenvolvido no LACEN-PE e no LaViTE-CPqAM, intitulado Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987-2006: Epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes. Em seu trabalho, Cordeiro determinou os genótipos dos sorotipos 1, 2 e 3 isolados em Pernambuco de 1995 a 2006, com base na classificação utilizada por Rico-Hesse (2003). Para tanto, foi utilizado o sequenciamento parcial do genoma viral que permite a identificação dos genótipos. A partir dos resultados obtidos naquele estudo, observou-se a necessidade de se realizar a análise molecular e filogenética do genoma completo dos três sorotipos circulantes até o momento (2010), pois a utilização de genomas completos dá mais consistência aos dados gerados em diferentes análises de construção de árvores filogenéticas, além de permitir a identificação de linhagens e sua evolução, auxiliando no esclarecimento de aspectos epidemiológicos da dengue em Pernambuco.

No presente estudo foi incluída uma etapa de grande relevância, a avaliação da viabilidade das amostras de vírus isolados em anos anteriores e que pertencem à coleção de vírus do LACEN-PE, da Secretaria de Saúde do Estado, possibilitando a formação de uma coleção de vírus caracterizada molecularmente e que ficará disponível para estudos futuros. O mesmo procedimento foi realizado com a coleção de vírus dengue do LaViTE-CPqAM/FIOCRUZ. Estudos de caracterização molecular dos sorotipos de dengue isolados em Pernambuco são extremamente relevantes, não apenas pela determinação dos genótipos

circulantes, mas também pela análise do potencial epidêmico de cada um deles. A caracterização genotípica, a determinação da variabilidade genética e padrões de transmissão são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle da doença.

O conhecimento dos sorotipos e genótipos circulantes do vírus dengue, através da análise do genoma viral inteiro, principalmente em regiões endêmicas, segundo Holmes e Twiddy, (2003), pode ajudar na inferência da procedência dos vírus isolados, sendo possível construir as vias de introdução/deslocamento dos vírus dentro de uma região, assim como conhecer a origem geográfica (procedência) dos mesmos. Esta informação pode se constituir em marcadores epidemiológicos precoces para a tomada de medidas de controle por parte das autoridades competentes, bem como conhecer se os genótipos circulantes se associam ou não a maior risco de desenvolvimento de FHD/SCD em nossa população (ÃNEZ, 2007) e justificaram a realização deste trabalho.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus dengue, circulantes no estado de Pernambuco durante o período de 1995 a 2010, através do sequenciamento e análise de variações do genoma completo do vírus e procurar identificar possíveis mutações que possam estar potencialmente associadas às formas graves da dengue.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Amplificar e sequenciar o genoma completo de vírus dengue sorotipos 1, 2 e 3 isolados em Pernambuco durante o período estudado;
- b) Realizar a análise filogenética dos isolados de vírus dengue com os genomas completamente sequenciados;
- c) Identificar e comparar variações/mutações existentes no genoma que possam estar relacionadas com o aumento da virulência e gravidade da dengue.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fontes de Dados

Este estudo utilizou amostras de epidemias de dengue ocorridas no estado de Pernambuco no período de 1995 a 2010. Como fonte para a informação foram utilizados o Banco de dados de dengue do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE), da Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco e o Banco de dados do LAVITE-CPqAM (2002-2008). A análise molecular dos sorotipos DENV-1,-2 e -3 isolados em cada uma destas epidemias é o componente de natureza laboratorial do estudo e considera a epidemiologia molecular dos vírus dengue. Foram feitas as análises dos genomas virais utilizando-se reações de sequenciamento de amostras de vírus isolados de casos de FHD, DCC e DC provenientes da Coleção de vírus do LACEN-PE e da Coleção do LAVITE-CPqAM.

3.2 Tamanho da Amostra

Neste estudo foi testada a viabilidade de 100 isolados primários provenientes da Coleção de vírus dengue do LACEN-PE e da Coleção do LAVITE-CPqAM, selecionados ao acaso. Destes, um total de 48 isolados foi utilizado para o sequenciamento do genoma completo do vírus, assim distribuídos: 15 de DENV-1, 13 de DENV-2 e 20 de DENV-3. A descrição detalhada destas amostras encontra-se na seção de resultados, e os respectivos números de acesso no *GenBank* (BENSON et al., 2013).

3.3 Espécimes biológicos para análise

Amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de dengue atendidos na rede pública de saúde enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE), acompanhadas da ficha de investigação epidemiológica, foram submetidas aos testes laboratoriais específicos para dengue. As amostras da fase aguda, coletadas até o quinto dia após o início dos sintomas, foram utilizadas para isolamento de vírus e/ou para a técnica da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os vírus isolados em cultivo celular e estocados a -80 °C, foram analisados através de sequenciamento.

Foram utilizadas no sequenciamento amostras de vírus dengue isolados no período de 1995 a 2010 pertencente à coleção de vírus do LACEN-PE, assim como amostras de isolados primários da coleção de vírus dengue do LaVITE-CPqAM isolados no período de 2002 a 2006.

3.4 Isolamento de vírus

Para o isolamento dos vírus utilizou-se a linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36 (IGARASHI, 1978), mantida em meio Leibovitz L15 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com de solução de Aminoácidos Não Essenciais 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA), de Triptose Phosphate Broth (TPB) 1% e de soro fetal bovino (SFB) 10% (GIBCO, Invitrogen Co., Grand Island, New York) para o meio de crescimento e com SFB 2% para o meio de manutenção. A identificação dos vírus isolados foi realizada através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para DENV-1, -2, -3 e -4 (HENCHAL, et al., 1982). Após o isolamento e identificação, as suspensões virais foram estocadas a -80 °C, constituindo a coleção de vírus dengue, que foi utilizada nos estudos moleculares.

3.5 Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico e identificação do sorotipo viral foram realizadas a extração de RNA de soro sanguíneo e a reação em cadeia de polimerase, antecedida por transcrição reversa.

3.5.1 Extração de RNA de soro sanguíneo

A extração do RNA viral das amostras de soro foi realizada utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, 140 µl de soro de paciente infectado com dengue foi tratado sob condições de desnaturação para inativar RNases e assegurar o isolamento de RNA viral intacto e em seguida carregado em coluna de purificação. Após a ligação do RNA à membrana de sílica-gel, os contaminantes foram removidos através de duas lavagens por dois tampões de lavagem diferentes. O RNA foi eluído da coluna com uma solução aquosa livre de RNase, para posterior armazenagem a -80 °C, até o momento do uso.

3.5.2 Identificação do sorotipo viral por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para a detecção do RNA viral e identificação do sorotipo viral através da RT-PCR foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992). Nesta técnica foram utilizados *primers* universais do vírus dengue, localizados nos genes C e prM. Este fragmento está flanqueado por uma sequência conservada entre todos os sorotipos do DENV permitindo a amplificação genômica. O sorotipo foi então identificado mediante o uso de *primers* sorotipo-específicos em um *semi-nested* PCR em uma segunda rodada de amplificação. Ao final, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%, através da digitalização das imagens.

3.6 Sequenciamento genético dos isolados virais

Para o sequenciamento genético dos isolados virais as amostras selecionadas foram passadas mais uma vez em células C6/36; o sobrenadante da suspensão de células contendo os vírus foram submetidos à extração de RNA e amplificação do genoma viral por RT-PCR, conforme abaixo descritos.

3.6.1 Passagem dos vírus em células C6/36 e extração de RNA do sobrenadante da suspensão de células

Foram utilizados tubos contendo células C6/36 (300.000 células/ml) crescidas em monocamadas para a passagem dos vírus isolados. Antes da inoculação, o meio foi removido e 100 µl do inóculo viral foram adicionados às células. Após um período de adsorção de 1 hora, o meio das células foi repostado - Leibovitz L15 com SFB 2% e solução de antibióticos 1%: penicilina e estreptomicina (Invitrogen, Carlslab, CA). As células foram incubadas à 28°C por sete a 10 dias. Após esse período foi realizada a extração do RNA viral a partir do sobrenadante da suspensão de células C6/36 infectadas utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, EUA). Alíquotas de vírus foram congeladas a -80 °C.

3.6.2 Amplificação do genoma viral por RT-PCR para sequenciamento

O genoma completo do vírus (~10,7 kb) foi amplificado através da síntese de quatro a

seis fragmentos de RT-PCR, com regiões terminais sobrepostas de aproximadamente 100 pares de base (pb). Estes fragmentos foram de aproximadamente 1,5-2,5 kb cada e compreendem o genoma completo do DENV. A amplificação do genoma do vírus por RT-PCR foi realizada em duas etapas, com as reações da transcrição reversa e da PCR realizadas individualmente. Para a transcrição reversa foram utilizados a enzima Superscript III reverse transcriptase 200U/ μ l (Invitrogen Carlslab, CA), *primers* específicos e inibidor de RNase - RNase OUT 40 U/ μ l (Invitrogen Carlslab, CA), seguindo as recomendações do protocolo estabelecido pelo fabricante dos reagentes, tendo como volume final de reação 20 μ l.

Na PCR foram utilizados os seguintes reagentes: 10X do tampão de PCR (Clontech Lab, Inc., Mountain View, CA), DMSO (Dimetilsulfóxido) 10%, betaine (Sigma) 5 M, 200 μ M de cada dNTP, 1U de KlenTaq-LA polymerase (Clontech Lab, Inc., Mountain View, CA), 20 pmol de *primers* específicos e 5 μ l de cDNA produzido na transcrição reversa, ou o kit HotStar HiFidelity PCR (Qiagen, Inc., Valencia, CA). As condições de PCR foram: 5 minutos a 95 °C para desnaturações iniciais, seguidas de 32 ciclos, cada ciclo composto de 1 minuto de desnaturação a 93 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C, 1 minuto de extensão para cada 1000 pb a 72 °C e 10 minutos finais de extensão a 72 °C. Estas condições foram ajustadas de acordo com os reagentes e *primers* utilizados.

Os *primers* foram delineados a partir de sequências conservadas do vírus. Em resumo, foram realizados alinhamentos de diversas sequências virais disponibilizadas no *GenBank* para cada sorotipo do DENV em estudo, utilizando-se o programa Megalign (DNASStar Inc.). Os iniciadores (*primers*) foram delineados utilizando-se o *Primer-BLAST* (YE et al., 2012) e o Programa Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), de forma que apresentassem uma temperatura de desnaturação em torno de 60 °C e estão relacionados nos Quadros 1, 2 e 3, para DENV-1, DENV-2 e DENV-3, respectivamente.

Após amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma Chemical Co, St Louis). Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se o kit "PCR Purification" (Qiagen, Inc., Valencia, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida o cDNA de cada amostra foi quantificado para determinação da concentração a ser usada na reação de sequenciamento, sendo ajustada de acordo com o tamanho do amplicon a ser sequenciado, conforme recomendado pelo fabricante do sequenciador.

Quadro 1 – Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-1

| Nome do Primer | Sequencia (5'-3') | Posição no Genoma |
|----------------|-------------------------------|-------------------|
| DENV1-1F | AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAG | 1 a 27 |
| DENV1-166R | ACGGTCGACCCGTCTTTTCCG | 144 - 166 |
| DENV1-610F | GGCGGAACCAGATGACGTTG | 610 - 630 |
| DENV1-712R | GGAACGTTTGTCTCGTCGGT | 691 - 712 |
| DENV1-1152F | GATGTCCAACACAAGGAGAGGC | 1152 - 1174 |
| DENV1-1240R | ACCCAGCCTCTGTCCAC | 1222 - 1240 |
| DENV1-1650F | CATTCAAGACAGCTCATGCAAAG | 1650 - 1673 |
| DENV1-1887R | CCATGCTGGGTCTCAGCCACTTC | 1864 - 1887 |
| DENV1-2292F | GGACCATGAAAATAGGAAT AGGG | 2292 - 2315 |
| DENV1-2515R | GTATTGCTCTGTCCAAGTGTG | 2494 - 2515 |
| DENV1-3010F | CATGGGGTACTGGATAGAAAG | 3010 - 3031 |
| DENV1-3181R | GTGCTGAGATATTGGTCCTCC | 3160 - 3181 |
| DENV1-3470F | TCTGCAGGGTCAGGAGAAGT | 3470 - 3490 |
| DENV1-3572F | ATGACTGGAACACTGGCTGTTTCC | 3572 - 3597 |
| DENV1-3640R | CCTAATCAGATCATTCCATGTCAG | 3616 - 3640 |
| DENV1-3986R | CCATAGCCGTTGTCTTCCAT | 3966 - 3986 |
| DENV1-4130F | AGTTGGCCCCTCAATGAAGG | 4130 - 4150 |
| DENV1-4332R | GAGTGTTCTGCTTCTTCTTCCC | 4310 - 4332 |
| DENV1-4650F | GCGTGTTCCACACAATGTGG | 4650 - 4670 |
| DENV1-4794R | CCCGTGTTCCATGATCCTTG | 4774 - 4794 |
| DENV1-5370F | CGGGTTGAGATGTACCCTCTGG | 5370 - 5392 |
| DENV1-5430R | TGGATGAAGCACATTTTACCGATCC | 5405 - 5430 |
| DENV1-5855F | GGACCGATGCCAGTACTGTG | 5855 - 5846 |
| DENV1-6010R | GTCAAGGAGCATTTTTGCTTC | 5989 - 6010 |
| DENV1-6515F | GAACTACCAGACCCATAGAAAC | 6515 - 6538 |
| DENV1-6825R | CACTGTCAGTATCATGAATAAC | 6803 - 6825 |
| DENV1-7281F | TTGCAATAGACTTGGATCCTGTGG | 7281 - 7305 |
| DENV1-7355R | GTATCAGTAACATTATTTGGCCTAGCTG | 7327 - 7355 |
| DENV1-7920F | TGGCGACCTATGGATGGAACC | 7920 - 7941 |
| DENV1-8160R | ATTTGCTCCAGAGTTTCTACCAC | 8137 - 8160 |
| DENV1-8780F | AGGTCAAACGCAGCAATAGGAG | 8780 - 8802 |
| DENV1-9100R | TTCTCCTTCCACTCCACTGAGTG | 9077 - 9100 |
| DENV1-9428F | ATAAGACAAATGGAGTCTGAAG | 9428 - 9450 |
| DENV1-9770R | GTTTCATCTTGGTTGCGGCATGGC | 9747 - 9770 |
| DENV1-10215F | ACATGACATCAATGAAGAGATTCAAG | 10215 - 10241 |
| DENV1-10410R | CTTTCGGCCTGACTTCATTTTAC | 10387 - 10410 |
| DENV1-10735R | AGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCC | 10707 - 10735 |

Fonte: Gil (2009).

Quadro 2 - Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-2 (Continua)

| Nome do Primer | Sequência (5'-3') | Posição no Genoma |
|----------------|-------------------------------|-------------------|
| DENV2-1F | AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGAC | 1 a 24 |
| DENV2-128R | CACGCGGTTTCTCTCGCGT | 109 - 128 |
| DENV2-190-R | CAGCATTCCAAGTGAGAATCT | 169 - 190 |
| DENV2-210-F | GCCCTTGTGGCGTTCCTT | 210 - 228 |
| DENV2-459F | GGAGAACCACACATGATCG | 459 - 478 |
| DENV2-558F | CCTTGGTGAATTGTGTGAAGA | 558 - 579 |
| DENV2-620R | GGTTCATTTTGCCTGAGGAG | 600 - 620 |
| DENV2-1000F | GACATAGTCTTAGAACATGGAAG | 1000 - 1023 |
| DENV2-1163F | CACAAGGGGAACCCAGTCTA | 1163 - 1183 |
| DENV2-1240R | CCCATCCTCTGTCTACCATGG | 1219 - 1240 |
| DENV2-1810F | CTACAGCTCAAAGGAATGTCAT | 1810 - 1832 |
| DENV2-1910F | AATATGAAGGGGACGGCTCT | 1910 - 1930 |
| DENV2-2045R | TCTGCTTCTATGTTGACTGGG | 2024 - 2045 |
| DENV2-2170F | ATGGCCATTTTAGGTGACACAGCCTGGGA | 2170 - 2199 |
| DENV2-2578R | TTACTGAGCGGATTCCACAGATGCC | 2553 - 2578 |
| DENV2-2615F | ATCTGATGTGGAAACAAATAACACC | 2615 - 2640 |
| DENV2-2706F | AATCATGCAGGCAGGAAAAC | 2706 - 2726 |
| DENV2-2850R | GCATTCTGCTGTTTCYGGGCC | 2829 - 2850 |
| DENV2-3232R | CTAGATGCCAAGGTCCTGTCT | 3212 - 3232 |
| DENV2-3501F | TCACTAGGAGTCTTGGAATGGC | 3501 - 3524 |
| DENV2-3570R | CATGTTTCGTTCCACTCGGGTCC | 3546 - 3570 |
| DENV2-3739F | GCAGCTGGACTACTCTTGAG | 3739 - 3759 |
| DENV2-4094R | ATGGCTGTTGGATTGAGACC | 4074 - 4094 |
| DENV2-4405F | GAACAAACACTGACCATAC | 4405 - 4424 |
| DENV2-4595R | ATTCTATAGGCTCCATCTTCC | 4574 - 4595 |
| DENV2-4893F | GCCGTATCTCTGGACTTTTC | 4893 - 4913 |
| DENV2-5020R | GGGCTATAGCACTCACATATG | 4999 - 5020 |
| DENV2-5491F | CATTTCCCTCAGAGCAATGCACCAATC | 5491 - 5517 |
| DENV2-5559R | TCCGTGACCCATTCATGTCC | 5539 - 5559 |
| DENV2-5930F | ACCAGTACATATACATGGGGG | 5930 - 5951 |
| DENV2-6061R | CACGCTCTGGTTCGAAC | 6044 - 6061 |
| DENV2-6505F | GCTCTCAGTGAAGTCCGGAGAC | 6505 - 6528 |
| DENV2-6710R | TCCAGTATTATTGAAGCTGCTATC | 6686 - 6710 |
| DENV2-7190F | GCCAGGACTTCAAGCAAAAGC | 7190 - 7211 |
| DENV2-7369R | AATACTTGAGTCACGCAGAGG | 7348 - 7369 |
| DENV2-7825F | GGCTGGTCATACTATTGTGG | 7825 - 7845 |

Quadro 2 - Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-2 (Conclusão)

| Nome do Primer | Sequência (5'-3') | Posição no Genoma |
|----------------|--------------------------|-------------------|
| DENV2-8081R | GACTCCCCTATGTCACACAAC | 8060 – 8081 |
| DENV2-8450F | ATGACCAAGACCACCCATAC | 8450 - 8470 |
| DENV2-8661R | GGTTCTTGGGTTCTCGTGTCC | 8640 - 8661 |
| DENV2-9180F | ATGGGACACAAGAATCACACTAG | 9180 - 9203 |
| DENV2-9450R | TCCTTCTCCCTCCATCTGTC | 9430 - 9450 |
| DENV2-9835F | AAGTCTTACGCCCAAATGTGG | 9835 - 9856 |
| DENV2-10100R | TCTTCTCTTTTCCCAAGTATGGG | 10076 - 10100 |
| DENV2-10415F | GCAGCCTGTAGCTCCACC | 10415 - 10433 |
| DENV2-10722R | AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC | 10698 - 10722 |

Fonte: Gil (2009).

