



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADOS
EM RORAIMA DURANTE OS ANOS DE 2008 A 2010

Boa Vista, RR

2013

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE SOROTIPO 1 ISOLADOS
EM RORAIMA DURANTE OS ANOS DE 2008 A 2010

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Amezaga Acosta.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilmara M. Duarte
Pereira

Boa Vista, RR

2013

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

A586p Sousa, Débora Dinelly.

Caracterização genética dos vírus dengue sorotipo 1 isolados em Roraima durante os anos de 2008 a 2010 / Débora Dinelly de Sousa. -- Boa Vista, 2013.
116 f : il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Amezaga Acosta.
Co-orientadora : Profa. Dra. Gilmara M. Duarte Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Área de Concentração: Bioprospecção.

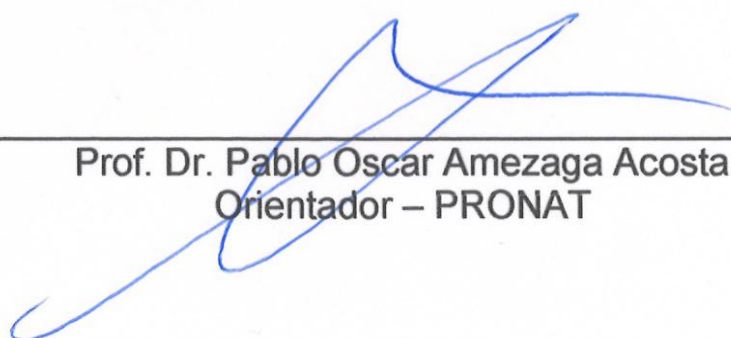
1 – . Biologia molecular. 2 – Dengue. 3 – Roraima. 4 – Sorotipo 1. 5 – Filogenia. I – Título. II. - Acosta, Pablo Amezaga (orientador). III – Pereira, Gilmara M. Duarte (co-orientador).

CDU- 576.3:616.995.7

DÉBORA DINELLY DE SOUSA

Caracterização genética dos vírus dengue sorotipo 1 isolados em Roraima durante os anos de 2008 a 2010

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 28 de agosto de 2013 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta
Orientador – PRONAT

Cássia V. Pedrozo

Profa. Dra. Cássia Ângela Pedrozo
Membro – Embrapa Roraima



Profa. Dra. Fabiana Granja
Membro – Universidade Federal de Roraima

Krisle da Silva

Profa. Dra. Krisle da Silva
Membro – Embrapa Roraima

DEDICATÓRIA

À Deus e à Maria Santíssima, que sempre estiveram ao meu lado nessa caminhada,
Aos meus pais, Rige e Souza,
Aos meus irmãos,
À minha amada sobrinha,
Ao meu amor Tony,
E aos meus filhos, William, Maria Luiza e Rafael (filho do coração).

AGRADECIMENTOS

À Deus e Maria, que sempre estiveram ao meu lado, desde o primeiro dia desta longa e árdua caminhada.

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT.

Aos professores do PRONAT, pelos conhecimentos proporcionados.

À Capes, pelo financiamento das pesquisas.

Ao meu querido e dedicado orientador, Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta, por ter acreditado sempre no meu potencial, por ter me proporcionado tanto crescimento científico, por ter sempre me apoiado em tudo que precisei e por ter feito eu me apaixonar pela Biologia Molecular.

À minha charmosa e querida co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Gilmara Maria Duarte Pereira, pela dedicação comigo, pelas conversas que tivemos nas horas de minha angústia e por sua amizade.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Granja, que com os seus lindos olhos verdes, me dizia sempre para não desanimar e caminhar para frente, pois estava tudo dando certo. Pelas conversas de incentivo e por também ter me ensinado a amar a Biologia Molecular.

Ao CpLMD – FIOCRUZ/AM, pela parceria com o Laboratório de Biologia Molecular, o que permitiu o sequenciamento das amostras.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pela paciência, dedicação à minha pesquisa, por ter me proporcionado a oportunidade de aprender sempre mais sobre a maravilhosa filogenia molecular, por ter sido sempre tão solícito, muito obrigado mesmo.

Ao George, pesquisador do CpLMD, por ter me ajudado com as reações de sequenciamento, por ter dedicado uma grande parte do seu tempo aos meus experimentos, tentando me ajudar a sair das enrascadas da PCR.

Aos meus amados pais, Rige e Souza, que sempre me apoiaram quando precisei, me amando e me incentivando quando queria esmorecer.