Quadro 3 - Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-3 (Continua)

| Nome do Primer | Sequência (5'-3') | Posição no Genoma |
|----------------|---|-------------------|
| DENV3-1F | AGTTGTTAGTCTACGTGGACCG | 1 - 22 |
| DENV3-82F | ACCGCCTAGGGCCACCATGGACAACCAACGGAAGAAGA | 82 - 120 |
| DENV3-175R | GGATCCAGTTGACACACGGT | 155 - 175 |
| DENV3-369-F | ACCGCCTAGGGCCACCATGGTGAGCATAATCAACAAACG | 369 - 408 |
| DENV3-601F | CATTACCGAAGTGGAACCTGAA | 601 - 623 |
| DENV3-720R | AACGCCACTGATCTCTTGTCGC | 698 - 720 |
| DENV3-CP788 | TCCAAGCTCCTTCAGATGACATCCA | 763 - 788 |
| DENV3-P992 | TGGGTTGACGTGCTCGAGCACGG | 992 - 969 |
| DENV3-1141F | AACTGACTCAAGATGTCCTACC | 1141 - 1163 |
| DENV3-1320R | ACTTTTCCCTCTATTGGTTCCA | 1298 - 1320 |
| DENV3-1681F | TGTCCTTGGATCGCAAGAGGGA | 1681 - 1703 |
| DENV3-1860R | TCTTTCTTCAACACAAAGGTATTC | 1836 - 1860 |
| DENV3-2000F | GTGACTAAGAAGGAGGAGCCTG | 2000 - 2022 |
| DENV3-2284R | ACCGGAATTCTCAAGAGACTCCACTGAATAGGGC | 2250 - 2284 |
| DENV3-2341F | AAACACATCCATGTCATTTTCAT | 2341 - 2364 |
| DENV3-2350R | GGATGTGTTTTTTGAATTCAACCCTATCCAAGTCAAGAGAACTCC | 2305 - 2350 |
| DENV3-2402F | GTGGTGCAAGCTGACATGGGATGTGTTATAAACTGGAAAGG | 2402 - 2443 |
| DENV3-2442R | CCTTCCAGTTTATAACACATCCCATGTCAGCTTGCACCAC | 2401 - 2442 |
| DENV3-2520R | GCTTGGAATTTGTATTGCTCTGT | 2497 - 2520 |
| DENV3-2601F | TGGAGAATCTCTTGTGGAAGC | 2601 - 2622 |
| DENV3-3040F | TTGGAAGCTAGAAAAAGCATC | 3040 - 3061 |
| DENV3-3136F | GATCATCCCAAAGAGTCTAGCTGG | 3136 - 3160 |

Quadro 3 - Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-3 (Continuação)

| Nome do Primer | Sequência (5'-3') | Posição no Genoma |
|-----------------------|---|--------------------------|
| DENV3-3160F | CATCCCAAAGAGTCTAGCTGGT | 3160 - 3182 |
| DENV3-3176R | TGTGTTGCGAAATAGGACCA | 3146 - 3176 |
| DENV3-3455R | ACCGAATTCTCACGCTGAGACTAAAGACTTTAC | 3421 - 3455 |
| DENV3-3481F | GGTGGACAAC TTCACAATGG | 3481 - 3501 |
| DENV3-3521R | GGATTGCCAAACACAAGACAC | 3500 - 3521 |
| DENV3-3700F | AATTGCAACATTTAAAATCCAGCC | 3700 - 3724 |
| DENV3-3840R | GCCATTTGTTCAATGTCCTCTCTG | 3816 - 3840 |
| DENV3-4370F | ACAATGAGAAGAAAAGATGATGAGA | 4370 - 4395 |
| DENV3-4512F | ACCGCTCGAGGCCACCATGGCCGGCGTTCTATGGGACGT | 4512 - 4551 |
| DENV3-4570R | TTCCAGTTCTGCTTTCTGTGTC | 4548 - 4570 |
| DENV3-5101F | TGGGTCAGGAAAGACACGGAAA | 5101 - 5123 |
| DENV3-5280R | TCTCTTCCTGTGTT CAGATTT | 5259 - 5280 |
| DENV3-5317F | GCGTCTGCTGTCACCAGTTA | 5317 - 5337 |
| DENV3-5732R | CCACGAAGTCCCAATCATT C | 5712 - 5732 |
| DENV3-5821F | AGATGGACCAGAGCGGGTGATC | 5821 - 5843 |
| DENV3-6000R | AGCAGCATTTTTGCTTCTGTCC | 5978 - 6000 |
| DENV3-6333F | CACTCAAGGAATTCAAGGACTTTGCGGCTGGCAGAAAGT CAATCGC | 6333 - 6379 |
| DENV3-6378R | GCGATTGACTTTCTGCCAGCCGCAAAGTCCTTGAATTCCCT TGAGTG | 6332 - 6378 |
| DENV3-6521F | ACAATGGAAACACTCCTACTCT | 6521 - 6543 |
| DENV3-6700R | GACTATAGCCGACGCGATCCAT | 6678 - 6700 |
| DENV3-7021F | TATAGCCAACCAGGCAGTGG | 7021 - 7041 |
| DENV3-7061R | CTTTGTCCAACCCATCAGGA | 7040 - 7061 |
| DENV3-7184F | GGTCCAGGATTGCAGGCAAAAGCCACTCGTGAAGCTCAG | 7184 - 7223 |
| DENV3-7222R | CTGAGCTTCACGAGTGGCTTTTGCCTGCAATCCTGGACC | 7183 - 7222 |
| DENV3-7261F | GGATGGGATAATGACAATAGAC | 7261 - 7283 |
| DENV3-7372F | GAGAACATCATGGGCCTTGT | 7372 - 7392 |
| DENV3-7440R | CCTTCCCAGAGTGTTGTTATTG | 7418 - 7440 |
| DENV3-7550F | ACCGGTCGACGCCACCATGGGAACAGGCTCACAAGGTGA | 7550 - 7589 |
| DENV3-7889R | CTGGACCGCCTTTTGTGTAT | 7869 - 7889 |
| DENV3-7990F | CCTGTTGTGACATTGGAGAA | 7990 - 8010 |
| DENV3-8020F | AAGCCCAACAGTGGAAGAAA | 8020 - 8040 |
| DENV3-8170R | TCCTCCATGTTTCCTTTGTAGTC | 8148 - 8170 |
| DENV3-8701F | GCTCTGGAGAACCCTGGGAAGG | 8701 - 8723 |
| DENV3-8880R | TCACGTTCTCTGTCCACAAGTT | 8858 - 8880 |
| DENV3-9174F | GGGACACAAGAATAACAGAAGATGACCTGCACAATG | 9174 - 9210 |

Quadro 3 - Iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR do genoma completo dos isolados de DENV-3 (Conclusão)

| Nome do Primer | Sequência (5'-3') | Posição no Genoma |
|----------------|---|-------------------|
| DENV3-9199R | GTCATCTTCTGTTATTCTTGTGTCCCAACCAGCTGTGTC | 9160 - 9199 |
| DENV3-9506F | GAAACCAAAGGAGTGGAGAGG | 9506 - 9527 |
| DENV3-9660R | CCCTTTGATGGCTGCCATTGAG | 9638 - 9660 |
| DENV3-9685F | ACCCAGTGGACTGGTACTGC | 9685 - 9705 |
| DENV3-10064R | CCCAGGTTGTGACTGGAGTT | 10044 - 10064 |
| DENV3-10250F | GAGGGAGCCATTTGGTAAACG | 10250 - 10271 |
| DENV3-10251R | ACCGGAATTCTCACCAAATGGCTCCCTCCGACT | 10218 - 10251 |
| DENV3-10440R | CAGGTTTTACGTCCCCACGACG | 10418 - 10440 |
| DENV3-10505F | CCCATGACACAACGCAGCAG | 10505 - 10525 |
| DENV3-10707R | AGAACCTGTTGATTCAACAGCACCATT | 10680 - 10707 |

Fonte: Gil (2009).

3.6.3 Reação de Sequenciamento

Para as reações de sequenciamento foi utilizada a estratégia de *Primer Walking*. Fez-se uso do kit “The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA), e as condições de polimerização foram realizadas em placas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram sequenciadas no Sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA), disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, para posterior montagem e análise das sequências no programa LaserGene (DNAS^tar).

3.7 Análise das sequências obtidas

Os resultados provenientes do sequenciamento viral foram introduzidos no pacote de programas do DNASTAR (SeqMan 5.07), no qual as sequências foram montadas. Em seguida, essas sequências foram alinhadas, de acordo com o tipo de vírus, utilizando-se o programa Clustal W, incluído no programa Mega 5.1 (TAMURA et al., 2011).

Para o estudo filogenético, as sequências foram comparadas com outras sequências obtidas em estudos prévios depositadas no *GenBank* (NCBI). Linhagens de DENV, previamente utilizadas em estudos filogenéticos e depositadas no banco de dados foram selecionadas para determinar o grau de parentesco de nossas amostras. Apenas sequências de

genomas completos com local e data de isolamento foram incluídas. Filogenias foram estimadas com *Bootstrap* de 1000 pseudoréplicas através de máxima verossimilhança (ML), baseada no modelo GTR - *General Time-Reversible* - (LANAVE et al., 1984), com uma distribuição gama discreta, definido pelo programa “ModelTest” (MEGA 5.1).

Os alinhamentos múltiplos também foram utilizados para estimar o número de mutações encontradas entre os sorotipos virais e a busca de correlação dos tipos de mutação com a forma da doença.

A matriz de identidade para cada sorotipo foi obtida através do programa BioEdit 7.0.8.0 (HALL, 1999).

A predição das estruturas secundárias de 5'UTR e 3'UTR foram geradas pelo programa MFOLD (ZUKER, 1989; 2003).

O teste D de Tajima (MEGA 5.1) foi realizado visando provar a hipótese nula da evolução neutra, baseado na distribuição dos polimorfismos, índices de diversidade, incluindo número de sítios variáveis (K), número de sítios informativos de parcimônia e a média de diversidade do teste pareado da diversidade nucleotídica (π).

O padrão e razão de substituição foram estimados através do modelo (+G) Jones-Taylor-Thornton (1992). A taxa média de substituições não-sinônimas (d_N) para sinônimas (d_S) consistiu em um indicador de pressão seletiva ao nível proteico: seleção positiva (>1), seleção purificadora (<1) e variação neutra (~ 1).

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo utilizou dados secundários obtidos a partir dos resultados dos testes diagnósticos para dengue e das respectivas fichas de investigação epidemiológica, onde as informações são referentes aos conhecimentos indispensáveis para a análise de cada caso e realização dos testes laboratoriais, não havendo obrigatoriedade do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Não houve nova coleta de amostras de sangue. As amostras de vírus isolados provieram da demanda espontânea do LACEN-PE que foram estocadas após os testes diagnósticos. Salientamos ainda, que o LACEN-PE recebe as amostras de sangue e/ou soro dos pacientes dos vários municípios do estado, já coletadas, para análise e confirmação diagnóstica como exigência de um laboratório de saúde pública e que, portanto, não se faz uso de TCLE. A direção do LACEN-PE tomou conhecimento do projeto e autorizou o uso dos isolados virais e respectivos dados (Anexo A).

Foram também utilizadas amostras virais isoladas de pacientes da coorte clínica de dengue, projeto desenvolvido no LaViTE/CPqAM, sob a coordenação do Dr. Ernesto Marques, também aprovado pela CONEP sob o número 4909 (Anexo B), cujos isolados formaram a Coleção de Vírus do CPqAM. Esta coleção tem como finalidade estocar e fornecer amostras virais para o desenvolvimento de pesquisas no país e conta com a Dra. Marli Tenório como curadora, a qual autorizou o uso destas amostras (ANEXO C).

O presente trabalho teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, em 25/02/2010, Registro 78/09, CAAE 0081.0.095.000-09, de acordo com a Resolução CNS 196/96 (Anexo D).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados do sequenciamento, caracterização molecular e genotípica dos sorotipos 1, 2 e 3 obtidos no presente estudo estão apresentados nos itens a seguir:

5.1 Seleção de amostras para amplificação e sequenciamento

As amostras utilizadas neste estudo são provenientes das coleções de vírus do LACEN-PE e do LAVITE-CPqAM-PE. Foram utilizados vírus isolados durante o período de tempo proposto (1995 a 2010), selecionados ao acaso.

Inicialmente, foi testada a viabilidade de 100 isolados primários. A estratégia de amplificação utilizada foi de quatro fragmentos, de modo a cobrir todo o genoma. Alguns isolados apresentaram dificuldade de amplificação por PCR para sequenciamento do genoma completo, desses subdividiu-se o genoma em cinco ou seis fragmentos. Entretanto, alguns isolados foram descartados do estudo por não possibilitarem amplificação completa e/ou apresentarem uma concentração de cDNA inadequada para o processo de sequenciamento. Esta fase constituiu-se a mais demorada e trabalhosa deste estudo.

5.2 Análise de DENV-1

Quinze isolados primários de DENV-1 tiveram seus genomas amplificados completamente e sequenciados, representando amostras de 1996 a 2010 (Tabela 2). Em cada sequência, um total de 10720 nucleotídeos foram analisados e a fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) foi localizada nas posições 95 a 10264, resultando em 3390 aminoácidos.

Com base nos alinhamentos obtidos, foi realizada a análise filogenética, análise de identidade, pressão de seleção e predição de estruturas secundárias da porção 3'UTR.

Tabela 2 - Amostras de DENV-1 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo

| Nome da Amostra | Ano de Isolamento | Localização Município | No. de acesso GenBank |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 21814/BR-PE/96 | 1996 | Caruaru | JX669467 |
| 40604/BR-PE/97 | 1997 | Maraial | JX669468 |
| 41111/BR-PE/97 | 1997 | Recife | JX669469 |
| 52082/BR-PE/98 | 1998 | Lagoa do Carro | JX669470 |
| 59049/BR-PE/99 | 1999 | Serra Talhada | JX669471 |
| 70523/BR-PE/00 | 2000 | Caetés | JX669472 |
| 74488/BR-PE/01 | 2001 | Cedro | JX669473 |
| 75861/BR-PE/01 | 2001 | Salgueiro | JX669474 |
| 88463/BR-PE/02 | 2002 | Garanhuns | JX669475 |
| 9808/BR-PE/10 | 2010 | Santa Cruz | JX669461 |
| 12898/BR-PE/10 | 2010 | Maraial | JX669462 |
| 13501/BR-PE/10 | 2010 | São Caetano | JX669463 |
| 13671/BR-PE/10 | 2010 | Exú | JX669464 |
| 13861/BR-PE/10 | 2010 | Afogados da Ingazeira | JX669465 |
| 14985/BR-PE/10 | 2010 | Jatobá | JX669466 |

Fonte: Da autora

5.2.1 Análise Filogenética de DENV-1

A árvore filogenética foi construída através de máxima verossimilhança, utilizando-se o modelo GTR+G, escolhido com a utilização do Modeltest (Mega 5.1). Para fins de comparação, foram incluídas 68 sequências de genomas completos disponíveis no GenBank, representando os genótipos circulando mundialmente. Apenas o genótipo II (cepas isoladas na Tailândia em 1963) não foi representado, uma vez que apenas sequências baseadas no gene E estavam disponíveis.

A análise filogenética de DENV-1 demonstrou que o genótipo V foi o único genótipo a circular no estado de Pernambuco no período de 1996 a 2010.

Foi observada a circulação de três linhagens diferentes (Figura 3). A linhagem I, que apresentou-se dividida em duas sub-clados e circulou de 1996 a 2002, possivelmente se originou a partir da cepa BR/90 (número de acesso no GenBank: AF226685), oriunda do Rio de Janeiro. As demais linhagens observadas circularam em 2010: a linhagem II, originada a partir da Colômbia e Venezuela, ou seja, da América Latina; e a linhagem III, provavelmente oriunda das Ilhas Virgens, isolada em 1985 ((número de acesso no GenBank: CQ868601), mas também relacionada com uma cepa de Cingapura isolada em 1990 (número de acesso no GenBank: M87512), sugerindo possível origem a partir do Caribe e/ou da Ásia.

5.2.2 Análise das sequências de DENV-1

A média da identidade entre as cepas de DENV-1 isoladas em Pernambuco foi de 97,6%, e entre elas e a cepa BR/90, utilizada como referência, foi em média 98,3% (Tabela 3). Os mesmos percentuais foram encontrados para a similaridade entre os aminoácidos.

O teste de neutralidade D-Tajima mostrou que todas as mutações foram seletivamente neutras ($D = -0,117169$).

Substituições de nucleotídeos foram observadas ao longo dos genomas, num total de 672, quando comparadas entre si e com a cepa BR/90. A 5'UTR não apresentou nenhuma alteração entre os genomas analisados. Entre as alterações encontradas, 22,2% ocorreram em genes estruturais, 75,3% em não-estruturais e 2,5% em 3'UTR.

Não foram encontradas inserções ou deleções. A maioria das substituições (87,2%) ocorreu na posição do terceiro códon e foram silenciosas.

Ainda comparando com a cepa BR/90, 86 substituições de aminoácidos foram identificadas. Dessas, 68 (79,1%) foram encontradas em proteínas não-estruturais, enquanto que 18 (20,9%) ocorreram em proteínas estruturais (Quadros 4, 5 e 6).

Das 86 substituições de aminoácidos, 43 delas foram observadas nos isolados mais recentes (2010). A maioria ocorrendo em NS2A e NS5.

Algumas alterações de aminoácidos ocorreram apenas nos isolados mais antigos (1996-2001): NS1-D92N, NS1-Y293S, NS4B-I90L, NS5-T635S e NS5-T678I. Quatro substituições foram observadas apenas nos isolados estudados: NS2A-A97T, NS3-S465N, NS5-V114I e NS5-I784V. Apenas a amostra 41111, caracterizada como FHD, apresentou substituições em E-E62K, NS2A-A46G e NS4B-M28I.

Figura 3 - Árvore filogenética baseada em 83 seqüências do genoma completo de DENV-1.



Fonte: Da autora.

Nota: Máxima verossimilhança com GTR+G como modelo evolucionário. Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) < 70% não mostrados. O nome dos isolados utilizados para comparação incluem número de acesso do GenBank, país de origem (sigla) e ano de isolamento. Isolados de Pernambuco:

Legenda: ▲ Linhagem I; ● Linhagem II; ■ Linhagem III.

Tabela 3 - Identidade entre seqüências de amostras de DENV-1 isoladas no estado de Pernambuco e a seqüência BR/90

| Seqüência | ^a 808/ 2010 | 898/ 2010 | 501/ 2010 | 671/ 2010 | 861/ 2010 | 985/ 2010 | 814/ 1996 | 604/ 1997 | 111/ 1997 | 082/ 1998 | 049/ 1999 | 523/ 2000 | 488/ 2001 | 861/ 2001 | 463/ 2002 | BR/90 |
|-----------------|---------------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 808/2010 | - | ^b 96% | 96% | 99% | 100% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 97% |
| 898/2010 | 96% ^c | - | 100% | 96% | 96% | 100% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% | 98% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 501/2010 | 96% | 100% | - | 96% | 96% | 100% | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% | 98% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 671/2010 | 99% | 96% | 96% | - | 99% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 97% |
| 861/2010 | 100% | 96% | 96% | 99% | - | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 96% | 97% |
| 985/2010 | 96% | 100% | 100% | 96% | 96% | - | 98% | 98% | 98% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 814/1996 | 96% | 98% | 98% | 96% | 96% | 98% | - | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% |
| 604/1997 | 96% | 98% | 98% | 96% | 96% | 98% | 100% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 111/1997 | 96% | 98% | 98% | 96% | 96% | 98% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 082/1998 | 96% | 97% | 97% | 96% | 96% | 97% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 049/1999 | 96% | 97% | 97% | 96% | 96% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 523/2000 | 96% | 98% | 98% | 96% | 96% | 97% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 488/2001 | 96% | 97% | 97% | 96% | 96% | 97% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% |
| 861/2001 | 96% | 97% | 97% | 96% | 96% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 98% |
| 463/2002 | 96% | 97% | 97% | 96% | 96% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% |
| BR/90 | 97% | 98% | 98% | 97% | 97% | 98% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 98% | 99% | - |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/90 utilizada para comparação: AF226685. Percentuais determinados através do BLAST - Programa BioEdit 7.0.8.0.

Legenda: ^a = Cepas de Pernambuco analisadas neste estudo. Nome das cepas (últimos três algarismos)/ano de isolamento. ^b = Percentual de identidade entre aminoácidos (negrito); ^c = Percentual de identidade entre nucleotídeos.

Quadro 4 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas estruturais)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 9808/BR PE/10 | 88463/BR PE/02 | 75861/BR PE/01 | 74488/BR PE/01 | 70523/BR PE/00 | 59049/BR PE/99 | 52082/BR PE/98 | 41111/BR PE/97 | 40604/BR PE/97 | 21814/BR PE/96 | 14985/BR PE/10 | 13861/BR PE/10 | 13671/BR PE/10 | 13501/BR PE/10 | 12898/BR PE/10 | BR/90 | |
|------|---------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|---|
| C | 49 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | P | * | * | P | P | L | |
| C | 77 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | Q |
| C | 86 | R | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | * | * | K | |
| C | 105 | * | * | F | F | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | S | |
| M | 29 | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | V | * | * | A | |
| M | 89 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | E | * | * | E | E | D | |
| M | 118 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | * | * | R | R | K | |
| M | 122 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | * | * | R | R | K | |
| M | 138 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | F | * | * | F | F | L | |
| E | 62 | * | * | * | * | * | * | * | K | * | * | * | * | * | * | * | E | |
| E | 170 | * | * | * | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | |
| E | 297 | M | * | M | * | * | * | M | * | * | * | M | M | M | M | M | T | |
| E | 320 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | * | * | * | * | V | |
| E | 338 | L | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | L | * | * | S | |
| E | 394 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | * | * | R | R | K | |
| E | 428 | L | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | L | * | * | V | |
| E | 436 | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | I | * | * | V | |
| E | 481 | * | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | * | * | A | |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/90 utilizada para comparação: AF226685.

Legenda: C= Capsídeo; M= Membrana; E= Envelope; (aa) = Aminoácidos; *Aminoácidos iguais aos da cepa referência. L= Leucina; P= Prolina; R = Arginina; Q= Glutamina; K= Lisina; S = Serina; F= Fenilalanina; A = Alanina; V= Valina; D=Aspartato ou Ácido aspártico; E = Glutamato ou Ácido glutâmico; T= Treonina; M= Metionina; I= Isoleucina.