Aos meus filhos, William, Maria Luiza e Rafael (filho do coração), pela paciência e por entender a minha ausência.

Ao meu marido Tony, que eu amo muito, por ter ficado do meu lado, escutando as minhas angústias, e por ter vivido junto comigo, este momento tão importante para minha vida.

Aos meus irmãos, Denis, Dayse e Lizandra, pelo incentivo.

À toda minha família, por ter sempre torcido por mim.

Aos meus queridos amigos do LaBMol: Ismael, pela ajuda com os experimentos; à Bruna, pela ajuda com as culturas; Wanderson, Karen, muito obrigado por tudo e ao Wilson, pela ajuda preciosa com as imagens.

À Thalita, Eduardo e Aline, por terem me ensinado a dar os primeiros passos dentro do laboratório, e por terem dividido comigo seus conhecimentos.

À turma do mestrado: Iolete, Elisângela, Maiara, Edmar, Leandro, Alice, Leônidas, Williamar, Adriana, Lorrane, Erikita, pela união, dedicação, e por termos dividido momentos de angústias, descontração, lamentações, desespero, alegrias, enfim, foi tudo muito especial.

Às amigas e companheiras de mestrado, Iolete e Elisângela, pela força que sempre demos umas as outras. Amo vocês amigas.

À TODOS, que de uma forma ou de outra, permitiram que eu pudesse trilhar este caminho e que este momento tão especial na minha vida, acontecesse.

RESUMO

Na região Norte, Roraima destaca-se como um dos Estados hiper-endêmicos para o dengue, com circulação dos quatro sorotipos nos últimos três anos, e com uma elevada incidência da doença na última década. Por outro lado, sua localização geográfica tem um papel importante na entrada de novos genótipos/sorotipos do dengue ao Brasil. O DENV-1, depois de uma breve incursão no estado nos anos de 1981-1982, foi reintroduzido no ano 2000, e tem sido um dos sorotipos mais isolados até o ano de 2011, porém, existem poucos dados que mostram a ocorrência de variabilidade genética ou de alguma evolução na composição genética deste sorotipo durante as infecções ocorridas nos diferentes anos. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular do gene do envelope de isolados de DENV-1 durante epidemias ocorridas no período de 2008 a 2010 no estado de Roraima. As amostras foram inoculadas em células da linhagem C6/36 de *Aedes albopictus*, e identificadas por imunofluorescência indireta e pela técnica de RT-Hemi-Nested-PCR. Para a obtenção de um amplicom da região do envelope, uma RT-PCR foi realizada com o uso de iniciadores específicos, gerando um produto com 1724 pb. Os amplicons foram sequenciados e as sequências consenso foram obtidas usando o programa Geneious v.5.5.4. Para realização da análise molecular, as sequências foram comparadas com sequências referência dos quatro sorotipos do vírus dengue, e dos cinco genótipos do DENV-1 de diferentes partes do mundo, disponíveis no GenBank. A reconstrução filogenética foi realizada por dois métodos, o de Máxima Verossimilhança e o Bayesiano. Todos os isolados foram agrupados no genótipo V do DENV-1. As sequências utilizadas neste estudo apresentaram de 99-100% de similaridade com cepas de DENV-1 de Países e Estado vizinhos, como República Bolivariana da Venezuela, Guiana Inglesa, Colômbia e Amazonas, e se agruparam na árvore filogenética formando um subclado com cepas destes países e com outros da região do Caribe, indicando, mais uma vez, Roraima, como possível via de entrada de sorotipos/genótipos de dengue no país, fato totalmente comprovado quando houve a entrada e dispersão do genótipo II do vírus DENV-4 no ano de 2010. As cepas brasileiras do genótipo V do DENV-1 formaram três linhagens distintas. Os isolados deste estudo (2008-2010) se agruparam na linhagem III, diferente da cepa que circulou no Estado no de 2001, a qual era pertencente à linhagem II. Ao comparar estas sequências, foram encontradas quatro substituições de aminoácidos, duas (E₄₂₈ e E₄₃₆) provavelmente neutras que não modificaram a conformação tridimensional do envelope, pois trocaram aminoácidos de características físico-químicas similares (Leucina x Valina; Isoleucina x Valina) e duas substituições (E₂₂₇ e E₃₃₈) com alta probabilidade de modificar o envelope (Prolina x Serina; Leucina x Serina). Estes resultados provavelmente indicam uma evolução adaptativa no DENV-1, ou entrada de uma nova linhagem ao Estado, enfatizando a importância do monitoramento molecular de cepas de DENV circulantes em determinada região, permitindo um melhor entendimento do vírus.

Palavras – chave: Biologia Molecular. Dengue. Roraima. Sorotipo 1. Filogenia.

ABSTRACT

In northern Brazil, Roraima is highlighted as one of the dengue virus hyperendemic states, where the four serotypes has been circulating for the last three years and with a high incidence of this disease in the last decade. On the other hand, its geographic localization has an important part on the entry of new genotypes/serotypes of dengue in Brazil. DENV-1, after a short incursion in the state in years 1981 and 1982, was reintroduced in 2000 and it was one of most isolated serotypes until 2011. Nevertheless, there is little data that shows the occurrence of genetic variability or any evolution in genetic composition from this serotype on infections occurred in different years. The objective of this project was to perform a molecular characterization of the envelope gene isolated from DENV-1 on infections occurred between 2008 and 2010 in Roraima. The samples were inoculated in C6/36 cells from *Aedes albopictus*, and identified by indirect immunofluorescence and RT-Hemi-Nested-PCR techniques. To obtain an *amplicom* from the envelope region, it was made an RT-PCR test with specific primers, generating a product with 1724 bp. The *amplicons* were sequenced and the consensus sequences were obtained using the program Geneious V.5.5.4. For molecular analysis, the current sequences were compared to sequences from the four serotypes of dengue virus and also compared to five genotypes of DENV-1 from different parts of the world available on GenBank. The phylogenetic reconstruction was made by two methods, Maximum-likelihood and Bayesian. All of the isolates were grouped in genotype V of DENV-1. The sequences showed 99-100% of similarity with strains of DENV-1 from neighbor countries and states as the Bolivarian Republic of Venezuela, Guyana, Colombia and Amazonas, they were grouped on a phylogenetic tree forming a subclade with strains of these countries and Caribbean region, and besides indicating, once more, Roraima as a possible entry route of serotypes/genotypes of dengue in Brazil, fact totally proven in 2010 with the entry and dispersion of genotypes II of DENV-4. The Brazilian strains of genotype V of DENV-1 formed three distinct lineages. The isolates of this study (2008-2010) were grouped in lineage III, different from the strain that circulated in the state in 2001, which belonged to lineage II. When these sequences were compared, it was found four aminoacid substitutions, two of them (E₄₂₈ e E₄₃₆) probably neutral which did not change tridimensional conformation of the envelope, since amino acids with similar physicochemical characteristics were changed (Leucine x Valine; Isoleucine x Valine), and two substitutions (E₂₂₇ e E₃₃₈) with high probability of changing the envelope (Proline x Serine; Leucine x Serine). These results may indicate an adaptive evolution of DENV-1 or the entry of a new lineage in the State, emphasizing the importance of molecular monitoring strains of DENV in circulation in certain regions, allowing better understanding of the virus.

Keywords: Molecular Biology. Dengue. Roraima. Serotype 1. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição do Dengue mundialmente	17
Figura 2 -	Estrutura esquemática da partícula do dengue.....	24
Figura 3 -	Representação do genoma do Dengue	25
Figura 4 -	Maturação dos vírions DENV	26
Figura 5 -	Sequência de aminoácidos da proteína E do Dengue	27
Figura 6 -	Monômero formando uma subunidade individual da proteína E.....	28
Figura 7 -	Conformação dimérica da proteína E presente na superfície das partículas virais maduras	28
Figura 8 -	Apresentação do Ectodomínio do vírus Dengue e do domínio Transmembrana	29
Figura 9 -	Arranjo dos homodímeros da proteína E na superfície do vírus Dengue	29
Figura 10 -	Ciclo de replicação do vírus Dengue	32
Figura 11 -	Esquema indicando as manifestações da infecção pelo vírus Dengue	40
Figura 12 -	Representação esquemática do fenômeno ADE	42
Figura 13 -	Mosquito vetor do vírus Dengue	43
Figura 14 -	Os ciclos de transmissão do vírus Dengue	45
Figura 15 -	Esquema do ciclo de transmissão do vírus Dengue em área urbana	46
Figura 16 -	Fluxograma geral indicando a sequência metodológica empregada durante a realização da pesquisa	48
Figura 17 -	Mapa do estado de Roraima com suas fronteiras nacionais e internacionais	49
Figura 18 -	Esquema da técnica de RT-PCR para sorotipagem do vírus Dengue com o uso da metodologia de Lanciotti et al. (1992)	54
Figura 19 -	Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados na RT-PCR da região da proteína E das cepas de DENV-1	57
Figura 20 -	Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados	