Quadro 5 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas não estruturais - NS1 e NS2A)

| Gene | Posição N° (aa) | 9808/BR PE/10 | 88463/BR PE/02 | 75861/BR PE/01 | 74488/BR PE/01 | 70523/BR PE/00 | 59049/BR PE/99 | 52082/BR PE/98 | 41111/BR PE/97 | 40604/BR PE/97 | 21814/BR PE/96 | 14985/BR PE/10 | 13861/BR PE/10 | 13671/BR PE/10 | 13501/BR PE/10 | 12898/BR PE/10 | BR/90 |
|------|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| NS1 | 5 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | * | * | * | * | S |
| NS1 | 19 | * | * | * | * | * | * | * | * | N | * | * | * | * | * | * | S |
| NS1 | 50 | * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | * | * | * | * | * | K |
| NS1 | 79 | Y | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Y | Y | * | * | H |
| NS1 | 86 | M | I | M | M | M | I | I | I | I | I | M | M | M | M | M | M |
| NS1 | 94 | * | N | N | N | N | N | N | N | N | N | * | * | * | * | * | D |
| NS1 | 107 | * | * | K | K | K | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R |
| NS1 | 130 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | I |
| NS1 | 133 | * | * | A | A | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T |
| NS1 | 148 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | G | * | * | G | G | E |
| NS1 | 164 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | V | V | I |
| NS1 | 177 | H | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | H | H | * | * | Y |
| NS1 | 226 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | T | T | I |
| NS1 | 244 | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | V | * | * | I |
| NS1 | 248 | * | M | M | M | M | M | M | M | M | M | * | T | * | * | * | I |
| NS1 | 249 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | F | * | * | F | F | Y |
| NS1 | 253 | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I |
| NS1 | 295 | Y | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | Y | Y | * | * | N |
| NS2A | 7 | M | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | M | * | * | V |
| NS2A | 20 | L | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | L | * | * | M |
| NS2A | 48 | * | * | * | * | * | * | * | G | * | * | * | * | * | * | * | A |
| NS2A | 69 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | R | R | R | K |
| NS2A | 83 | L | * | * | * | * | L | * | * | * | * | * | * | * | L | L | F |
| NS2A | 99 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A |
| NS2A | 108 | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | V | * | * | I |
| NS2A | 141 | D | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | D | D | * | * | E |
| NS2A | 157 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | V | V | I |
| NS2A | 158 | R | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | * | * | K |
| NS2A | 160 | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | S | S | * | * | T |
| NS2A | 170 | M | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | M | * | * | T |
| NS2A | 172 | * | * | T | T | T | * | * | * | T | T | * | * | * | * | * | M |
| NS2A | 173 | A | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | A | * | * | V |
| NS2A | 215 | * | E | E | * | * | E | E | E | E | E | * | * | * | * | * | K |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/90 utilizada para comparação: AF226685.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; *Aminoácidos iguais aos da cepa referência. L= Leucina; S = Serina; N= Asparagina; R = Arginina; K= Lisina; Y=Tirosina; H= Histidina; M= Metionina; I= Isoleucina; T= Treonina; A = Alanina; G=Glicina; V= Valina; F=Fenilalanina; E = Glutamato ou Ácido glutâmico; D = Aspartato ou Ácido aspártico.

Quadro 6 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-1 (proteínas não estruturais - NS2B a NS5)

| Gene | Posição N° (aa) | 9808/BR PE/10 | 88463/BR PE/02 | 75861/BR PE/01 | 74488/BR PE/01 | 70523/BR PE/00 | 59049/BR PE/99 | 52082/BR PE/98 | 41111/BR PE/97 | 40604/BR PE/97 | 21814/BR PE/96 | 14985/BR PE/10 | 13861/BR PE/10 | 13671/BR PE/10 | 13501/BR PE/10 | 12898/BR PE/10 | BR/90 |
|------|-----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|
| NS2B | 6 | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | I | * | * | L |
| NS2B | 13 | V | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | V | V | * | * | I |
| NS2B | 65 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Q | * | * | Q | Q | E |
| NS2B | 72 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | A | A | T |
| NS2B | 108 | V | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I |
| NS2B | 125 | * | * | * | * | * | * | L | * | * | * | * | * | * | * | * | F |
| NS3 | 120 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | * | * | T |
| NS3 | 173 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | * | * | S |
| NS3 | 187 | * | R | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | K |
| NS3 | 293 | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | D |
| NS3 | 439 | E | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | E | E | * | * | D |
| NS3 | 467 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | S |
| NS3 | 476 | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | I | I | I | V |
| NS4A | 21 | * | * | * | * | * | Q | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L |
| NS4A | 91 | M | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | M | * | * | T |
| NS4B | 19 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Y | * | * | Y | Y | H |
| NS4B | 26 | H | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | H | H | * | * | Q |
| NS4B | 30 | * | * | * | * | * | * | * | I | * | * | * | * | * | * | * | M |
| NS4B | 36 | * | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | * | * | H | H | R |
| NS4B | 92 | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | * | * | * | * | * | I |
| NS4B | 155 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | * | * | A |
| NS5 | 33 | K | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | K | K | * | * | R |
| NS5 | 117 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | V |
| NS5 | 138 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | * | * | M |
| NS5 | 373 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | T | T | A |
| NS5 | 588 | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | S | S | * | * | N |
| NS5 | 632 | S | F | F | F | F | F | F | F | F | F | * | S | * | * | L | |
| NS5 | 638 | * | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | * | * | * | * | T |
| NS5 | 643 | K | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | K | K | * | * | E |
| NS5 | 644 | K | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | K | K | * | * | R |
| NS5 | 645 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | A | A | V |
| NS5 | 681 | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 689 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | I | * | * | V |
| NS5 | 787 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | I |
| NS5 | 792 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | A | A | T |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/90 utilizada para comparação: AF226685.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; *Aminoácidos iguais aos da cepa referência. I= Isoleucina; L= Leucina; V= Valina; F=Fenilalanina; Q= Glutamina; E = Glutamato; A = Alanina; T= Treonina; S = Serina; R = Arginina; K= Lisina; D = Aspartato; N= Asparagina; M= Metionina; Y=Tirosina; H= Histidina.

5.2.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-1

A análise de 3'UTR dos isolados de DENV-1 demonstrou 17 substituições nucleotídicas (Quadro 7).

Apesar de apresentarem algumas alterações em seus nucleotídeos, as estruturas secundárias preditas a partir das sequências de 3'UTR das linhagens I e II foram similares. No entanto, na linhagem III foram observadas seis substituições que determinaram a predição de estruturas secundárias diferentes e específicas desta linhagem: 10303 (A→G), 10307 (G→A), 10333 (A→G), 10347 (T→C), 10426 (G→A), 10514 (T→C) e 10535 (T→A) (Figura 4).

5.2.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-1

Não foi observada nenhuma evidência de evolução adaptativa atuando sobre qualquer um dos genes. A pressão evolucionária observada foi seleção purificadora. Nenhuma diferença significativa foi observada na média da relação d_N/d_S entre os genes (Tabela 4).

Tabela 4 - Pressões de seleção em DENV-1 com base em cada gene

| Gene | Nº de aminoácidos | d_N | d_S | d_N/d_S |
|----------|-------------------|--------|--------|-----------|
| Capsídeo | 114 | 0.0003 | 0.0022 | 0.14 |
| Membrana | 166 | 0.0035 | 0.0257 | 0.14 |
| Envelope | 495 | 0.0017 | 0.0214 | 0.08 |
| NS1 | 352 | 0.0035 | 0.0285 | 0.12 |
| NS2A | 218 | 0.0034 | 0.0248 | 0.14 |
| NS2B | 130 | 0.0043 | 0.0245 | 0.18 |
| NS3 | 619 | 0.0018 | 0.0189 | 0.09 |
| NS4A | 150 | 0.0006 | 0.0167 | 0.04 |
| NS4B | 249 | 0.0018 | 0.0186 | 0.10 |
| NS5 | 899 | 0.0021 | 0.0206 | 0.10 |

Fonte: Da autora.

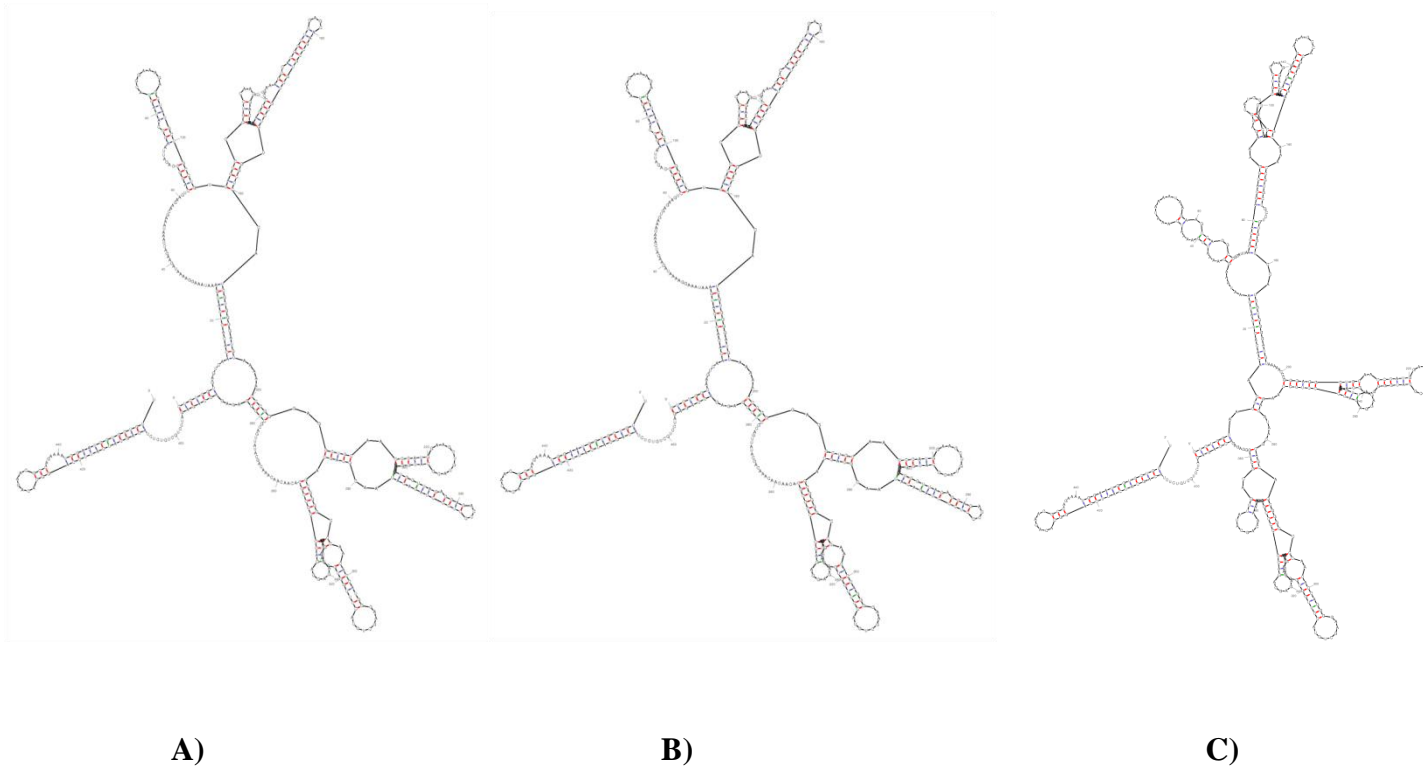
Quadro 7 - Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-1 entre os isolados de Pernambuco e BR/90.

| Posição Nucleotídeo | 9808/BR PE/10 | 88463/BR PE/02 | 75861/BR PE/01 | 74488/BR PE/01 | 70523/BR PE/00 | 59049/BR PE/99 | 52082/BR PE/98 | 41111/BR PE/97 | 40604/BR PE/97 | 21814/BR PE/96 | 14985/BR PE/10 | 13861/BR PE/10 | 13671/BR PE/10 | 13501/BR PE/10 | 12898/BR PE/10 | BR/90 |
|---------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| 10272 | A | G | A | A | A | A | A | G | A | A | A | A | A | A | A | A |
| 10303 | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G | G | A | A | A |
| 10307 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | A | A | G | G | G |
| 10314 | T | T | T | T | C | T | T | C | T | T | C | T | T | C | C | T |
| 10318 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| 10319 | T | C | C | C | C | C | T | C | T | C | T | T | T | T | T | T |
| 10320 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G | A | A | G | G | A |
| 10333 | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G | G | A | A | A |
| 10347 | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | C | C | T | T | T |
| 10417 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | A | A | A | C | C | C |
| 10426 | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | A | A | G | G | G |
| 10440 | G | G | G | G | G | G | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G |
| 10514 | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | C | C | T | T | T |
| 10535 | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A | A | T | T | T |
| 10560 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G | A | A |
| 10567 | G | T | T | T | T | T | T | T | G | T | G | G | G | G | G | T |
| 10620 | C | C | T | T | T | C | T | C | C | T | C | C | C | C | C | C |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/90 utilizada para comparação: AF226685.

Figure 4 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-1.



Fonte: Da Autora.

Nota: A) Isolado 88463/BR-PE/02, representando a linhagem I; B) Isolado 14985/BR-PE/10 representando a linhagem II, e C) Isolado 9808/BR-PE/10, representando a linhagem III. Estruturas secundárias obtidas utilizando o programa MFOLD.

5.3 Análise de DENV-2

Treze isolados primários de DENV-2 foram completamente sequenciados, representando amostras de 1995 a 2010 (Tabela 5). Um total de 10723 nucleotídeos foram analisados em cada sequência, e a fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) foi localizada nas posições 97 a 10264, resultando em 3389 aminoácidos.

Com base nos alinhamentos obtidos, foi realizada a análise filogenética, análise de identidade, pressão de seleção e predição de estruturas secundárias de 5' e 3'UTR.

Tabela 5 - Amostras de DENV-2 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo

| Nome da Amostra | Ano de Isolamento | Localização Município | No. de acesso GenBank |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 3275/BR-PE/95 | 1995 | Recife | JX669480 |
| 3311/BR-PE/95 | 1995 | Recife | JX669481 |
| 3337/BR-PE/95 | 1995 | Recife | JX669482 |
| 37473/BR-PE/97 | 1997 | Jaboatão | JX669483 |
| 47913/BR-PE/98 | 1997 | Riacho das Almas | JX669484 |
| 51347/BR-PE/98 | 1998 | Recife | JX669485 |
| 57135/BR-PE/99 | 1999 | Araripina | JX669486 |
| 72144/BR-PE/00 | 2000 | Petrolina | JX669487 |
| 87086/BR-PE/02 | 2002 | Floresta | JX669488 |
| 9479/BR-PE/10 | 2010 | Serra Talhada | JX669479 |
| 13858/BR-PE/10 | 2010 | Afogados da Ingazeira | JX669476 |
| 14905/BR-PE/10 | 2010 | Olinda | JX669477 |
| 19190/BR-PE/10 | 2010 | Caruaru | JX669478 |

Fonte: Da autora.

5.3.1 Análise Filogenética de DENV-2

A árvore filogenética foi construída através de máxima verossimilhança, utilizando-se o modelo GTR+G+I, escolhido com a utilização do Modeltest (Mega 5.1). Para fins de comparação, foram incluídas 102 sequências de genomas completos disponíveis no GenBank, representando os genótipos que circulam atualmente em todo o mundo.

A análise filogenética de DENV-2 demonstrou que em Pernambuco, durante o período de 1995 a 2010, houve a circulação apenas do genótipo Sudeste Asiático/Americano.

Duas linhagens diferentes foram observadas (Figura 5). A linhagem I (isolados de 1995 a 2002) teve sua origem provável a partir da Venezuela. Já a linhagem II (isolados de 2010), que substituiu a linhagem I, provavelmente se originou a partir da Jamaica.

5.3.2 Análise das sequências de DENV-2

A média da identidade entre as cepas de DENV-2 de Pernambuco foi de 98,2%, e entre elas e a cepa BR/08 (HM181971), isolada em São Paulo e utilizada como referência, foi em média 95,9% (Tabela 6). Os mesmos percentuais foram encontrados para a similaridade entre os aminoácidos.

O teste de neutralidade D-Tajima mostrou que todas as mutações foram seletivamente neutras ($D=0,180598$).

Substituições de nucleotídeos ocorreram em 517 posições ao longo dos genomas dos isolados de Pernambuco quando comparados com a cepa BR/08.

A 5'UTR apresentou uma única alteração nucleotídica entre os genomas analisados. Esta alteração ocorreu no nucleotídeo 77 (A→G) dos isolados de 2000, 2002 e 2010, mas não foi observada nos isolados dos anos 1995-1999. Entretanto, as estruturas secundárias previstas foram similares.

As demais alterações nucleotídicas encontradas ocorreram 24% em genes estruturais, 72,6% em não-estruturais e 3,3% em 3'UTR.

Não foram encontradas inserções ou deleções. A maioria das alterações nucleotídicas (74%) ocorreu na posição do terceiro códon e foram silenciosas.

Ainda comparando com a cepa BR/08, foram observadas 136 substituições de aminoácidos (Quadros 8 a 12). Dessas, 14 (10,3%) foram encontradas em proteínas estruturais, enquanto que 122 (89,7%) ocorreram em proteínas não-estruturais. A maioria dessas substituições (52,9%) ocorreu em NS5 e 51,4% resultou em alteração da classe dos aminoácidos (não conservativas).

Das 136 substituições de aminoácidos, 60 delas foram observadas em todos os isolados mais antigos (1995-2002). Enquanto que 11 foram encontradas apenas nos isolados de 2010.

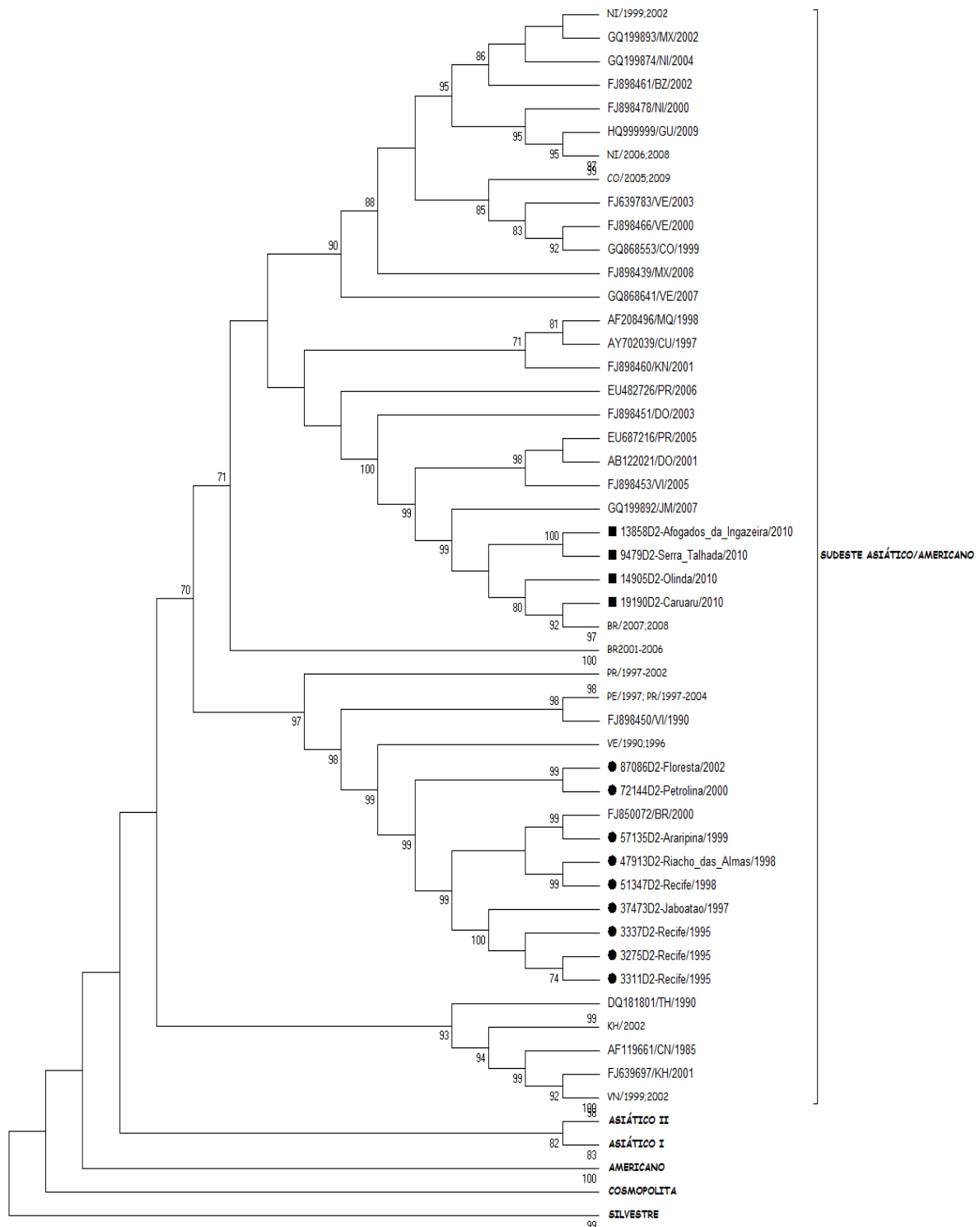
Quatro alterações ocorreram apenas nos isolados mais antigos (1995-1999): NS2A-A109T, NS3-I461V, NS5-K598E e NS5-L671P. Também quatro substituições foram observadas apenas nos isolados estudados (Pernambuco): E-V61I, NS1-I275M, NS5-S57C e NS5-I881T.

5.3.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-2

A análise de 3'UTR dos isolados de DENV-2 demonstrou 17 substituições nucleotídicas (Quadro 13). Três dessas alterações ocorreram apenas nos isolados do estudo: 10265 (A→G), 10279 (A→G) e 10336 (G→A). Oito substituições foram observadas nos isolados de 2010 mas não ocorreram nos isolados mais antigos: 10277 (T→C), 10278 (A→G), 10280 (A→G), 10369 (T→A), 10437 (A→G), 10450 (T→C), 10451 (T→C) e 10465 (G→A).

Foram preditas sete estruturas secundárias diferentes para os treze isolados do estudo (Figura 6). As estruturas geradas apresentaram grande variabilidade, não sendo possível associar uma determinada estrutura às linhagens encontradas. No entanto, três dos quatro isolados de 2010 apresentaram um mesmo tipo de estrutura secundária (Figura 6.C).

Figura 5 - Árvore filogenética baseada em 115 seqüências do genoma completo de DENV-2.



Fonte: Da autora.

Nota: Máxima verossimilhança com GTR+G+I como modelo evolucionário. Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) < 70% não mostrados. O nome dos isolados utilizados para comparação incluem número de acesso do GenBank, país de origem (sigla) e ano de isolamento. Isolados de Pernambuco.

Legenda: ■ Linhagem I; ● Linhagem II.

Tabela 6 - Identidade entre sequências de amostras de DENV-2 isoladas no estado de Pernambuco e a sequência BR/08

| Sequência | ^a 858/ 2010 | 905/ 2010 | 190/ 2010 | 479/ 2010 | 275/ 1995 | 311/ 1995 | 337/ 1995 | 473/ 1997 | 913/ 1998 | 347/ 1998 | 135/ 1999 | 144/ 2000 | 086/ 2002 | BR/08 |
|-----------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| 858/2010 | - | 99% | 99% | 100% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 905/2010 | 99% ^c | - | 99% | 99% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 190/2010 | 99% | 99% | - | 99% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 479/2010 | 100% | 99% | 99% | - | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 97% | 98% |
| 275/1995 | 97% | 97% | 97% | 97% | - | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 311/1995 | 97% | 97% | 97% | 97% | 100% | - | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 337/1995 | 97% | 97% | 97% | 97% | 100% | 100% | - | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 473/1997 | 97% | 97% | 97% | 97% | 100% | 100% | 100% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 913/1998 | 97% | 97% | 97% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 347/1998 | 97% | 97% | 97% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 95% |
| 135/1999 | 97% | 97% | 97% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 95% |
| 144/2000 | 97% | 97% | 97% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 100% | 95% |
| 086/2002 | 97% | 97% | 97% | 97% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | - | 95% |
| BR/08 | 98% | 98% | 98% | 98% | 95% | 95% | 95% | 95% | 95% | 95% | 95% | 95% | 95% | - |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971. Percentuais determinados através do BLAST - Programa BioEdit 7.0.8.0.

Legenda: ^a = Cepas de Pernambuco isoladas neste estudo. ^b = Percentual de identidade entre aminoácidos (negrito); ^c = Percentual de identidade entre nucleotídeos.

Quadro 8 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas estruturais)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| C | 97 | * | * | * | * | * | * | * | K | K | K | * | * | * | R |
| C | 106 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | I | I | I | V |
| M | 16 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | K | * | * | * | R |
| M | 134 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | T |
| E | 61 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | V |
| E | 129 | I | I | I | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V |
| E | 131 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | Q |
| E | 140 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | * | V |
| E | 160 | * | * | * | * | E | E | E | E | * | E | * | * | * | K |
| E | 170 | T | T | T | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I |
| E | 203 | * | * | * | * | E | E | E | E | E | E | E | E | E | D |
| E | 323 | * | * | * | * | * | * | * | K | * | * | * | * | * | R |
| E | 340 | T | T | T | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M |
| E | 380 | V | V | V | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: C= Capsídeo; M= Membrana; E= Envelope; (aa) = Aminoácidos; K= Lisina; R= Arginina; I= Isoleucina; V= Valina; A = Alanina; T= Treonina; L= Leucina; Q= Glutamina; M= Metionina; E = Glutamato ou Ácido glutâmico; D=Aspartato ou Ácido aspártico.

Quadro 9 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas não estruturais - NS1 a NS2B)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS1 | 5 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | I |
| NS1 | 38 | F | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | S |
| NS1 | 208 | * | * | * | * | * | * | * | * | G | G | * | * | * | D |
| NS1 | 212 | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M |
| NS1 | 275 | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | I |
| NS2A | 38 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | L |
| NS2A | 51 | * | * | * | * | * | * | * | * | K | * | * | * | * | R |
| NS2A | 57 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | * | * | * | M |
| NS2A | 62 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | * | A |
| NS2A | 63 | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | * | * | T |
| NS2A | 109 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | * | * | A |
| NS2A | 116 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | I |
| NS2A | 133 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | A |
| NS2A | 135 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | K |
| NS2A | 151 | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | * | * | * | A |
| NS2A | 153 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | * | * | S |
| NS2A | 158 | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A |
| NS2A | 162 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | Q |
| NS2A | 174 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | V | * | * | A |
| NS2A | 189 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A |
| NS2B | 8 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | I |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; V= Valina; I= Isoleucina; F=Fenilalanina; S=Serina; G=Glicina; D=Aspartato; M= Metionina; L= Leucina; K= Lisina; R = Arginina; A = Alanina; T= Treonina; Q= Glutamina.

Quadro 10 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteínas não estruturais - NS3 e NS4A)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS3 | 14 | E | E | * | * | * | * | * | * | * | E | E | E | E | G |
| NS3 | 31 | * | * | F | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L |
| NS3 | 115 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | I |
| NS3 | 126 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | I | V |
| NS3 | 418 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | * | R | R | R | K |
| NS3 | 461 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | * | * | I |
| NS3 | 549 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | R | R | R | * | K |
| NS3 | 561 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | K |
| NS4A | 21 | * | * | * | * | T | T | T | T | * | * | * | * | * | A |
| NS4A | 23 | * | * | * | * | D | D | D | D | D | D | * | D | D | N |
| NS4A | 36 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | V |
| NS4A | 41 | * | H | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * |
| NS4A | 42 | * | * | * | * | N | N | N | N | N | N | N | K | K | T |
| NS4A | 63 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A |
| NS4A | 78 | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | I |
| NS4A | 93 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | I |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; G=Glicina; F=Fenilalanina; L= Leucina; I= Isoleucina; V= Valina; R = Arginina; K= Lisina; T= Treonina; A = Alanina; D=Aspartato ou Ácido aspártico; N= Asparagina; H= Histidina.

Quadro 11 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS4B)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS4B | 3 | * | M | * | * | M | M | M | M | M | M | M | M | M | T |
| NS4B | 17 | * | * | * | * | W | W | W | W | W | W | W | W | W | L |
| NS4B | 74 | P | * | * | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | L |
| NS4B | 91 | L | * | * | L | * | * | * | * | * | * | * | * | * | S |
| NS4B | 101 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | * | I | I | T |
| NS4B | 103 | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | * | * | * | K |
| NS4B | 108 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | P |
| NS4B | 120 | * | * | * | * | I | I | I | I | * | * | * | * | * | M |
| NS4B | 151 | * | * | * | * | G | G | G | G | G | G | G | G | G | E |
| NS4B | 193 | * | * | * | * | A | A | A | A | * | * | * | * | * | V |
| NS4B | 217 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | * | L | L | P |
| NS4B | 218 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | L | P |
| NS4B | 224 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | P | P | L |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; M= Metionina; T= Treonina; W= Triptófan; L= Leucina; P= Prolina; S= Serina; I= Isoleucina; R = Arginina; K= Lisina; G=Glicina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; A = Alanina; V= Valina.

Quadro 12 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS5 - Continua)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS5 | 20 | * | * | * | R | T | T | T | T | T | T | T | T | T | M |
| NS5 | 23 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | G | G | E |
| NS5 | 55 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | M |
| NS5 | 57 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | S |
| NS5 | 60 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | D |
| NS5 | 71 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | I | I | I | T |
| NS5 | 75 | * | * | * | * | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | R |
| NS5 | 81 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 82 | * | * | * | * | S | S | S | S | * | * | S | S | S | L |
| NS5 | 113 | * | * | * | * | R | R | R | R | * | * | * | * | * | K |
| NS5 | 131 | G | G | G | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | E |
| NS5 | 132 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | S |
| NS5 | 134 | * | * | * | * | S | S | S | S | S | S | S | S | S | F |
| NS5 | 162 | * | * | * | * | G | G | G | G | G | G | G | G | G | E |
| NS5 | 170 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | R | W |
| NS5 | 175 | * | * | * | * | I | I | I | I | * | * | * | * | * | T |
| NS5 | 176 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | * | T | T | T | I |
| NS5 | 183 | * | * | * | * | * | * | * | * | K | K | * | * | * | R |
| NS5 | 184 | * | * | * | * | F | F | F | F | F | F | F | F | F | S |

Fonte: Da autora.

Nº de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; R = Arginina; T= Treonina; M= Metionina; G=Glicina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; C= Cisteína; S= Serina; A=Alanina; D= Aspartato ou Ácido Aspártico; I= Isoleucina; Q= Glutamina; L= Leucina; F= Fenilalanina; W= Triptófano; K= Lisina.

Quadro 12 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS5 - Continuação)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS5 | 186 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 206 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | P |
| NS5 | 210 | * | * | * | * | T | T | T | T | * | * | * | * | * | I |
| NS5 | 217 | * | * | * | * | H | H | H | H | H | H | H | H | H | R |
| NS5 | 219 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | K |
| NS5 | 224 | * | * | * | * | P | P | P | P | P | P | P | P | P | L |
| NS5 | 226 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 249 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | V |
| NS5 | 262 | * | * | * | * | S | S | S | S | S | S | S | S | S | N |
| NS5 | 287 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 295 | * | * | * | * | H | H | H | H | H | H | H | H | H | R |
| NS5 | 304 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | A |
| NS5 | 309 | * | * | * | * | N | N | N | N | N | N | N | N | N | S |
| NS5 | 354 | * | * | * | * | S | S | S | S | S | S | S | S | S | F |
| NS5 | 356 | * | * | * | * | P | P | P | P | P | P | P | P | P | L |
| NS5 | 365 | * | * | * | * | E | E | E | E | E | E | E | E | E | K |
| NS5 | 377 | * | * | * | * | G | G | G | G | G | G | G | G | G | E |
| NS5 | 392 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | K |
| NS5 | 394 | E | E | E | E | * | * | * | * | * | * | * | * | * | G |
| NS5 | 404 | K | K | K | K | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; T= Treonina; I= Isoleucina; L= Leucina; P= Prolina; R = Arginina; H= Histidina; K= Lisina; A = Alanina; V= Valina; N= Asparagina; S= Serina; F= Fenilalanina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; G=Glicina.

Quadro 12 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS5 - Continuação)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS5 | 418 | * | K | * | * | K | K | K | K | K | K | K | K | K | R |
| NS5 | 424 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | H |
| NS5 | 430 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | I | I | I | M |
| NS5 | 485 | * | * | * | * | F | F | F | F | F | F | F | F | F | S |
| NS5 | 487 | * | * | * | * | N | N | N | N | * | * | * | * | * | S |
| NS5 | 493 | * | S | * | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | F |
| NS5 | 523 | * | M | * | * | T | T | T | T | T | T | T | M | M | R |
| NS5 | 529 | * | G | * | * | G | G | G | G | G | G | G | G | G | E |
| NS5 | 536 | * | * | * | * | T | T | T | T | * | * | * | * | * | I |
| NS5 | 598 | * | * | * | * | E | E | E | E | E | E | E | * | * | K |
| NS5 | 603 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | V |
| NS5 | 607 | * | * | * | * | A | A | A | A | A | A | A | A | A | V |
| NS5 | 616 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 626 | K | K | K | K | * | * | * | * | * | * | * | K | K | R |
| NS5 | 638 | * | * | * | * | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | P |
| NS5 | 639 | * | * | * | * | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | P |
| NS5 | 666 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | I | I | I | T |
| NS5 | 671 | * | * | * | * | P | P | P | P | P | P | P | * | * | L |
| NS5 | 704 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |

Fonte: Da autora

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; K= Lisina; R = Arginina; L= Leucina; H= Histidina; I= Isoleucina; M= Metionina; F= Fenilalanina; ; S= Serina; N= Asparagina; T= Treonina; G=Glicina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; A = Alanina; V= Valina;Q= Glutamina; P= Prolina.

Quadro 12 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-2 (proteína não estrutural - NS5 - Conclusão)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| NS5 | 707 | * | * | * | * | K | K | K | K | K | K | K | K | K | R |
| NS5 | 738 | * | * | * | * | V | V | V | V | V | V | V | V | V | A |
| NS5 | 754 | * | * | * | * | P | P | P | P | P | P | P | P | P | L |
| NS5 | 801 | * | * | * | * | L | L | L | L | L | L | L | L | L | P |
| NS5 | 816 | * | * | * | * | I | I | I | I | I | I | * | * | * | T |
| NS5 | 824 | * | * | * | * | R | R | R | R | R | R | R | R | R | H |
| NS5 | 840 | * | * | * | * | I | I | I | I | * | * | * | * | * | T |
| NS5 | 842 | E | * | * | E | * | * | * | * | E | * | * | * | E | G |
| NS5 | 844 | * | * | * | * | E | E | E | E | E | E | E | E | E | G |
| NS5 | 860 | * | * | * | * | L | L | L | L | * | * | * | * | * | P |
| NS5 | 864 | * | * | * | * | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |
| NS5 | 866 | * | * | * | * | K | K | K | K | K | K | K | K | K | R |
| NS5 | 870 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | T | I |
| NS5 | 880 | * | * | * | * | N | N | N | N | N | N | N | N | N | D |
| NS5 | 881 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | I |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; K= Lisina; R = Arginina; V= Valina; A = Alanina; P= Prolina; L= Leucina; I= Isoleucina; T= Treonina; H= Histidina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; G=Glicina; N= Asparagina; D=Aspartato ou Ácido Aspártico.

Quadro 13 - Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-2 entre os isolados de Pernambuco e BR/08.

| Posição Nucleotídeo | 13858/ BR - PE/10 | 14905/ BR- PE/10 | 19190/ BR- PE/10 | 9479/ BR- PE/10 | 3275/ BR- PE/95 | 3311/ BR- PE/95 | 3337/ BR- PE/95 | 37473/ BR- PE/97 | 47913/ BR- PE/98 | 51347/ BR- PE/98 | 57135/ BR- PE/99 | 72144/ BR- PE/00 | 87086/ BR- PE/02 | BR/08 |
|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| 10274 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | A |
| 10276 | C | C | C | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| 10277 | G | G | G | G | A | A | A | A | G | G | A | A | A | A |
| 10278 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G |
| 10279 | G | G | G | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G |
| 10281 | C | C | C | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 10330 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | A | A | G |
| 10335 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G |
| 10368 | A | A | A | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A |
| 10386 | C | C | C | C | T | T | C | T | T | T | T | T | T | C |
| 10388 | C | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 10391 | A | A | A | A | A | A | A | A | G | A | A | A | A | A |
| 10436 | G | G | G | G | A | A | A | A | A | A | A | A | A | G |
| 10449 | C | C | C | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | C |
| 10450 | C | C | C | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | C |
| 10464 | A | A | A | A | G | G | G | G | G | G | G | G | G | A |
| 10486 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | T | C |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/08 utilizada para comparação: HM181971.

Figura 6 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-2 (Continua).

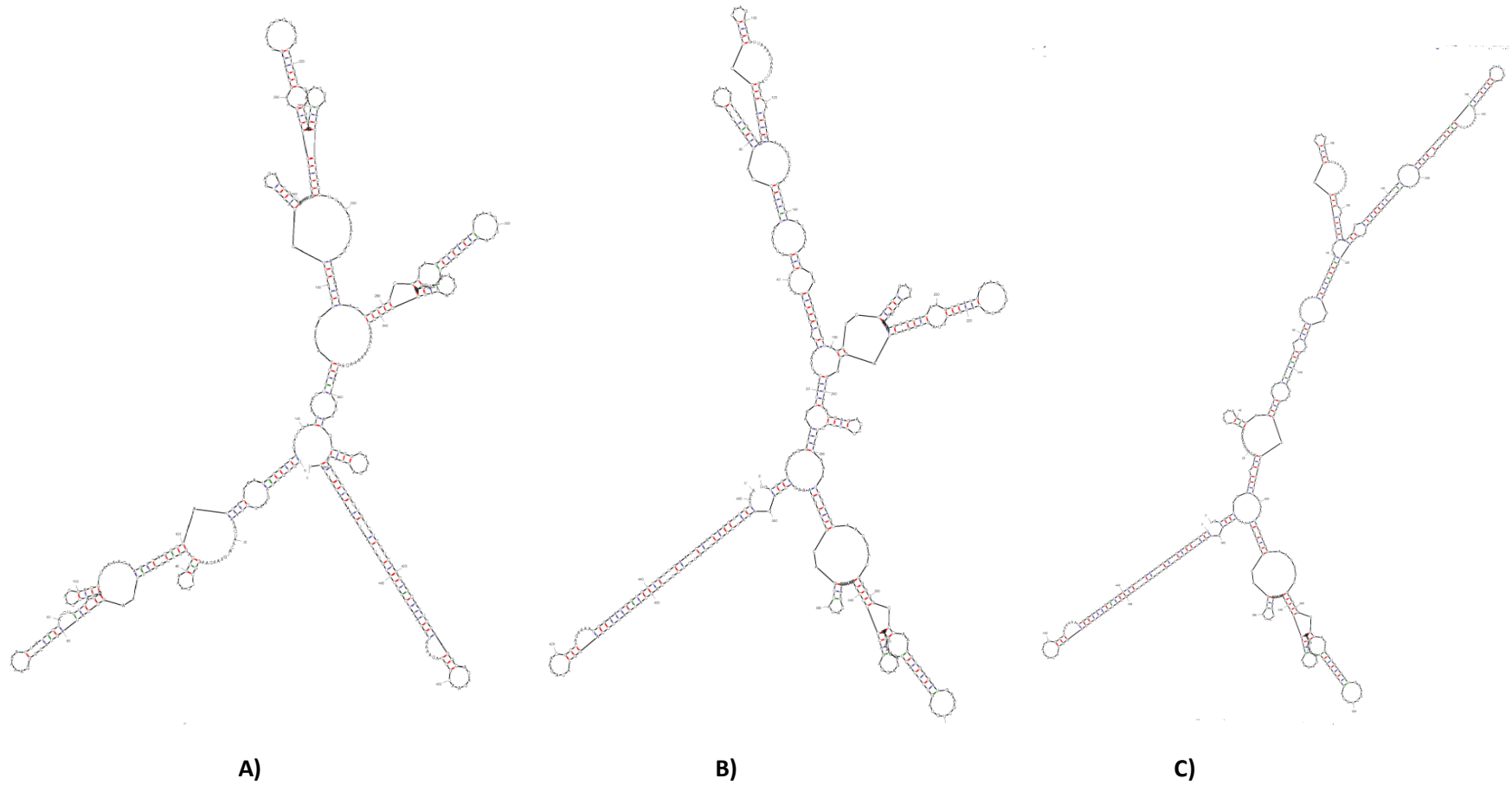
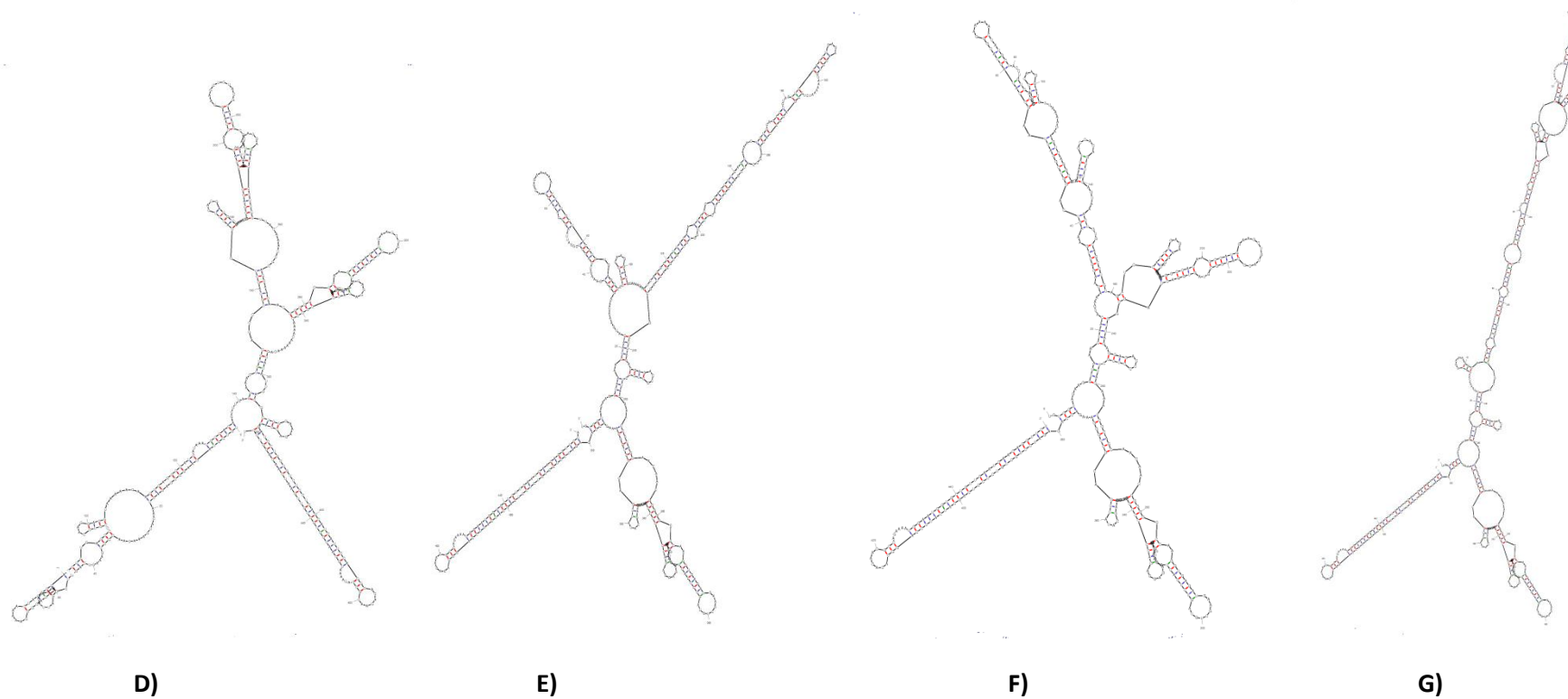


Figura 6 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-2 (Conclusão)

Fonte: Da Autora.