	no sequenciamento da região da proteína E das cepas de DENV-1	60
Figura 21 -	Observação dos produtos amplificados a partir da RT-Hemi-Nested-PCR de amostras de DENV-1 através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%	64
Figura 22 -	Observação de alguns produtos amplificados a partir da RT-PCR da região que codifica para a proteína E das amostras de DENV-1 através da eletroforese em gel de agarose a 1%	65
Figura 23 -	Cromatograma gerado a partir do sequenciamento da amostra BR/RR/09_64 de DENV-1.....	66
Figura 24 -	Regiões de início e fim da sequência BR/RR/09_64 que foram eliminadas a partir da análise do cromatograma	67
Figura 25 -	Sítios de nucleotídeos variáveis entre as sequências analisadas neste estudo e a amostra referência RR/2001.....	70
Figura 26 -	Regiões conservadas referentes à sequência do peptídeo de fusão (resíduos 98 a 113) observadas nas amostras utilizadas neste estudo	71
Figura 27 -	Regiões conservadas referentes às regiões de glicosilação Asn67 e Asn153 observadas nas amostras utilizadas neste estudo	71
Figura 28 -	Sítios de aminoácidos variáveis entre as sequências utilizadas neste estudo e a amostra referência RR/2001.....	72
Figura 29 -	Representação esquemática das quatro principais diferenças de aminoácidos codificados pelo gene E presente na cepa RR/2001 e nos DENV-1 isolados em Roraima	74
Figura 30 -	Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor – Joining (NJ) utilizando as 13 cepas analisadas juntamente com todos os sorotipos do DENV.....	76
Figura 31 -	Análise filogenética da região do gene E dos DENV-1 isolados em Roraima entre os anos de 2008 a 2010 pelo método de Máxima Verossimilhança.....	79
Figura 32 -	Análise filogenética da região do gene E dos DENV-1 isolados em Roraima entre os anos de 2008 a 2010 pelo método Bayesiano.....	80
Figura 33 -	Variação na prevalência dos sorotipos de Dengue em Roraima (1999-2011)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos graves de dengue e óbitos registrados no estado de Roraima entre 1999-2011	23
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores usados para determinar o sorotipo do vírus Dengue	54
Tabela 3 - Iniciadores utilizados na RT-PCR da região da proteína E das cepas de DENV-1.....	57
Tabela 4 - Iniciadores utilizados no sequenciamento da região da proteína E das cepas de DENV-1.....	60
Tabela 5 - Diferenças de aminoácidos codificados pelo gene E presente na cepa RR/2001 e nos DENV-1 isolados em Roraima, nos anos de 2008 a 2010	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição das amostras de DENV-1 utilizadas no estudo	50
Quadro 2 - Programa de amplificação usado nas reações de sequenciamento	61
Quadro 3 - Relação de similaridade das sequências de nucleotídeos da região do envelope das amostras de DENV-1 obtidas em Roraima, nos anos de 2008-2010, com outras sequências depositadas no Genbank	68
Quadro 4 - Estimativa de divergência genética entre os genótipos do DENV-1	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Dengue no mundo e nas Américas	16
1.2	Dengue com enfoque no Brasil	20
1.3	Dengue com enfoque em Roraima	21
1.4	O Vírus Dengue (DENV)	23
1.5	A proteína E	26
1.6	Ciclo Viral	30
1.7	Origem, diversidade e Evolução	32
1.8	O Sorotipo DENV-1	36
1.9	Patogênese	39
1.10	O Vetor	42
1.11	Ciclos de transmissão	44
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo Geral	47
2.2	Objetivos Específicos	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Área de estudo	49
3.2	Amostragem	49
3.3	Isolamento Viral	51
3.4	Teste de Imunofluorescência Indireta	52
3.5	Extração do RNA Viral	52
3.6	Sorotipagem do vírus Dengue por RT-Hemi-Nested-PCR	53
3.6.1	<i>Transcrição Reversa (RT)</i>	55
3.6.2	<i>Primeira reação de PCR</i>	55
3.6.3	<i>Reação de Hemi-Nested-PCR (2ª Reação de PCR)</i>	56
3.7	RT-PCR da região que codifica a proteína E de cepas do DENV-1	56
3.7.1	<i>Confecção do cDNA</i>	58
3.7.2	<i>Reação de PCR</i>	58
3.7.3	<i>Purificação e quantificação do produto da PCR</i>	59
3.8	Sequenciamento da região da proteína E do genoma viral	59