Nota: A) Isolados 37473/BR-PE/97; 3311/BR-PE/95; 3275/BR-PE/95 e 51347/BR-PE/98. B) Isolado 3337/BR-PE/95. C) Isolados 13858/BR-PE/10; 9479/BR-PE/10 e 19190/BR-PE/10; D) Isolado 14905/BR-PE/10. E) Isolado 87086/BR-PE/98. F) Isolado 47913/BR-PE/98. G) Isolados 72144/BR-PE/00 e 57135/BR-PE/99. Estruturas secundárias obtidas utilizando o programa MFOLD.

5.3.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-2

Não foi observada nenhuma evidência de evolução adaptativa atuando sobre qualquer um dos genes. A pressão evolucionária observada foi seleção purificadora. Nenhuma diferença significativa foi observada na média da relação d_N/d_S entre os genes (Tabela 7).

Tabela 7 - Pressões de seleção em DENV-2 com base em cada gene

| Gene | Nº de aminoácidos | d_N | d_S | $d_N/d_S (\omega)$ |
|----------|-------------------|--------|--------|--------------------|
| Capsídeo | 114 | 0.0018 | 0.0113 | 0.16 |
| Membrana | 166 | 0.0009 | 0.0161 | 0.06 |
| Envelope | 495 | 0.0026 | 0.0157 | 0.17 |
| NS1 | 352 | 0.0023 | 0.0157 | 0.15 |
| NS2A | 218 | 0.0021 | 0.0186 | 0.11 |
| NS2B | 130 | 0.0004 | 0.0186 | 0.02 |
| NS3 | 619 | 0.0008 | 0.0172 | 0.05 |
| NS4A | 150 | 0.0038 | 0.0199 | 0.19 |
| NS4B | 249 | 0.0015 | 0.0112 | 0.13 |
| NS5 | 899 | 0.0013 | 0.0188 | 0.07 |

Fonte: Da autora.

5.4 Análise de DENV-3

Vinte isolados primários de DENV-3 foram completamente sequenciados, representando amostras de 2002 a 2006 (Tabela 8). As amostras de DENV-3 fazem parte, em sua maioria, de uma coorte bem caracterizada e representam uma única epidemia. Para as mesmas estão disponíveis informações da forma clínica e tipo de infecção, além do ano de isolamento e localização (município).

Um total de 10705 nucleotídeos foram analisados em cada sequência, e a fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) foi localizada nas posições 95 a 10264, resultando em 3390 aminoácidos.

Com base nos alinhamentos obtidos, foi realizada a análise filogenética, análise de identidade, pressão de seleção e predição de estruturas secundárias de 5' e 3'UTR.

Tabela 8 - Amostras de DENV-3 isoladas em Pernambuco analisadas através do sequenciamento do genoma completo

| Nome da Amostra | Ano de Isolamento | Localização Município | Forma Clínica | Tipo de Infecção | Nº de acesso GenBank |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 85469/BR-PE/02* | 2002 | Recife | DC | Secundária | JX669490 |
| 81257/BR-PE/02* | 2002 | Recife | FHD | Secundária | JX669491 |
| 101905/BR-PE/03* | 2003 | Verdejante | FHD | Secundária | JX669489 |
| 145/BR-PE/04 | 2004 | Recife | FHD | Primária | JX669495 |
| 129/BR-PE/04 | 2004 | Olinda | DC | Secundária | JX669498 |
| 161/BR-PE/04 | 2004 | Recife | DC | Primária | JX669499 |
| 206/BR-PE/05 | 2005 | Recife | FHD | Secundária | JX669492 |
| 339/BR-PE/05 | 2005 | Recife | FHD | Primária | JX669493 |
| 277/BR-PE/05 | 2005 | Recife | FHD | Secundária | JX669494 |
| 255/BR-PE/05 | 2005 | Recife | DCC | Secundária | JX669497 |
| 249/BR-PE/05 | 2005 | Paulista | DCC | Primária | JX669500 |
| 263/BR-PE/05 | 2005 | Recife | DCC | Primária | JX669501 |
| 283/BR-PE/05 | 2005 | Recife | DCC | Primária | JX669502 |
| 314/BR-PE/05 | 2005 | Recife | DCC | Secundária | JX669503 |
| 603/BR-PE/06 | 2006 | Recife | FHD | Primária | JX669496 |
| 411/BR-PE/06 | 2006 | Recife | DC | Primária | JX669504 |
| 418/BR-PE/06 | 2006 | Recife | DCC | Secundária | JX669505 |
| 420/BR-PE/06 | 2006 | Recife | FHD | Secundária | JX669506 |
| 423/BR-PE/06 | 2006 | Jaboatão | DC | Primária | JX669507 |
| 424/BR-PE/06 | 2006 | Recife | DC | Primária | JX669508 |

Fonte: Da autora.

Legenda: * Amostras oriundas do Banco de vírus do LACEN-PE.

5.4.1 Análise Filogenética de DENV-3

A árvore filogenética foi construída através de máxima verossimilhança, utilizando-se o modelo GTR+G+I, escolhido com a utilização do Modeltest (Mega 5.1). Para fins de comparação, foram incluídas 166 sequências de genomas completos disponíveis no GenBank, representando os genótipos que circulam atualmente em todo o mundo.

A análise filogenética dos vírus dengue sorotipo 3 circulantes no estado de Pernambuco durante os anos de 2002 a 2006, demonstrou que todos os isolados estudados pertencem ao Genótipo III (Figura 7). A origem dos vírus que circularam em Pernambuco neste período possivelmente se deu pela introdução de uma cepa oriunda do Rio de Janeiro, que provavelmente foi importada das ilhas do Caribe.

Apesar de um isolado (o 129D3-DC) se localizar em um ramo mais distanciado, o *bootstrap* encontrado (57%) não sustenta a existência de uma linhagem diferente.

5.4.2 Análise das sequências de DENV-3

A média da identidade entre as cepas de Pernambuco e, entre elas e a cepa BR/02 (AY679147), isolada no Rio de Janeiro e utilizada como referência, foi de 99,6% (Tabela 9). A média de similaridade entre os aminoácidos foi de 99,7%.

O teste D-Tajima mostrou que todas as mutações foram seletivamente neutras (-0,874759).

Um total de 226 alterações nucleotídicas foi observada ao longo de todo o genoma dos isolados.

A porção 5'UTR dos isolados analisados apresentou duas alterações nucleotídicas (0,9%). Uma das alterações nucleotídicas ocorreu no nucleotídeo 9 (A→G) de todos os isolados de Pernambuco, mas não foi observada na cepa referência (BR/02) e foi a responsável pela predição de estruturas secundárias diferentes (Figura 8). A outra alteração foi observada no nucleotídeo 65 (A→G) da amostra 249/BR-PE/05. Esta troca de nucleotídeo não alterou a predição da estrutura secundária deste isolado.

As demais alterações nucleotídicas encontradas ocorreram 31,8% em genes estruturais, 64,2% em não-estruturais e 3,1% em 3'UTR.

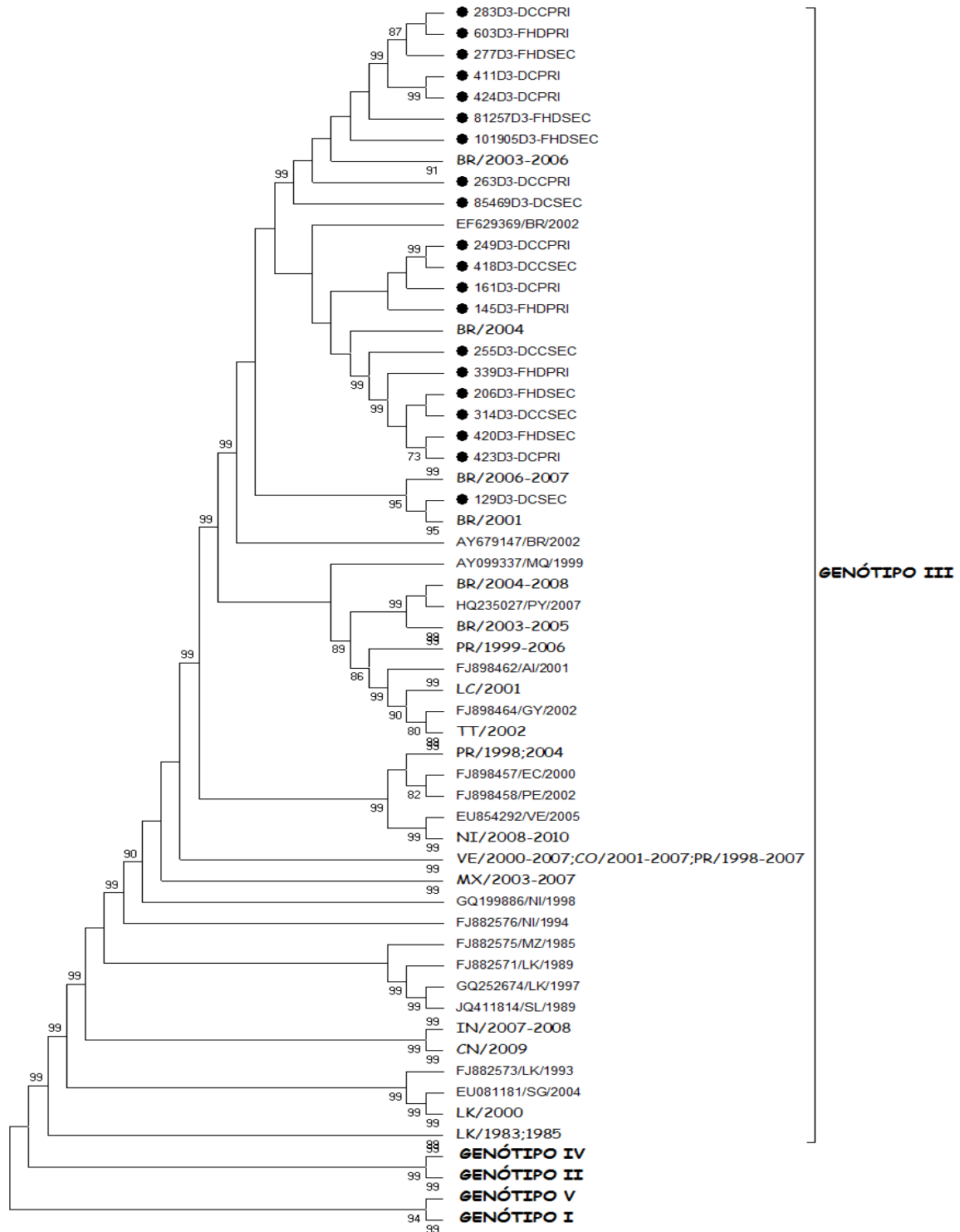
Não foram encontradas inserções ou deleções. A maioria das alterações nucleotídicas (64,5%) ocorreu na posição do terceiro códon e foram silenciosas.

Comparando com a cepa BR/02, foram observadas 31 substituições de aminoácidos (Quadros 14 e 15). Dessas, 12 (38,7%) foram encontradas em proteínas estruturais, enquanto que 19 (61,3%) ocorreram em proteínas não-estruturais. A maioria dessas substituições ocorreu em NS5 (22,6%) e NS2A (16,1%) e 35,5% do total delas resultou em alteração da classe dos aminoácidos (não conservativas). Nenhuma substituição de aminoácidos foi observada em NS2B.

Cinco alterações de aminoácidos foram observadas em todos os isolados de Pernambuco: E-R391K, NS3-E568Q, NS4A-K20R, NS5-R389K e NS5-L864P.

Nenhuma das substituições, nucleotídicas ou de aminoácidos, foi específica da forma clínica ou tipo de infecção.

Figura 7 - Árvore filogenética baseada em 186 seqüências do genoma completo de DENV-3.



Fonte: Da autora.

Nota: Máxima verossimilhança com GTR+G+I como modelo evolucionário. Valores de *bootstrap* (1000 réplicas) < 70% não mostrados. O nome dos isolados utilizados para comparação incluem número de acesso do GenBank, país de origem (sigla) e ano de isolamento.

Legenda: ● Isolados de Pernambuco.

Tabela 9 - Identidade entre sequências de amostras de DENV-3 isoladas no estado de Pernambuco e a sequência BR/02

| Sequência | 905/ 2003 | 469/ 2002 | 257/ 2002 | 206/ 2005 | 339/ 2005 | 277/ 2005 | 145/ 2004 | 603/ 2006 | 255/ 2005 | 129/ 2004 | 161/ 2004 | 249/ 2005 | 263/ 2005 | 283/ 2005 | 314/ 2005 | 411/ 2006 | 418/ 2006 | 420/ 2006 | 423/ 2006 | 424/ 2006 | BR/02 |
|-----------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| 905/2003 | - | ^a 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% |
| 469/2002 | ^b 100% | - | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 257/2002 | 100% | 100% | - | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 206/2005 | 100% | 100% | 100% | - | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| 339/2005 | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| 277/2005 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | - | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| 145/2004 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | - | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 603/2006 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| 255/2005 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | - | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| 129/2004 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | - | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% |
| 161/2004 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | - | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| 249/2005 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | - | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% |
| 263/2005 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | - | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% |
| 283/2005 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | - | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| 314/2005 | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 100% | 100% | 99% | 100% |
| 411/2006 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% |
| 418/2006 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | - | 99% | 99% | 99% | 100% |
| 420/2006 | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 99% | - | 100% | 99% | 99% |
| 423/2006 | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 99% | 100% | - | 99% | 99% |
| 424/2006 | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 99% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | - | 99% |
| BR/02 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 100% | 99% | 100% | 100% | 100% | 100% | 99% | 99% | 100% | 99% | 100% | 99% | 99% | 99% | - |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank da cepa BR/02 utilizada para comparação: AY679147. Percentuais determinados através do BLAST - Programa BioEdit 7.0.8.0.

Legenda: ^a = Percentual de identidade entre aminoácidos (negrito); ^b = Percentual de identidade entre nucleotídeos.

Quadro 14 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-3 (proteínas estruturais)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 85469/BR-PE/02 | 81257/BR-PE/02 | 101905/BR-PE/03 | 145/BR-PE/04 | 129/BR-PE/04 | 161/BR-PE/04 | 206/BR-PE/05 | 339/BR-PE/05 | 277/BR-PE/05 | 255/BR-PE/05 | 249/BR-PE/05 | 263/BR-PE/05 | 283/BR-PE/05 | 314/BR-PE/05 | 603/BR-PE/06 | 411/BR-PE/06 | 418/BR-PE/06 | 420/BR-PE/06 | 423/BR-PE/06 | 424/BR-PE/06 | BR/02 |
|------|---------------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| C | 45 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | R | * | * | * | * | * | R | * | * | * | K |
| C | 103 | * | * | * | F | F | * | * | * | * | * | * | * | * | * | F | * | * | F | F | * | L |
| M | 31 | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | T | * | T | T | * | * | * | T | I |
| M | 290 | * | * | * | * | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | P |
| E | 124 | * | * | * | * | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | P |
| E | 301 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | * | * | * | * | * | T |
| E | 325 | R | R | R | * | * | * | * | * | R | * | * | R | R | * | R | R | * | * | * | R | K |
| E | 345 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | Y | * | * | H |
| E | 380 | * | * | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I |
| E | 385 | * | * | * | * | * | * | * | * | S | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L |
| E | 391 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | R |
| E | 499 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | * | * | I |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank das cepa BR/02 utilizada para comparação: AY679147.

Legenda: C= Capsídeo; M= Membrana; E= Envelope; (aa) = Aminoácidos; R= Arginina; K= Lisina; F= Fenilalanina; L= Leucina; T= Treonina; I= Isoleucina; S= Serina; P= Prolina; A= Alanina; Y= Tirosina; H= Histidina; V= Valina.

Quadro 15 - Substituição de aminoácidos entre as cepas de DENV-3 (proteínas não estruturais)

| Gene | Posição Genoma (aa) | 85469/ BR- PE/02 | 81257/ BR- PE/02 | 101905/ BR- PE/03 | 145/ BR- PE/04 | 129/ BR- PE/04 | 161/ BR- PE/04 | 206/ BR- PE/05 | 339/ BR- PE/05 | 277/ BR- PE/05 | 255/ BR- PE/05 | 249/ BR- PE/05 | 263/ BR- PE/05 | 283/ BR- PE/05 | 314/ BR- PE/05 | 603/ BR- PE/06 | 411/ BR- PE/06 | 418/ BR- PE/06 | 420/ BR- PE/06 | 423/ BR- PE/06 | 424/ BR- PE/06 | BR/ 02 | |
|------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------|---|
| NS1 | 6 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | * | * | I | |
| NS1 | 324 | * | * | * | * | * | * | * | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | |
| NS2A | 37 | * | * | L | * | * | * | * | * | L | * | * | * | L | * | L | * | * | * | * | * | F | |
| NS2A | 40 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | L | F | |
| NS2A | 58 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |
| NS2A | 72 | * | * | * | * | * | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | |
| NS2A | 123 | * | * | I | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | |
| NS3 | 443 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | I | |
| NS3 | 568 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | E | |
| NS4A | 20 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | K |
| NS4A | 45 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |
| NS4B | 159 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | M | * | * | * | * | * | * | * | * | I | |
| NS5 | 233 | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | T | * | T | T | * | * | * | T | M | |
| NS5 | 251 | * | * | * | * | * | * | * | * | T | * | * | * | T | * | T | T | * | * | * | T | I | |
| NS5 | 365 | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | P | * | * | * | * | * | P | * | * | * | S | |
| NS5 | 389 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | R | |
| NS5 | 643 | * | * | * | V | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | I | |
| NS5 | 675 | * | * | * | * | G | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | A | |
| NS5 | 864 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | L | |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank das cepa BR/02 utilizada para comparação: AY679147.

Legenda: (aa) = Aminoácidos; V= Valina; I= Isoleucina; M= Metionina; L= Leucina; F= Fenilalanina; T= Treonina; Q= Glutamina; E= Glutamato ou Ácido Glutâmico; R= Arginina; K= Lisina; P= Prolina; S= Serina; G= Glicina; A= Alanina.

5.4.3 Predição de Estruturas Secundárias de 3'UTR dos isolados de DENV-3

A análise de 3'UTR dos isolados de DENV-3 demonstrou sete substituições nucleotídicas (Quadro 16). Nenhuma alteração foi específica dos isolados do estudo. Duas substituições (nucleotídeos 10289 e 10293) foram responsáveis pela localização das amostras 277/BR-PE/05, 283/BR-PE/05, 603/BR-PE/06, 411/BR-PE/06 e 424/BR-PE/06 em um único *cluster*.

Foram preditas quatro estruturas secundárias diferentes para os vinte isolados do estudo (Figura 9). Nenhuma das estruturas se relacionou com a forma clínica ou tipo de infecção.

5.4.4 Pressão de Seleção sobre os genes do genoma de DENV-3

Não foi observada nenhuma evidência de evolução adaptativa atuando sobre qualquer um dos genes. A pressão evolucionária observada foi seleção purificadora, apesar de se ter observado maior média de relação d_N/d_S no gene membrana (Tabela 10).

Tabela 10 - Pressões de seleção em DENV-3 com base em cada gene

| Gene | Nº de aminoácidos | d_N | d_S | $d_N/d_S (\omega)$ |
|----------|-------------------|----------|-------|--------------------|
| Capsídeo | 114 | 0.000012 | 0.004 | 0.003 |
| Membrana | 166 | 0.000996 | 0.003 | 0.332 |
| Envelope | 495 | 0.000128 | 0.005 | 0.026 |
| NS1 | 352 | 0.000095 | 0.004 | 0.024 |
| NS2A | 218 | 0.000017 | 0.005 | 0.003 |
| NS2B | 130 | 0.000006 | 0.002 | 0.003 |
| NS3 | 619 | 0.000263 | 0.004 | 0.066 |
| NS4A | 150 | 0.000013 | 0.003 | 0.004 |
| NS4B | 249 | 0.000018 | 0.004 | 0.005 |
| NS5 | 899 | 0.000294 | 0.004 | 0.007 |

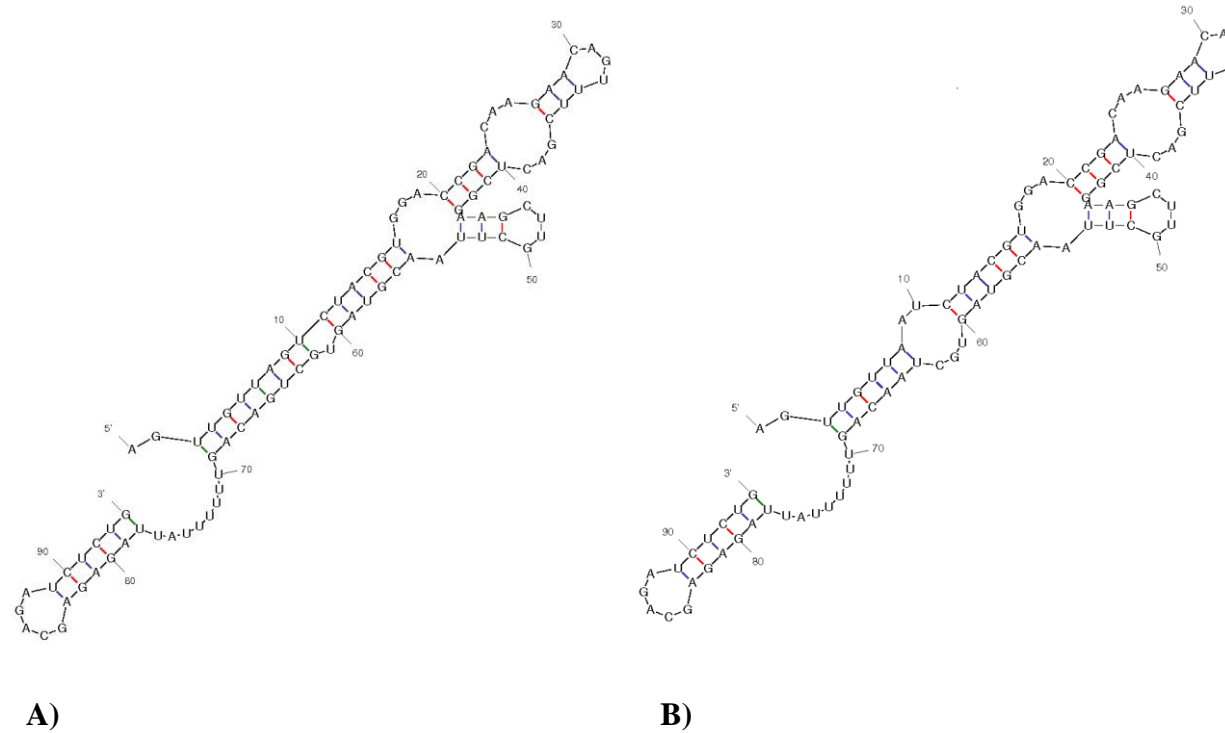
Fonte: Da autora.

Quadro 16 - Diferenças nos nucleotídeos de 3'UTR de DENV-3 entre os isolados de Pernambuco e BR/02.

| Posição Nucleotídeo | 85469/ BR- PE/02 | 81257/ BR- PE/02 | 101905/ BR- PE/03 | 145/ BR- PE/04 | 129/ BR- PE/04 | 161/ BR- PE/04 | 206/ BR- PE/05 | 339/ BR- PE/05 | 277/ BR- PE/05 | 255/ BR- PE/05 | 249/ BR- PE/05 | 263/ BR- PE/05 | 283/ BR- PE/05 | 314/ BR- PE/05 | 603/ BR- PE/06 | 411/ BR- PE/06 | 418/ BR- PE/06 | 420/ BR- PE/06 | 423/ BR- PE/06 | 424/ BR- PE/06 | BR/ 02 |
|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| 10289 | T | T | T | T | T | T | T | T | C | T | T | T | C | T | C | C | T | T | T | C | T |
| 10293 | C | C | C | C | C | C | C | C | T | C | C | C | T | C | T | T | C | C | C | T | C |
| 10380 | C | C | C | C | C | C | T | T | C | T | C | C | C | T | C | C | C | T | T | C | C |
| 10432 | T | T | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | C | T | T | T | T | T | T |
| 10472 | A | A | A | G | G | G | G | G | A | G | G | A | A | G | A | A | G | G | G | A | A |
| 10482 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | T | C | C | C | T | C |
| 10598 | T | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |

Fonte: Da autora.

Nota: N° de acesso GenBank das cepa BR/02 utilizada para comparação: AY679147.

Figura 8 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 5' UTR de DENV-3

Fonte: Da Autora.

Nota: A) Isolados de Pernambuco. B) Cepa referência BR/02 (Nº de acesso GenBank: AY679147). Estruturas secundárias obtidas utilizando o programa MFOLD.

Figura 9 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-3 (Continua)

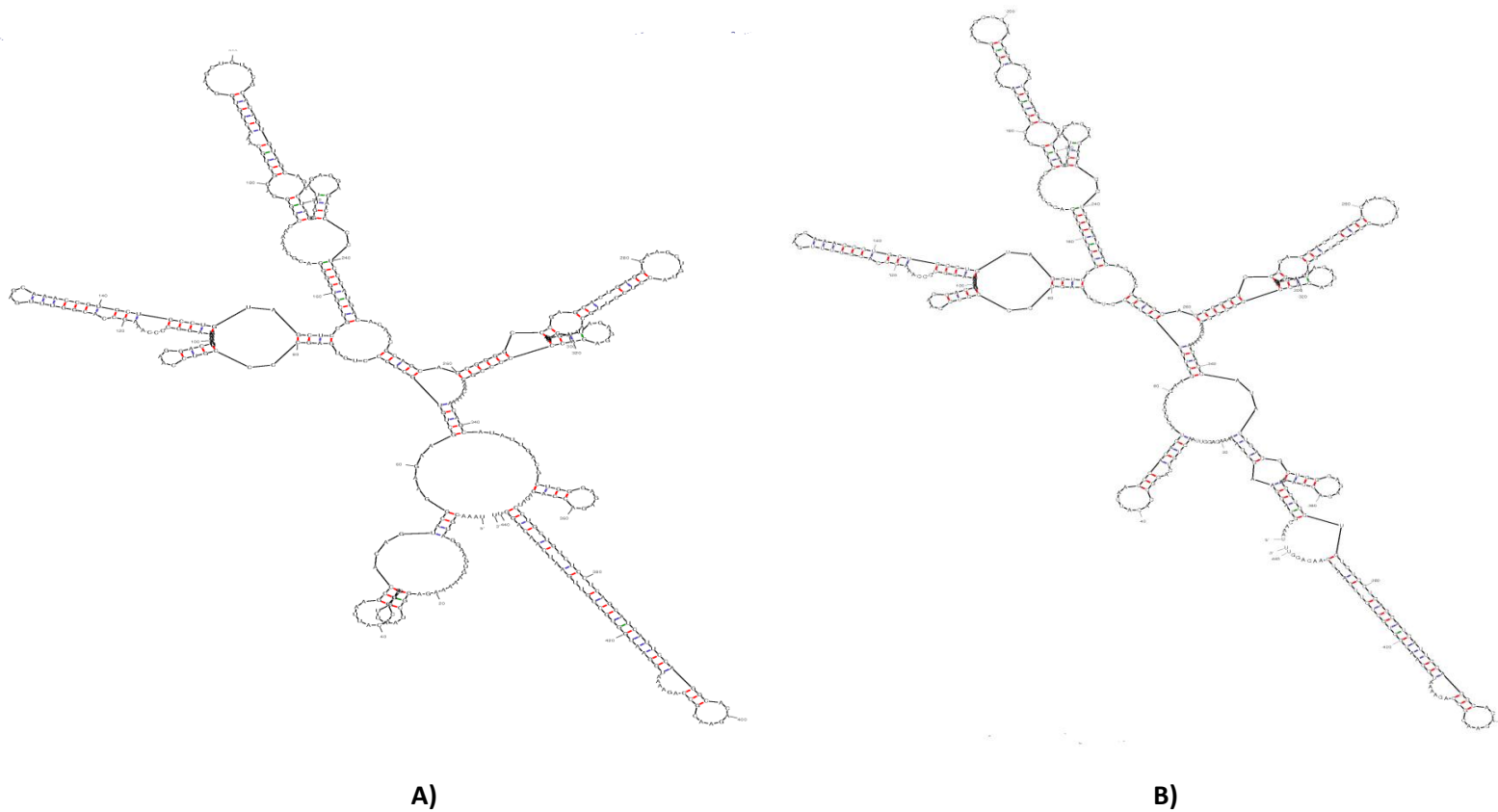
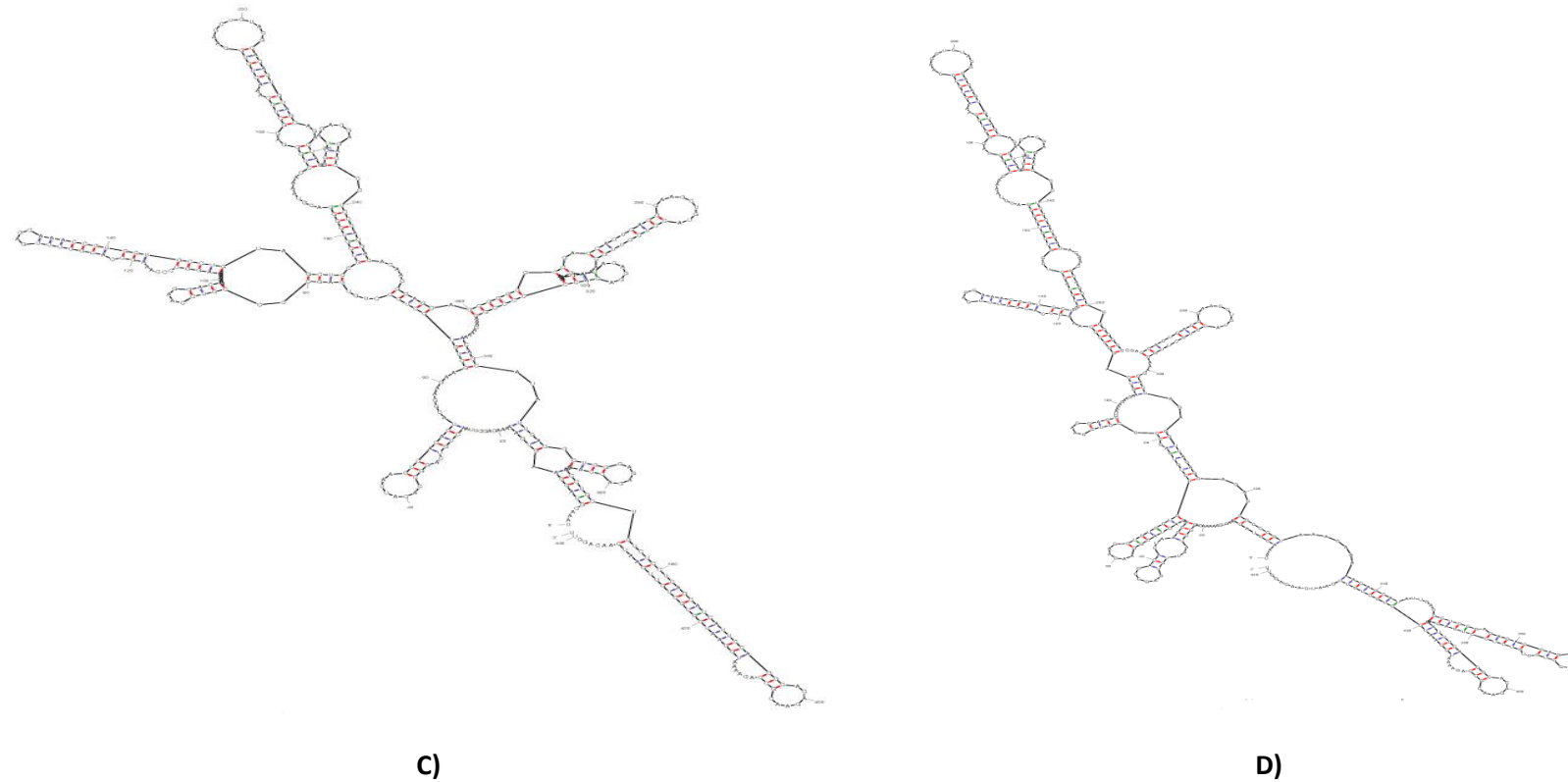


Figura 9 - Predição das Estruturas Secundárias do RNA através do sequenciamento completo de 3'UTR de DENV-3 (Conclusão)

Fonte: Da Autora.

Nota: A) Isolados 277/BR-PE/05; 283/BR-PE/05 e 603/BR-PE/06. B) Isolados 129/BR-PE/04; 145/BR-PE/04; 161/BR-PE/04; 206/BR-PE/05; 249/BR-PE/05; 255/BR-PE/05; 314/BR-PE/05; 339/BR-PE/05; 420/BR-PE/06; 418/BR-PE/06 e 423/BR-PE/06. C) Isolados 263/BR-PE/05; 81257/BR-PE/02; 101905/BR-PE/03 e 85469/BR-PE/03. D) Isolados 411/BR-PE/06 e 424/BR-PE/06. Estruturas secundárias obtidas utilizando o programa MFOLD.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O Programa de Vigilância Epidemiológica da Dengue em Pernambuco foi criado em 1986, após a reintrodução da dengue no Brasil, no estado do Rio de Janeiro. Este programa visava evitar a introdução do DENV-1 no estado, instituindo o monitoramento de casos suspeitos de dengue através da implantação de medidas que focavam no combate ao vetor e na vigilância laboratorial. Esses esforços não se mostraram eficientes, uma vez que ainda naquele ano foram registrados os primeiros casos de infecção por DENV-1 em Pernambuco, considerados na época como importados dos estados do Rio de Janeiro e Alagoas (CORDEIRO, 2008).

Os primeiros casos autóctones de Pernambuco foram confirmados em abril de 1987, com o surto controlado no mesmo ano. Se iniciaria a partir de então um período de sete anos sem registro de casos autóctones no estado, apesar da confirmação da presença do vetor (CORDEIRO, 2008; MOTA, 2001).

Em 1994, teria início a segunda epidemia no estado, desta vez por DENV-2. A partir daí, os dois sorotipos (1 e 2) passaram a circular simultaneamente, alternando a predominância entre eles (CORDEIRO, 2008).

Em 2002, encontrando uma população totalmente susceptível, instalou-se de forma explosiva a epidemia de DENV-3. Este sorotipo predominou no estado até o ano de 2008, quando voltou a aumentar o número de isolamentos do DENV-2. Nos anos de 2010 e 2011, o DENV-1 passou novamente a ser predominante (BRASIL, 2012a; CORDEIRO, 2008).

Com a introdução do DENV-4 em 2011, o estado passaria a ter em circulação os quatro sorotipos e uma nova substituição no sorotipo mais frequentemente isolado (BRASIL, 2012b).

Para este estudo foram selecionados 48 isolados, sendo quinze de DENV-1, treze de DENV-2 e vinte de DENV-3, representando o período de 1995 a 2010. Portanto, não foi incluído o DENV-4, pois este apenas foi isolado no estado a partir de 2011.

Análise Filogenética do Dengue 1 - Como já era esperado, todos os isolados do estudo foram incluídos no genótipo V, pois este tem sido o único genótipo de DENV-1 a circular nas Américas. No entanto, três linhagens foram observadas nos isolados analisados.

A linhagem I (1996-2002), apresentou-se dividida em dois sub-clados e ambas se encontram relacionadas com a cepa BR-90 (AF226685), oriunda do Rio de Janeiro. Essa é a provável origem das cepas isoladas em Pernambuco nesse período.

Analisando cinco genomas completos de DENV-1 isolados em Buenos Aires, em 2000, Barrero e Mistchenko (2004) também encontraram características filogenéticas que ligavam as suas amostras ao isolado brasileiro (BR/90). Estes achados reforçam a importância do Rio de Janeiro como rota de introdução e distribuição dos vírus dengue.

As linhagens II e III são representadas por isolados que circularam no ano de 2010. A linhagem II apresentou-se relacionada com cepas oriundas da Colômbia e Venezuela. Já a linhagem III mostrou relação com uma cepa das Ilhas Virgens (1985), e também com um isolado de Cingapura, sugerindo possível origem a partir do Caribe e/ou Ásia.

No Brasil, a circulação de múltiplas linhagens de DENV-1 foi anteriormente relatada por Santos et al. (2011), utilizando isolados do Rio de Janeiro e sequenciamento baseado no gene E e por Bona et al. (2012), que também utilizaram sequenciamento parcial (C/prM) para análise de isolados do estado do Paraná.

Estudos em várias regiões do mundo também têm demonstrado a existência de várias linhagens de DENV-1, ainda que com a persistência de um único genótipo ao longo dos anos (DOMINGO et al., 2006; DUONG et al., 2011; HWANG et al., 2003; KUKRETI et al., 2009; MENDEZ et al., 2010; OHAINLE et al., 2011; THU et al., 2004; WU et al., 2011), correlacionando-se ou não com o aumento de casos graves.

Gonçalves et al. (2002) também estudaram a evolução de DENV-1 na Venezuela e compararam as sequências dessas amostras virais, com outras provenientes de várias localidades do mundo, encontrando uma similaridade de 96,7%. Estes autores registraram a circulação nesse país do genótipo americano (Genótipo V), que tem mostrado potencialidade para causar, indistintamente, ambas as formas clínicas da doença (DC e FHD/SCD). Em estudos com isolados também da Venezuela (1990 a 1997), Salas et al. (1998) sugeriram a possibilidade de que o aumento no número de casos graves registrados no país em 1989 tenha sido devido à introdução do genótipo asiático, em substituição ao genótipo autóctone americano.

Em Pernambuco, o número de casos graves de dengue aumentou acentuadamente nos últimos vinte anos, culminando em 2010 (BRASIL, 2012b). Apesar de sua possível contribuição para este aumento, o mesmo não pode ser atribuído unicamente à circulação de mais de uma linhagem de DENV-1 e/ou substituição por outra, uma vez que outros fatores, como a circulação concomitante de mais de um sorotipo, estado imunológico da população e sequência de sorotipo predominante, possivelmente devam ter atuado.

Análise Filogenética do Dengue 2 - Com relação à análise filogenética do DENV-2, identificou-se o genótipo Sudeste Asiático/Americano como único genótipo circulante em Pernambuco durante o período de 1995-2010. Este genótipo é reconhecido por seu grande impacto epidemiológico e sua introdução em uma região geralmente lhe garante a sobreposição aos demais genótipos deste sorotipo (RICO-HESSE, 2007).

Duas linhagens diferentes foram observadas. A linhagem I, referente aos isolados de 1995 a 2002 teve sua origem provável a partir da Venezuela e foi substituída pela linhagem II. Esta, representando os isolados de 2010, provavelmente se originou a partir da Jamaica.