3.9	Análise e Alinhamento das sequências	61
3.10	Análises filogenéticas	62
3.11	Inferência sobre as possíveis rotas de introdução e dispersão do vírus no estado	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Obtenção das amostras positivas de DENV-1.....	64
4.2	Obtenção das sequências de nucleotídeos da região que codifica para a proteína E.....	65
4.3	Caracterização molecular das sequências de nucleotídeos da região do envelope.....	68
5	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

Dentre as arboviroses que ocorrem nos países tropicais e subtropicais, a infecção pelo dengue possui grande importância na saúde pública em nível mundial. A infecção é causada pelo vírus dengue (DENV), que é transmitido ao homem, em áreas urbanas, pela picada do mosquito peridoméstico da espécie *Aedes aegypti*.

O DENV é classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e devido ao fato de apresentarem altas taxas de mutação, os quais provocam variações na composição genômica entre os vírus de cada sorotipo, apresentam também uma classificação genotípica. Estes genótipos são frequentemente ligados a áreas geográficas específicas e virulência (GUBLER, 1998; HOLMES; BURCH, 2000; HOLMES; TWIDDY, 2003; KYLE; HARRIS, 2008; LANCIOTTI et al., 1994; RICO-HESSE, 1990).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (1997), a doença pode ser assintomática ou sintomática. Dentro das manifestações sintomáticas, a infecção pode causar febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD), e ocasionalmente pode provocar Formas Graves do Dengue (FGD), sendo as principais apresentadas como Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), Síndrome de Choque do Dengue (SCD) e Dengue com Complicações (DCC). Esta última foi adotada no Brasil, para classificar os casos que não se enquadram nos critérios estritos de dengue hemorrágica (BRASIL, 2013d). Estudos têm mostrado que as infecções secundárias e a virulência das cepas infectantes são os principais fatores que podem predispor ao desenvolvimento das formas graves da doença (COLOGNA; RICO-HESSE; ARMSTRONG, 2005; HALSTEAD, 1980; THEIN et al., 1997).

Devido às opções limitadas para a prevenção e controle das epidemias causadas pelo vírus dengue, seja pela falta de uma vacina tetravalente ou pelas dificuldades em erradicar o mosquito vetor (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 2000), a epidemiologia molecular tem se tornado uma importante ferramenta para o entendimento dos padrões epidemiológicos de disseminação viral.

O sequenciamento genômico é uma técnica importante na determinação da diversidade genética, permitindo monitoramento da emergência de cepas com potencial epidêmico e de maior virulência (MIAGOSTOVICH et al., 2006; RICO-HESSE, 2010; WEAVER; VASILAKIS, 2009). Além disso, a caracterização molecular pode detectar a circulação simultânea de amostras antigenicamente similares,

porém geneticamente distintas, permitindo o conhecimento de sua distribuição separadamente (GAUNT et al., 2001).

Estudos feitos sobre a epidemiologia molecular das cepas de DENV-1 brasileiras mostraram que o genótipo V (América/África/Ásia) é o circulante no país (CARNEIRO et al., 2012; DOS SANTOS et al. 2011; DRUMOND et al., 2012; GONÇALVEZ, et al., 2002; PIRES NETO et al., 2005; RICCO-HESSE, 1990).

O estado de Roraima é considerado hiperendêmico para o dengue, pois nos últimos anos se reportou a circulação de todos os quatro sorotipos virais com elevados índices de incidência da doença. Estudos feitos por Acosta et al. (2012), revelaram que Roraima, devido a sua condição geográfica, fazendo fronteira com a Venezuela e com a Guiana Inglesa, países endêmicos do vírus dengue, tem um papel crucial na introdução/reintrodução de novas variantes de DENV no país.

O conhecimento sobre a variabilidade genética do DENV-1 no estado de Roraima se concentra no primeiro semestre de 2009, quando Cordeiro (2010), realizando estudos de variabilidade dos sorotipos e genótipos circulantes em Boa Vista, RR, caracterizou as amostras de DENV-1 isoladas como pertencentes ao genótipo V. Não existem dados sobre a variabilidade genética dos DENV-1 isolados a partir de infecções ocorridas antes, e após este período, nem da existência de alguma alteração na composição genética deste sorotipo durante as infecções ocorridas nos diferentes anos, o que é de suma importância para a vigilância epidemiológica molecular do dengue, uma vez que pode permitir a detecção de prováveis epidemias ou a entrada, saída, ou substituição de determinada variante genética de um local ou região, além de possibilitar ações de prevenção e controle da doença, por partes dos órgãos competentes.