As origens desses isolados também foram relatadas por Romano et al (2010) e Carrington et al. (2005), os quais acreditam que o DENV-2 nas Américas tenha sofrido uma evolução *in situ*.

Em um estudo utilizando isolados do Rio de Janeiro, Oliveira et al. (2010) também relataram a existência de duas linhagens de DENV-2. Juntamente com Aquino et al. (2008), estes autores sugerem que a introdução de uma nova variante de DENV-2 tem relação com a substituição do sorotipo predominante de DENV-3 para DENV-2, justificando-se a epidemia de 2008 ocorrida no Rio de Janeiro. Apesar de no estado de Pernambuco não ter sido registrada a predominância do sorotipo 2, o DENV-3 era também anteriormente o sorotipo que predominava.

Há uma considerável diversidade genética entre os genótipos de DENV-2, refletindo sua contínua divergência e distribuição geográfica diversa (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Uma consistente característica da emergência de epidemias de FHD/SCD no Pacífico e Caribe tem sido a introdução do vírus dengue de origem asiática (WHITE, 1999).

Estudos filogenéticos têm demonstrado que o genótipo do DENV-2 nativo das Américas está associado com casos de dengue em sua forma branda, enquanto o do Sudeste Asiático com casos de FHD (LEITMEYER et al., 1999). No entanto, análises recentes indicam que epidemias deste genótipo nos anos 70 em Porto Rico, Tahiti, Nova Caledônia e Niue incluíram dengue grave (CHEN; VASILAKIS, 2011).

Estudos epidemiológicos realizados no Peru (LEITMEYER et al., 1999), demonstraram que durante um período de quatro anos com ocorrência de casos de dengue, apesar do índice de 75% de casos com infecções sequenciais (secundárias), não houve registro de casos de FHD, tendo sido constatado que o DENV-2, genótipo do Sudeste Asiático ainda não havia sido introduzido no país.

Nas Américas, os primeiros casos de FHD ocorreram somente após a epidemia de Cuba em 1981, coincidindo com a introdução do genótipo Sudeste da Ásia, oriundo do Vietnã (CHEN; VASILAKIS, 2011; GUZMÁN et al., 1999).

A virulência deste genótipo é maior do que a da cepa nativa das Américas, tem maior infectividade para *Aedes aegypti* e é capaz de produzir maiores níveis de viremia em humanos (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005; LEITMEYER et al., 1999; RICO-HESSE et al., 1997). Cepas deste genótipo foram responsáveis pelas principais epidemias com patogenicidade aumentada nas Américas (CHEN; VASILAKIS, 2011).

Adicionalmente, a linhagem da Jamaica representa, conhecidamente, amostra com alto potencial para causar doença grave, principalmente em áreas onde DENV-1 e DENV-4 tenham circulado previamente (VORNDAM et al., 1994).

Apesar de algumas cepas poderem persistir e evoluir localmente, o fator fundamental para a dinâmica das epidemias de DENV-2 no estado parece ter sido a introdução de nova cepa.

Estes resultados alertam para a importância do monitoramento da introdução de novos genótipos/linhagens em uma determinada localidade. Rápidas substituições de genótipos ou linhagens podem ocorrer e são atribuídas à vantagem de aptidão - *fitness*, com consequente maior habilidade para alcançar viremias mais elevadas em humanos, levando a uma taxa aumentada de transmissão homem-mosquito.

Análise Filogenética do Dengue 3 - Os vírus dengue sorotipo 3 circulantes no estado de Pernambuco durante o período de 2002 a 2006 foram todos incluídos no genótipo III.

A análise filogenética de DENV-3 demonstrou que a origem dos vírus que circularam em Pernambuco neste período, possivelmente, se deu pela introdução de uma cepa proveniente do Rio de Janeiro, provavelmente oriunda das ilhas do Caribe.

A dispersão do DENV-3 do sudeste para o nordeste do país também foi relatada por Cruz et al. (2010) em um estudo baseado na cronologia de isolamento do vírus no Brasil. Tem sido sugerido que a introdução do genótipo III nas Américas tenha ocorrido através do México e de lá esses vírus se espalharam para outros países da região, usando rotas de migração para alcançar o Caribe e países da América Central (ARAÚJO et al., 2009a). Pelo menos quatro introduções separadas do genótipo III ocorreram no país (ARAÚJO et al., 2012).

O genótipo III de DENV-3 é o mais disperso de todos os genótipos desse sorotipo. A introdução deste genótipo no hemisfério ocidental coincidiu com epidemias explosivas e uma incidência aumentada da forma grave da dengue (CHEN; VASILAKIS, 2011).

A reemergência de uma cepa considerada endêmica foi observada como sendo responsável pela epidemia de DENV-3 na Indonésia (ONG et al., 2008).

Baseando-se em análise filogenética, Messer et al. (2003) demonstraram que isolados de FHD do genótipo III que circulavam no Sri Lanka em 1989 formavam grupos geneticamente distintos, sugerindo que a genética viral desempenha um papel em FHD.

Além do genótipo III de DENV-3, tem sido relatada a circulação dos genótipos I (Minas Gerais) e V (região norte) durante as epidemias de 2002-2004 no Brasil (NOGUEIRA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2008). Nenhum dos isolados de Pernambuco foi incluído nestes genótipos.

Ainda que o genótipo I também tenha sido encontrado circulando na Colômbia (USME-CIRO et al., 2008), estes isolados (Minas Gerais e Colômbia) foram incluídos no genótipo V em análise filogenética realizada por Araújo et al. (2009b) e Aquino et al. (2009).

Vasilakis et al. (2011) acreditam ser altamente provável que os isolados brasileiros, juntamente com os isolados da China (1980 e 1989), incluídos no novo genótipo V de DENV-3, são resultado de uma contaminação laboratorial, decorrente da rápida taxa de substituição de nucleotídeos característica dos vírus dengue. Isso porque, segundo esses autores, não se poderia explicar como essas cepas poderiam estar relacionadas com a cepa protótipo (Filipinas) isolada há quase cinquenta anos atrás.

Estes achados reforçam a necessidade de mais estudos moleculares e da padronização da classificação dos genótipos/linhagens do vírus dengue.

Ao analisar a árvore filogenética do DENV-3 em conjunto com dados epidemiológicos, Lanciotti et al. (1994) observaram uma correlação entre a gravidade da doença e o genótipo do vírus. O genótipo III do DENV-3 foi associado às epidemias de FHD no Sri Lanka e Índia e com casos de FHD e óbitos no México e em países da América Central. Por outro lado, Castro-Jorge, Jorge e Fonseca (2008), estudando isolados de São Paulo obtidos no período de 2003 a 2008, não observaram associação entre o genótipo de DENV-3 e FHD.

A árvore filogenética mostrou que os isolados de DENV-3 de Pernambuco, durante o período de 2002 a 2006, pertencem todos a uma mesma linhagem e a distribuição de seus ramos não permitiu identificar nenhuma associação com a forma clínica da doença ou tipo de infecção.

Análise das sequências - A comparação de sequências virais entre isolados epidêmicos de dengue de diferentes graus de gravidade podem fornecer informações importantes sobre a base molecular do potencial epidêmico do vírus (KING et al., 2008).

Substituições em nucleotídeos e aminoácidos foram encontradas ao longo dos genomas dos isolados estudados. Elas resultaram em alteração da polaridade e da carga desses aminoácidos.

Quatro substituições no genoma de DENV-1 foram observadas apenas nos isolados estudados: NS2A-A97T, NS3-S465N, NS5-V114I e NS5-I784V, sugerindo a evolução *in situ* destas amostras, apesar da nova introdução de cepa em 2010.

Imrie et al. (2010) analisaram genomas completos de DENV-1 isolados de pacientes com dengue clássica e febre hemorrágica, provenientes do Havaí e da Polinésia Francesa. Apesar de encontrarem diversas substituições de aminoácidos em todo o genoma, nenhuma delas foi identificada como determinante de virulência.

A presença de uma valina encontrada na posição 29 da proteína da membrana das amostras da linhagem III de DENV-1 tem sido associada com a atenuação em uma vacina construída a partir de um clone infeccioso de DENV-2 (KINNEY et al., 1997).

Santos et al. (2002) analisaram os genomas completos de isolados brasileiros de DENV-1 entre 1990 e 2001. Eles observaram acentuada conservação das proteínas estruturais, mas vinte e sete diferenças em aminoácidos das proteínas não-estruturais, algumas das quais também observadas neste estudo.

Alterações na glicoproteína E são consideradas de suma importância, pois a mesma é exposta na superfície do vírion e representa o antígeno viral dominante, que confere resposta imune protetora por estimular a produção de anticorpos neutralizantes, inibidores de neutralização e anti-fusão e é responsável pela fixação, fusão do vírus à membrana dos endossomos em pH ácido e montagem do vírus (CHEN et al., 1996).

Zulueta et al. (2006) encontraram diferenças em aminoácidos da glicoproteína E (domínio III) que determinaram sua antigenicidade e imunogenicidade em camundongos, achado com importantes implicações para o desenho de vacinas.

A linhagem III de DENV-1 também apresentou uma mutação na posição 338 da proteína E: uma serina (aminoácido hidrofóbico) foi substituída por uma leucina (aminoácido hidrofílico). Aminoácidos hidrofílicos são encontrados em sua maioria na superfície da proteína e estão envolvidos em interações imunológicas.

Um estudo comparativo realizado através de sequenciamento do genoma completo de amostras de DENV-2, isoladas de casos de DC e de FHD, demonstrou várias substituições de

nucleotídeos no gene que codifica a proteína estrutural E, resultando inclusive na troca de aminoácidos, além de substituições nas regiões não conservadas do genoma, entre as cepas associadas com DC e aquelas com o potencial de causar FHD. Estas diferenças estariam correlacionadas com a patogênese do vírus (RICO-HESSE et al., 1998).

Dentre os isolados de DENV-1 Pernambuco, apenas o 41111 foi caracterizado como FHD e apresentou substituições específicas em E-E62K, NS2A-A46G e NS4B-M28I.

A alteração na posição 390 da glicoproteína E é tida de fundamental importância pois é considerada como um marcador de virulência. Leitmeyer et al. (1999) verificaram que nela se situava a diferença entre os genótipos sudeste asiático e americano de DENV-2. Os isolados do sudeste asiático apresentaram asparagina (N) nesta posição, enquanto que os isolados do genótipo americano apresentaram um ácido aspártico (D).

Curiosamente, os isolados de Pernambuco utilizados neste estudo, bem como a amostra referência, apresentaram o aminoácido asparagina na posição 390 da proteína E. Mutações de ácido aspártico para asparagina têm sido relacionadas com atenuação viral (SANCHEZ; RUIZ, 1996). No entanto, nenhuma atenuação foi observada por Leitmeyer et al. (1999), enquanto que Ñez, Betoulle e Rios (2011) notaram que essa mutação foi fixada nos isolados de DENV-2 da América Central desde 1999 e juntamente com Vasilakis et al. (2007) não encontraram evidência de seleção positiva nesta posição do genoma.

As substituições de aminoácido na posição 380 da proteína E de DENV-3 do isolado 129/BR-PE/04(I →T) e todos os isolados de 2010 de DENV-2 (I →V) foram também encontradas por Zhang et al. (2005) e Twiddy, Woelk e Holmes (2002) e têm sido atribuídas a possível pressão de seleção sobre o tropismo celular (seleção positiva). Esta região está localizada na face distal do domínio de ligação do receptor. É um motivo exclusivo para arbovírus da família *Flaviviridae*.

Apenas o isolado 129/BR-PE/04 de DENV-3 apresentou uma serina na posição 124 da proteína do envelope. Esta alteração foi responsável pela classificação de cepas da Jakarta como genótipo I e foi atribuída a uma potencial vantagem no *fitness* (ONG et al., 2008). Alterações nesta posição também está relacionada com diminuição de infectividade em células BHK (PRESTWOOD et al., 2008).

Em trabalhos utilizando isolados de DENV-2 da Tailândia, Pandey e Igarashi (2000) e Pandey et al. (2000) encontraram associação entre gravidade da doença, diferenças moleculares e resposta imunológica do paciente. Três destas mutações se encontraram fixas nos genomas das amostras de Pernambuco e cepa de referência: NS1-D281E; NS2A-M41V e

NS3-M118T. No entanto, não foi possível fazer a associação com a forma clínica, uma vez que não se dispunha das informações necessárias para estas amostras.

Ainda que a sequência de aminoácidos das proteínas NS4A e NS4B apresentem acentuada heterogeneidade, os perfis hidrofílicos são marcadamente conservados entre os vírus dengue e flavivírus em geral (CHAMBERS et al., 1990).

A mutação na posição 17 da proteína NS4B observada nos isolados de DENV-2 mais antigos também foi encontrada por Leitmeyer et al. (1999). No entanto, essa alteração não afetou o perfil hidrofílico e sua importância na função proteica é desconhecida.

Apesar da relevância do gene NS5 por codificar uma proteína com importantes funções enzimáticas, a RNA polimerase, alterações em sua estrutura não tem sido relatada. Leitmeyer et al. (1999) encontraram diferenças que dizem respeito ao perfil hidrofílico e antigênico, mas não ficou clara a contribuição dessas alterações.

OhAinle et al. (2011) estudando cepas de DENV-2 da Nicarágua encontraram mutações em NS5 que acreditam estarem ligadas à aumentada habilidade de replicar de um determinado isolado. Eles ressaltam a mutação (R401K) no domínio RdRp, que pode afetar a eficiência da replicação de RNA.

Parameswaran et al. (2012) estudaram isolados de DENV-2 da Nicarágua e não encontraram associação entre viremia, mutações e gravidade da doença.

Várias mutações em NS5 foram específicas dos isolados de Pernambuco. Por outro lado, diversas substituições em NS5 de DENV-2 foram exclusivas dos isolados mais antigos (1995-2002). Estas alterações podem sinalizar para uma resposta adaptativa de DENV em um nível populacional (SCHMIDT et al., 2011). Além disso, uma região homóloga da proteína NS5 do vírus Langat (Flavivírus) do aminoácido 342 a 734 tem sido implicada na função de regulação de interferon (PARK et al., 2007).

Khan et al. (2012), realizaram uma revisão sistemática que tinha como objetivo identificar a associação entre mutação genética específica nos genomas de DENV-2 e DENV-3 e gravidade da doença durante epidemias no Sudeste da Ásia. Após analisar os resultados de doze trabalhos selecionados para o estudo, os autores concluíram que, apesar do crescimento da base de dados genômicos, ainda existem lacunas fundamentais para o entendimento das dinâmicas epidemiológica e evolucionária e sua relação com a gravidade da doença.

Pires Neto et al. (2005) encontraram mutações entre cepas de DENV-1 e DENV-2 de uma mesma região do Brasil, mas estas não se associaram com a forma clínica da doença.

Ainda que diversas alterações de nucleotídeos e de aminoácidos tenham sido observadas ao longo do genoma dos isolados de Pernambuco, nenhuma mutação foi relacionada à forma clínica da doença ou tipo de infecção.

5' e 3'UTR - As *UTRs* de vírus RNA polaridade positiva são previstas de se dobrarem formando estruturas *stem-loop* que interagem com proteínas celulares e virais. Mutações que modificam essas estruturas têm sido associadas com alteração de virulência e causam atenuação (MARKOFF, 2003).

Além disso, tem sido atribuída à 3'UTR de flavivírus uma atividade supressora de RNA interferente (RNAi), possivelmente aumentando a replicação viral (SCHNETTLER et al., 2012).

Castro et al. (2013) utilizaram o sequenciamento de 3'UTR para caracterizar genotipicamente isolados brasileiros de DENV-3 provenientes de soros humanos e mosquitos *Aedes aegypti* adultos. Estes isolados brasileiros foram incluídos no genótipo III.

5'UTR dos isolados de Pernambuco de DENV-1 não apresentou alteração nucleotídica. Em DENV-2, uma alteração nucleotídica foi observada na posição 77 (A→G), mas previu estruturas secundárias similares. No entanto, em DENV-3 uma única alteração na posição 9 (A→G) previu uma estrutura secundária diferente entre estes isolados e o isolado de referência. Leitmeyer et al. (1999) encontraram diferenças em 5'UTR (região entre os nucleotídeos 68-80) que poderiam estar envolvidas na iniciação da tradução.

Leitmeyer et al. (1999) sugeriram que variação na estrutura secundária na região 3'UTR foi em parte responsável pelas diferentes associações da doença entre os genótipos americano e asiático de DENV-2.

Mangada e Igarashi (1998), analisando UTR de DENV2 de isolados da Tailândia, encontraram completa homologia em 5'UTR e três alterações nos nucleotídeos de 3'UTR que alteraram características funcionais da estrutura secundária.

A alteração de nucleotídeo na posição 10386 (C→T) em 3'UTR de DENV-2, encontrada em 88,9% dos isolados mais antigos, foi observada por Leitmeyer et al. (1999) em cepas da Tailândia, mas não associou com a forma clínica da doença nem previu estrutura secundária diferente. Eles observaram que características conformacionais na região 3'UTR associaram com os genótipos estudados.

Por outro lado, Zhou et al. (2006) não encontraram associação entre estrutura secundária de 3'UTR de DENV e forma clínica da doença. Ainda assim, esses autores

acreditam que algumas mutações nesta região deva ter um importante impacto sobre o *fitness* viral.

Neste estudo, alterações nucleotídicas em 3'UTR previram estruturas secundárias específicas para a linhagem III de DENV-1. Mutações nessa região diferenciaram os isolados mais antigos dos mais recentes de DENV-2. E para DENV-3 essas substituições não se associaram com forma clínica e tipo de infecção.

Pressão de Seleção - A evolução de DENV é caracterizada por discretos *clusters* monofiléticos e geograficamente distintos, sugerindo ruptura de populações espacialmente contidas com limitada circulação de vários genótipos e ocasional, mas robusto fluxo gênico entre regiões geográficas (HOLMES, 2006).

Twiddy, Woelk e Holmes (2002) encontraram diferença de pressão de seleção entre os sorotipos, genótipos e proteínas virais de isolados da Ásia e cosmopolitas. Confirmando esses achados, Chao et al. (2005) encontraram forte seleção positiva atuando sobre o domínio III da glicoproteína E de DENV-3.

Analisando isolados de DENV-2 da América Central, Ñez, Morales-Betoulle e Rios (2011) encontraram seleção positiva em códons dos genes que codificam as proteínas do capsídeo, envelope, NS2A, NS3 e NS5.

Estudando isolados de DENV-3 oriundos de Taiwan, King et al. (2008) demonstraram diversidade genética e pressão de seleção positiva em diferentes genótipos em diversos sítios de genes não-estruturais, que possuem epítomos de células B e T.

Na análise de todos os isolados de Pernambuco a pressão evolucionária foi seleção purificadora. Este resultado também foi confirmado pelos baixos valores encontrados no teste de D-Tajima. Não foi observada qualquer evidência de evolução adaptativa atuando sobre os genes.

Um excesso de mutações sinônimas sobre não-sinônimas sugere que as proteínas estão sobre fortes restrições funcionais. O número de sítios variáveis tem sido observado ser significativamente mais alto durante períodos endêmicos que em períodos epidêmicos (DESCLOUX et al., 2009).

A maioria das alterações de aminoácidos em dengue deve ser deletéria, reduzindo o *fitness* e removendo-o da população viral (HOLMES, 2006).

É evidente que a cepa viral não é o único fator que determina a forma clínica de uma infecção pelo vírus dengue. Entre outros fatores, a introdução sequencial de sorotipos tem

contribuído para a alta incidência da doença. Holmes e Burch (2000) sugerem que no futuro o ser humano poderá vir a ser exposto a genótipos com maior potencial patogênico.

Dengue nas Américas tem uma clara estrutura geográfica que mantém a diversidade viral entre as epidemias (CARRINGTON et al., 2005). Mais estudos em localidades endêmicas serão necessários para o completo entendimento da evolução e epidemiologia do vírus dengue, sobretudo com relação à etiologia dos casos graves.

O sequenciamento completo dos genomas tornou possível identificar mutações de aminoácidos que são específicas dos isolados e/ou linhagens do estado de Pernambuco, que podem ser elementos virais genéticos que contribuem para sua contínua circulação na região e seu potencial epidêmico.