A região do genoma escolhida para a análise filogenética do presente estudo inclui o gene da proteína E, que apresenta a maior taxa de mutação entre os Flavivírus, principalmente porque age diretamente com o sistema imune do hospedeiro, estando sob alta pressão seletiva (CHEN; WU; CHIOU, 2003). Apresenta também papel determinante na virulência, por ser uma região de elevada ocorrência de mutações genéticas (ALLISON et al., 2001; CHAMBERS et al., 1990). A proteína E está localizada na superfície do DENV, e tem papel fundamental na interação vírus-hospedeiro, especialmente com os receptores de ligação, fusão com a membrana da célula hospedeira e indução da resposta imune protetora (CHAMBERS et al., 1990; CHAVES et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi realizar uma abordagem filogenética para caracterizar os genótipos de DENV-1 circulante em âmbito regional e/ou local, durante o período de 2008-2010, assim como, analisar os possíveis padrões de variabilidade genética e evolução local destas cepas, suas possíveis rotas de introdução e dispersão, possibilitando um melhor entendimento dos padrões de endemicidade do dengue na região.

1.1 Dengue no mundo e nas Américas

Segundo a WHO (1997), as infecções com vírus dengue podem ser assintomáticas e, quando sintomáticas, podem apresentar como forma clínica da doença, febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD), que eventualmente pode desencadear Formas Graves do Dengue (FGD), entre elas as mais conhecidas são a Dengue com Complicações (DCC), a Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e a Síndrome de Choque do Dengue (SCD). A DCC foi adotada pelo Brasil para enquadrar os casos que não preenchem os critérios de dengue hemorrágica (BRASIL, 2013d).

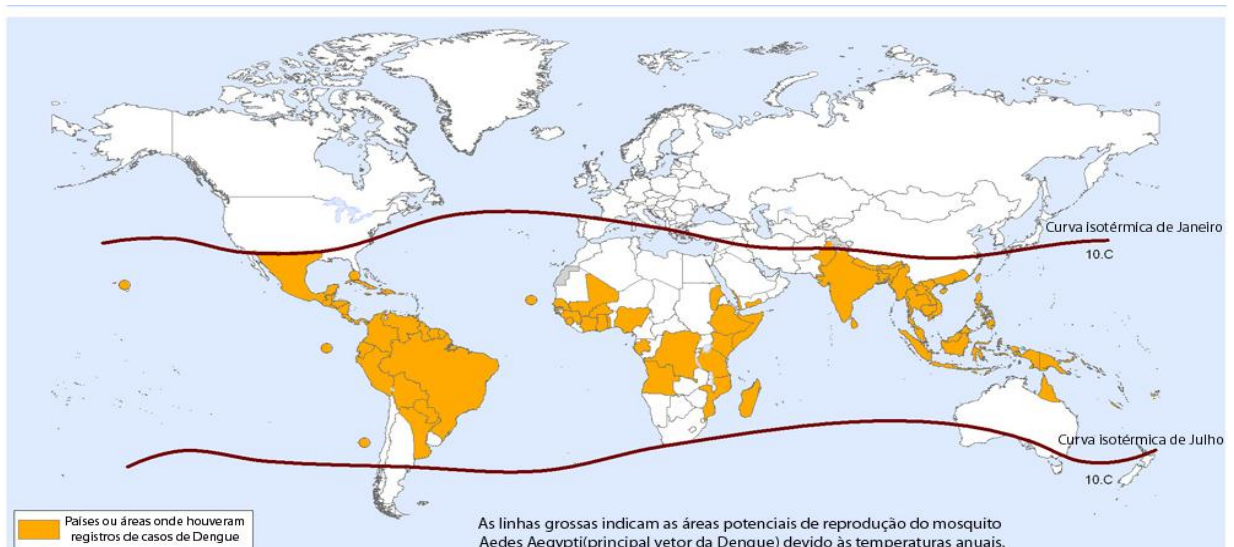
A dengue é considerada a mais importante arbovirose humana e um dos mais sérios problemas dos países tropicais e subtropicais (DEEN et al., 2006; WHO, 2007). De acordo com a WHO (2009a, 2009b, 2012), cerca de 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas com risco de infecção, sendo estimados cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue ocorrendo a cada ano no mundo, com 500 mil hospitalizações de pacientes com complicações por FHD/SCD, resultando em aproximadamente 20.000 mortes.