Este estudo demonstra a importância de estudos moleculares para o entendimento da origem e evolução do vírus dengue, sinalizando para a possível utilização dos mesmos como ferramenta de predição de epidemias em programas de vigilância epidemiológica.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- a) Os vírus dengue sorotipo 1 isolados durante o período de 1996 a 2010, em Pernambuco, pertencem ao Genótipo V.
- b) Neste período, circularam três linhagens diferentes de DENV-1: linhagem I (oriunda do Rio de Janeiro); linhagem II (Colômbia e Venezuela) e linhagem III (Ilhas Virgens e Cingapura).
- c) O genótipo Sudeste Asiático/Americano foi o único genótipo de DENV-2 a circular em Pernambuco, no período de 1995 a 2010.
- d) Duas linhagens diferentes de DENV-2 foram identificadas: a linhagem I (isolados de 1995 a 2002) teve sua origem provável a partir da Venezuela, e a linhagem II (isolados de 2010), provavelmente se originou a partir da Jamaica.
- e) A análise filogenética dos vírus dengue sorotipo 3 circulantes no estado de Pernambuco durante os anos de 2002 a 2006, demonstrou que os isolados pertencem todos ao Genótipo III.
- f) O DENV-3 que circulou em Pernambuco durante 2002 a 2006 possivelmente se originou da introdução de cepas provenientes do Rio de Janeiro, provavelmente oriunda das ilhas do Caribe.
- g) Nas amostras isoladas, não foi observada nenhuma linhagem do novo genótipo V do DENV-3.
- h) Substituições em nucleotídeos e aminoácidos foram encontradas ao longo dos genomas dos isolados estudados e resultaram em alteração da polaridade e da carga desses aminoácidos.
- i) Ainda que diversas alterações de nucleotídeos e de aminoácidos tenham sido observadas ao longo do genoma dos isolados de Pernambuco, nenhuma mutação foi relacionada à forma clínica da doença ou tipo de infecção.
- j) Apenas a 5'UTR de DENV-3 previu uma estrutura secundária diferente entre os isolados de Pernambuco e o isolado de referência.
- k) Alterações nucleotídicas em 3'UTR previram estruturas secundárias específicas para a linhagem III de DENV-1.
- l) Mutações em 3'UTR de DENV-2 diferenciaram os isolados mais antigos dos mais recentes.
- m) Substituições nucleotídicas em 3'UTR de DENV-3 não se associaram com forma clínica e tipo de infecção.

- n) Na análise de todos os isolados de Pernambuco a pressão evolucionária foi seleção purificadora.
- o) Sobre os genes dos vírus dengue analisados, não foi observada qualquer evidência de evolução adaptativa.

PERSPECTIVAS

8 PERSPECTIVAS

- a) Publicação dos resultados de DENV-2 e DENV-3;
- b) Extensão do trabalho para DENV-4;
- c) Investigar correlação entre as mutações encontradas neste estudo e demais estudos realizados por nosso grupo, tais como mapeamento de epítomos, produção de interferon, viremia, etc.
- d) Utilização dos dados obtidos em futuros projetos de pesquisa.
- e) Auxílio na vigilância epidemiológica de DENV.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, D. E. et al. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, London, v.339, p. 200-212, 2005.
- ÃNEZ, G.; MORALES-BETOULLE, M. E.; RIOS, M. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus Type 2 in Central America, Their Evolutionary Time-Scale and Selection Pressure Analysis. **PLoS One**, San Francisco, v.6, p.1-8, 2011.
- ÃNEZ, G. Molecular evolution of dengue virus: a necessary field of research. **Investigación Clínica**, Maracaibo, v.48, n.3, p.273-276, 2007.
- AQUINO, J. D. et al. New Genotype of Dengue Type 3 Virus Circulating in Brazil and Colombia Showed a Close Relationship to Old Asian Viruses. **PLoS One**, San Francisco, v.4, p.1-8, 2009.
- _____. Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 and 3 Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. **Virus Research**, Amsterdam, v.137, p.266-270, 2008.
- ARAÚJO, J. M. G. et al. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Washington, v.6, p.1-10, 2012.
- _____. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.9, p.716-725, 2009a.
- _____. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.104, p.526-529, 2009b.
- BARRERO, P. R.; MISTCHENKO, A. S. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. **Virus Research**, Amsterdam, v.101, p.135-145, 2004.
- BARTENSCLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, London, v. 3, n. 2, p. 155-165, 2008.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. Nucleic Acids Research, Oxford, v.41, p.36-41, 2013.
- BLOK, J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. **The Journal of General Virology**, London, v.66, p.1323-1325, 1985.
- BONA, A. C. D. et al. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, p.297-300, 2012.
- BRAVO, J. R. et al. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.81, n.5, p.816-820, 1987.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Balanço Dengue: Semana Epidemiológica 1 a 26 de 2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 1 set. 2012.

_____. **Casos graves confirmados, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-1991,1994-2011**. Brasília, 2012a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portalsaude>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

_____. **Casos notificados e internações por dengue/FHD, no Brasil, 1986-2010**. Brasília, 2011b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

_____. **Dengue: situação epidemiológica (de janeiro a abril de 2012)**. Brasília, 2012b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

_____. **Informe Epidemiológico da Dengue. Semanas 1 a 52 de 2009**. Brasília, 2010a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em 1 set. 2012.

_____. **Informe Epidemiológico da Dengue. Análise de situação e tendências - 2010**. Brasília, 2010b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em 1 set. 2012.

CARRINGTON, C. V. F. et al. Invasion and Maintenance of Dengue Virus Type 2 and Type 4 in the Americas. **Journal of Virology**, Baltimore, v.79; 14680-14687, 2005.

CASTRO, M. G. et al. Genetic variation in the 3' untranslated region of dengue virus serotype 3 strains isolated from mosquitoes and humans in Brazil. **Virology Journal**, London, v.10, p.1-11, 2013.

CASTRO-JORGE, L. A.; JORGE, D. M. M.; FONSECA, B. A. L. DENV-3 genotype III circulating in São Paulo, Brazil, from 2003 to 2008 is not associated with dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome. **Dengue Bulletin**, New Delhi, v.32, p.73-82, 2008.

CATTAND, P. et al. Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. In: JAMISON, D. T. **Disease Control Priorities in Developing Countries**, 2. ed. Washington: The World Bank Group, 2006. p. 451-466.

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

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

CHAO, D. et al. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. **Virology Journal**, London, v.2, p. 1-10, 2005.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue - Quo tu et quo vadis? **Viruses**, Basel, v.3, p. 1562-1608, 2011.

CHEN, Y. T. et al. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v.70, p.8765-8772, 1996.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of Virology**, Baltimore, v.79, p. 853-859, 2005.

CORDEIRO, M. T. **Evolução da dengue no estado de Pernambuco, 1987 – 2006: epidemiologia e caracterização molecular dos sorotipos circulantes**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 3328-3334, 2007b.

_____. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.40, n.6, p.605-611, 2007a.

CRUZ, A. C. R. et al. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 isolated in Brazil from 1991 to 2008. **Revista Pan -Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, p.25-34, 2010.

DE SIMONE, T. S. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, p. 553-562, 2004.

DESCLOUX, E. et al. Dengue 1 Diversity and Microevolution, French Polynesia 2001-2006: Connection with Epidemiology and Clinics. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Washington, v.3, p.1-15, 2009.

DEUBEL, V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p.335-365.

DIETZ, V. J. et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.131, n.4, p.693-701, 1990.

DOMINGO, C. et al. Use of a Short Fragment of the C-Terminal E Gene for Detection and Characterization of Two New Lineages of Dengue Virus 1 in India. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, p.1519-1529, 2006.

DUONG, V. Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, 2011.

FIGUEIREDO, L. B. et al. Dengue Virus 3 Genotype 1 Associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.14, p.314-316, 2008.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Dengue no Brasil: Planilha de casos notificados por UF e Regiões, no período 1981-2006**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 12 maio 2007.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, London, v. 324, p. 1563-1566, 2002.

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

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York : CAB International, 1997. p. 1-22.

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

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.1, n.2, p.55-7, 1995.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. **Emerging Themes in Epidemiology**, London, v. 2, p. 1-10, 2005.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, Washington, v.27, p. 1-3, 2003.

GUZMÁN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, p. S7-S16, 2010.

_____. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.8, n.2, p.69-80, 2004.

_____. DHF Epidemics in Cuba, 1981 and 1997: Some Interesting Observations, **Dengue Bulletin**, New Delhi, v.23, p.39-43, 1999.

_____. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.6, n.2, Jun, p.118-24, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v.41, p.95-98, 1999.

HALSTEAD, S. B. Dengue vaccine development: a 75% solution? **The Lancet.com**, Betheseda, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61510-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61510-4)>. Acesso em 23 set. 2012.

_____. Dengue Virus-Mosquito Interactions. **The Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 273-291, 2008.

HALSTEAD, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.

HALSTEAD, S. B. et al. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Reviews in Infectious Diseases**, Chicago, v.11 Suppl. 4, p.S830-839, 1989.

_____. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, n.3, p.180-183, 2001.

_____. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v.42, n.5, p.350-362, 1970.

HAMMON, W. M. C. D. et al. New hemorrhagic fevers of children in the Philipines and Thailand. **Transactions of the Association of American Physicians**, Philadelphia, v.73, p.140-155, 1960.

HANG, V. T. et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Severity, Specificity and Relationships to Viraemia and Antibody Responses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Washington, v.3, n.1, p.1-7, 2009.

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

HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.31, n.4, p.830-836, 1982.

HOLMES, E. C. RNA virus genomics: a world of possibilities. **The Journal of Clinical Investigations**, Ann Arbor, v.119, n.9, p. 2488-2495, 2009.

_____. The evolutionary biology of dengue virus. **Wiley Novartis Foundation Symposium 277**, Chichester, p.177-192, 2006.

HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.8, n.2, p.74-77, 2000.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam v.3, n.1, p.19-28, 2003.

HWANG, K-P. et al. Molecular Epidemiological Study of Dengue Virus Type 1 in Taiwan. **Journal of Medical Virology**, Washington, v.70, p.404-409, 2003,

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **The Journal of General Virology**, London, v.40, n.3, p.531-544, 1978.

IMRIE, A. et al. Homology of complete genome sequences for dengue virus type-1, from dengue-fever-and dengue-haemorrhagic-fever-associated epidemics in Hawaii and French Polynesia. **Annals of tropical Medicine & Parasitology**, Liverpool, v.104, p.225-235, 2010.

JONES, D. T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, Leibniz, v. 8, n.3, p.275-282, 1992.

KHAN, E. et al. Genetic Diversity of Dengue Virus and Associated Clinical Severity During Periodic Epidemics in South East Asia. In: Rodriguez-Morales (Ed.). **Current Topics in Tropical Medicine**, InTech, New York, 2012, p.92-108.

KIMURA, R.; HOTTA, S. Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi**, Tokyo, v.3379, p.629-633,1944.

KING, C. et al. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. **Virology Journal**, London, v.5, p.1-13, 2008.

KINNEY, R. M. S. et al. Construction of infectious cDNA clones for Dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivate, strain PDK-53. **Virology**, New York, v. 230, p.300-308, 1997.

KUKRETI, H. et al. Phylogenetics studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. **Virology Journal**, London, v.6, p. 1-9, 2009.

KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever : challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, Malden, v. 11, p. 301-311, 2001.

LANAVE, C. et al. A new method for calculating evolutionary substitution rates. **Journal of Molecular Evolution**, Heidelberg, v.20, p.86-93, 1984.

LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **The Journal of General Virology**, London, v.75, p.65-75, 1994.

_____. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, n.3, p.545-551, 1992.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.73, n.6, p.4738-47, 1999.

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment, and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, New York, v.16, n.1, p. 60-65, 2004.

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

MAIHURU, A.T.A. et al. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Heidelberg, v. 23, p. 425-433, 2004.

MANGADA, M. N.; IGARASHI, A. Molecular an In Vitro Analysis of Eight Dengue Type 2 Viruses Isolated from Patients Exhibiting Different Disease Severities. **Virology**, New York, v.244, p.458-466, 1998.

MARKOFF, L. 5' - and 3' - Noncoding Regions in Flavivirus RNA. **Advances in Virus Research**, New York, v.59, p.177-228, 2003.

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

MENDEZ, J. A. et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, London, v.7, p.1-12, 2010.

MESSER, W. B. et al. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.9, p.800-809, 2003.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.35, n.8, p.869-872, 2002.

_____. Molecular epidemiology of DEN-2 virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n.5, p.625-626, 1998.

MONATH, T. P. et al. Geographic classification of dengue-2 virus strains by antigen signature analysis. **Virology**, New York, v.154, n.2, p.313-324, 1986.

MOTA, M. C. B. Estudo da epidemia de dengue no estado de Pernambuco: Construção de um indicador composto de risco para a doença. 2001. **Dissertação** (Mestrado) - Núcleo de Saúde Pública, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 13-22, 2005.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, New Delhi, v.33, n.1, p.68-71,2002.

_____. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.7, p.925-926, 2001.

_____. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, p.483-488, 2008.

_____. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, n.2, p.253,1990.

OHAINLE, M. et al. Dynamics of Dengue Disease Severity Determined by the Interplay Between Viral Genetics and Serotype-Specific immunity. **Science Translational Medicine**, New York, v.3, p.114-128, 2011.

OLIVEIRA, M. F. et al. Two Lineages of Dengue Virus Type 2, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.16, p.576-678, 2010.

ONG, S. H. et al. Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential - A proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. **Infection, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v.8, p.191-205, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**, Geneva, New Edition, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control**. Publicación Científica n.548, Washington, D.C., 1995, 109 p.

OSANAI et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.25, n.1, p.53-54, 1983.

PANDEY, B. D.; IGARASHI, A. Severity-Related Molecular Differences among Nineteen Strains of Dengue Type 2 Viruses, **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.44, p.179-188, 2000.

PANDEY, B. D. et al. Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 31, p.266-272, 2000.

PARAMESWARAN, P. et al. Genome-Wide Patterns of Intrahuman Dengue Virus Diversity Reveal Associations with Viral Phylogenetic Clade and interhost Diversity. **Journal of Virology**, Baltimore, v.86, p.8546-8558, 2012.

PARK, G. S. et al. Identification of residues critical for the interferon antagonist function of Langkat virus NS5 reveals a role for the RNA-dependent RNA polymerase domain. **Journal of Virology**, Baltimore, v.81, p.6939-6946, 2007.

PIRES NETO, R. J. et al. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, p. 843-852, 2005.

PRESTWOOD, T. R. et al. A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Disease in Mice by Establishing Increased Systemic Viral Loads, **Journal of Virology**, Baltimore, v.82, p.8411-8421, 2008.

RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and virulence models. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v.44, n.11, p.1462-1466, 2007.

_____. Dengue virus markers of virulence and pathogenicity. **Future Virology**, London, v. 4, n.6, p.581-593, 2009.

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

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

RICO-HESSE, R. L. et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, n.1, p.96-101, 1998.

_____. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v.230, n.2, p.244-251, 1997.

RIGAU-PÉREZ, J. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **The Lancet**, London, v.352, p. 971-977, 1998.

ROMANO, C. M. et al. Characterization of Dengue Virus Type 2: New Insights on the 2010 Brazilian Epidemic. **PLOS One**, San Francisco, v.5, p.1-5, 2010.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.26, n.3, p.337-343, 1977.

ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 113, p. 946-951, 2004.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, New York, v.257, n.1, p.1-6, 1999.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386.

SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, Balteseda, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61428-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61428-7)>. Acesso em: 23 set. 2012.

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, M. C. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, Washington, v.101, p.640-642, 1945.

SALAS R. et al. Serotipos y genotipos de virus dengue circulantes en Venezuela, 1990-1997. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v.49, p.33-37, 1998.

SANCHEZ, I. J.; RUIZ, B. H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. **Journal of General Virology**, London, v.77, p.2541-2545, 1996.

SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, London, v. 8, p. 1-4, 2011.

_____. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.991-995, 2002.

SANTOS, C. N. D. 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 Research**, Amsterdam, v.90, p. 197-205, 2002.

SCHATZMAYR, H. G. Aspectos Históricos da Dengue e de seus vetores. In: SOUZA, L. J. **Dengue. Diagnóstico, Tratamento e Prevenção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2008. p.1-10.

SCHATZMAYR, H. G. et al. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, n.2, p.245-246, 1986.

SCHMIDT, D. J. et al. A phylogenetic analysis using full-length viral genomes of South American dengue serotype 3 in consecutive Venezuelan outbreaks reveals a novel NS5 mutation. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.11, p.2011-2019, 2011.

SCHNETTLER, E. et al. Non-coding flavivirus RNA displays RNAi suppressor activity in insect and mammalian cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v.86, p.13486-13500, 2012.

SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n.1, p.48-53, 2005.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **The Lancet**, London, v.355, n.9209, p.1053-1059, 2000.

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

STREICKER, D. G. et al. Host phylogeny constrains cross-species emergence and establishment of rabies in bats. **Science**, Washington, v.329, p. 676-679, 2010.

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

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

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

USME-CIRO, J. A. et al. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia, **Virology Journal**, London, v.5, p.101-110, 2008.

VASILAKIS, N. et al. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. **Journal of Virology**, Baltimore, v.81, p.9591-9595, 2007.

_____. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.9, n.7, p.532-541, 2011.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The History and Evolution of Human Dengue Emergence. **Advances in Virus Research**, New York, v.72, p. 1-55, 2008.

VORNDAM, V.; KUNO, G.; ROSADO, N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.48, n.2-3, p.237-244, 1994.

VORNDAM, V. et al. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. **Archives of Virology**, Heidelberg, v.136, p.191-196, 1994.

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

WHITE, N. J. Variation in virulence of dengue virus. **The Lancet**, London, v.354, p.1401-1402, 1999.

WICHMANN, O. et al. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.9, n.9, p.1022-1029, 2004.

WU, W. et al. Molecular epidemiology of dengue viruses in southern China from 1978 to 2006. **Virology Journal**, London, v.8, p.1-9, 2011.

Ye, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, London, v.13, p.134-144, 2012.

ZHANG, C. et al. Clade Replacement in Dengue Virus Serotype 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. **Journal of Virology**, Baltimore, v.79, p.15123-15130, 2005.

ZHOU, Y. et al. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3' untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. **Journal of General Virology**, London, v.87, p.2595-2603, 2006.

ZUKER, M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. **Science**, Washington, v. 244, p. 48-52, 1989.

ZUKER, M. Mfold webserver for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.31, n.13, p.3406-3415, 2003.

ZULUETA, A. et al. Amino Acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. **Virus Research**, Amsterdam, v.121, p.65-73, 2006.

ANEXOS

Anexo A- Termo de Anuência Secretaria do Estado de Pernambuco



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO - SES

Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA - LACEN
"Dr. Milton Bezerra Sobral"



TERMO DE ANUÊNCIA

Por meio desta autorizo e declaro minha ciência da perspectiva de desenvolvimento do projeto intitulado "ESTUDO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE CIRCULANTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO, 1995-2010", coordenado pela Doutoranda Ana Maria Silva, a ser realizado no Departamento de Virologia (LAVITE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, em colaboração com o Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral, da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.

Recife, 4 de novembro de 2009.

Terezinha de Jesus C. Tabosa
Diretora Geral de Laboratórios Públicos

Terezinha de Jesus Carvalho Tabosa
Diretora Geral de Laboratórios Públicos
Mat. 225.755-6 - SES
LACEN - PE

Anexo B - Parecer do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 197/2003

Registro CONEP: 4909 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 68/02

Processo n° 25000.119007/2002-03

Projeto de Pesquisa : " Identificação de marcadores biológicos preditivos de respostas clínicas ao dengue através de análise proteômica "

Pesquisador Responsável : Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior

Instituição: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ / PE

Área Temática Especial : Genética Humana

Pesquisa com cooperação estrangeira

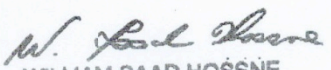
Ao se proceder à análise das respostas às considerações da CONEP no Parecer n° 1695/2002, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche, de modo geral, os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília, 11 de fevereiro de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

Anexo C - Autorização para uso da coleção de vírus do LaViTE



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Fiocruz
Ministério da Saúde

AUTORIZAÇÃO

Na condição de Curadora da “**Coleção de Vírus**” do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, declaro minha ciência sobre o desenvolvimento do projeto intitulado “ESTUDO MOLECULAR DOS VÍRUS DENGUE CIRCULANTES NO ESTADO DE PERNAMBUCO, 1995 – 2010”, sob a coordenação da doutoranda Ana Maria da Silva, a ser realizado no Departamento de Virologia (LAVITE) desta instituição. Declaro ainda que a doutoranda está autorizada a fazer uso em seu projeto, de amostras dos isolados dos vírus dengue pertencente à referida Coleção.

Recife, 08 de Fevereiro de 2010

Marli Tenório Cordeiro

Curadora da Coleção de Vírus do CPqAM-Fiocruz

Anexo D - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CPqAM/FIOCRUZ



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: Estudo molecular dos vírus da Dengue circulantes no Estado de Pernambuco, 1995- 2010.

Pesquisador responsável: Ana Maria da Silva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 11/11/2009

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 78/09

Registro no CAAE: 0081.0.095.000-09

PARECER Nº 03/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 25 de fevereiro de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 25 de fevereiro de 2010.


Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0483378
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 25/02/2011.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