Quanto à origem do nome dengue, Figueiredo e Fonseca (1995, p. 345) escreveram:

(...) segundo Vambery, citado por Siler, em 1926, seria árabe arcaico, significa fraqueza (astenia). Nas línguas portuguesa e espanhola, que possuem influência moura, existe a palavra dengue significando afetação. Com ambos os sentidos a palavra descreve sintomas da doença ou comportamento praticado em virtude dela. Uma outra origem para o nome é sugerida por Halstead, em que o nome teria surgido em Zanzibar, durante epidemia ocorrida em 1870, e estaria relacionado à frase nativa “Ki-denga Pepo”, que significa pancada ou golpe dado por um mal espírito, provocando ataque doloroso semelhante a cãibra.

A presença da doença tem sido descrita mundialmente em regiões tropicais e parcialmente nas regiões subtropicais. Além dos 120 países endêmicos do dengue distribuídos nas regiões da Ásia, Oceania, Austrália, África e Américas Central e do Sul, a doença vem se disseminando para novas áreas onde surtos acontecem em populações imunologicamente susceptíveis (NATIELLO et al., 2008), com registros de transmissão autóctone em lugares temperados, como França, Croácia e Ningbo, China (GJENERO-MARGAN et al., 2011; GOULD et al., 2010; LA RUCHE et al., 2010; XU et al., 2007). Segundo Blut (2011) é importante ressaltar que as áreas endêmicas do dengue (figura 1) essencialmente correspondem a áreas de distribuição geográfica dos mosquitos *Aedes*.

Figura 1 – Distribuição do dengue mundialmente (2010)



Fonte: <http://smsdc-clinicadafamilialourencodemello.blogspot.com.br>

As principais causas da disseminação da doença pelos trópicos e subtropicais podem ser atribuídas ao aumento da urbanização, ao crescimento populacional, às viagens internacionais e à migração, favorecendo um maior deslocamento entre as populações. Também as mudanças climáticas, falta de um efetivo combate ao mosquito vetor, além da ausência de uma vacina efetiva contra a doença (KROEGER; NATAN, 2006; JOHANSSON; DOMINICI; GLASS, 2009).

A vacina contra o dengue deveria oferecer, dentre outros aspectos, imunidade protetora contra cada um dos quatro sorotipos virais ao longo da vida para evitar o

fenômeno dos “anticorpos potencializadores da infecção” – ADE – Antibody-Dependent Enhancement (SWAMINATHAN; BATRA; KHANNA, 2010).

Segundo esta teoria, proposta por Halstead em 1970, os pacientes que sofrem uma segunda infecção por um vírus de sorotipo heterólogo, tem uma intensificação da infecção imunologicamente mediada e apresentam uma maior chance de desenvolver FHD/SCD (HALSTEAD, 1970, 1980).

Devido à importância do dengue enquanto problema de saúde pública mundial, existe uma preocupação dos organismos internacionais em aumentar os investimentos em pesquisas, na busca de um melhor entendimento em nível fisiológico e molecular sobre a doença. As evidências dos avanços nas pesquisas em dengue compreendem: 1) o desenvolvimento de novas metodologias na busca de um diagnóstico mais rápido, acurado e que possa prever a gravidade; 2) compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nas formas graves da doença; 3) utilização de anticorpos monoclonais, para identificar os sorotipos do vírus dengue em diagnósticos convencionais, como por exemplo, na técnica de imunofluorescência indireta (IFI); 4) o uso de técnicas de biologia molecular aplicadas ao estudo da biologia do vírus e da sua diversidade genética (FÉRES, 2008; VAZQUEZ et al., 2009).

Mais do que um problema clínico, o dengue representa um enorme desafio político e sócio-econômico, que exige uma resposta integrada em nível regional, nacional e global (TAPIA-CONYER; MENDEZ-GALVAN; GALLARDO-RINCON, 2009). Um estudo feito nas Américas indicou que o custo do Dengue na região foi de 2,1 bilhões de dólares por ano, sem contar os gastos com controle do vetor e perda de dias trabalhados (SHEPARD et al., 2011).

O registro mais antigo e consistente com o curso clínico da infecção por dengue é relatado da China por volta do ano de 992 (GUBLER, 2006). Registros históricos da então chamada “febre do quebra ossos” ocorrem desde o ano de 1779 na Batavia (Jacarta), Indonésia e Cairo, no Egito (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Do final do século XVIII até as duas primeiras décadas do século XX ocorreram oito surtos isolados de dengue, com duração de três a sete anos, que atingiram várias partes do mundo: Ásia, Américas, África, Europa e Austrália (HOWE, 1977). Como os meios de transporte eram mais lentos que os atuais, um mesmo sorotipo persistia circulando em uma determinada área, por alguns anos,

causando surtos epidêmicos periódicos, possivelmente modulados pela reposição de hospedeiros susceptíveis (GUBLER, 1997).

Após a Segunda Guerra Mundial, momento em que os tipos 1 e 2 do vírus já haviam sido isolados por Sabin e Schlesinger (1945) e Sabin (1952), ocorreu a circulação de diferentes sorotipos em uma mesma área geográfica, favorecendo a ocorrência de uma febre hemorrágica grave, que mais tarde foi relacionada a uma forma grave da doença, tendo um impacto muito mais pronunciado da febre do dengue, uma vez que os principais afetados eram crianças (GUBLER, 1998).

O primeiro surto bem documentado de FHD e que permitiu o isolamento dos tipos 3 e 4 do vírus por Hammon, Rudnick e Satter (1960), ocorreu em Manila, Filipinas, entre os anos de 1953 e 1954, sendo seguida por um surto maior em Bangkok, Tailândia, em 1958 (HALSTEAD, 1980). Em 1975, a FHD tornou-se uma das principais causas de hospitalização e morte entre crianças de muitos países da região do Sudeste Asiático (ROSS, 2010), espalhando-se pela Índia, Paquistão, Sri Lanka, Ilhas Maldivas e China (GLUBER, 1998). A partir daí, sob a forma de epidemia ou endemia, milhares de casos e de óbitos vem ocorrendo a cada ano (GLUBER, 1997,1998). Atualmente as regiões do Sudeste Asiático e Pacífico Oeste são responsáveis por quase 75% dos casos globais de dengue (WHO, 2009c).

No continente Americano, o primeiro registro de uma enfermidade semelhante ao dengue ocorreu em 1780, na Filadélfia, Estados Unidos. Mais casos foram reportados em 1934, na Flórida e em 1945, um surto em Nova Orleans. Em 1963, apenas quatro países registraram epidemia do dengue, número que aumentou para nove em 1979. A doença cresceu no continente americano a partir de 1980, onde 25 países registraram circulação do vírus (PAHO, 1997).

A primeira epidemia de FGD nas Américas ocorreu em Cuba, em 1981, associada a uma infecção secundária por DENV-2, depois de uma primeira infecção por DENV-1, registrando um total de 344.203 casos do dengue, incluindo 10.312 classificados como formas graves e 158 mortes (PAHO, 1997).

Durante os últimos 30 anos, toda a área tropical da América Central e do Sul, bem como a maioria dos países do Caribe, tem sofrido acentuado aumento na incidência de FD e de FGD. Cerca de 4,8 milhões de casos do dengue foram oficialmente registrados nas Américas no período de 2000-2007, comparado com 1,033 milhões de casos no período de 1980-1989. O número de casos de FHD aumentou de 13.398 nos anos 80 para 111.724 até o final de 2007, e os casos de

morte aumentaram de 242 para 1.391 no mesmo período (SAN MARTIN et al., 2010).

Durante os anos 80, o dengue começou a circular no Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e em outros países da América do Sul (PAHO, 1993). Atualmente, todos os quatro sorotipos estão circulando nessa região (PAHO, 2011), que registrou a maioria dos casos ocorridos nas Américas a partir de 1990, com o Brasil representando 63% dos casos desde o ano 2000 (SAN MARTIN et al., 2010).

1.2 Dengue com enfoque no Brasil

No Brasil, registros de surtos do dengue vêm ocorrendo desde o século XIX. Mariano (1917, citado por FIGUEIREDO, 1998) mencionou uma epidemia no Rio de Janeiro em 1846, e em 1917, registrou um surto de FD no estado do Rio Grande do Sul. Reis (1896, citado por FIGUEIREDO, 1998) descreveu um quadro clínico de casos do dengue que ocorreram durante um surto em Curitiba, estado do Paraná. Antônio Pedro (1923, citado por FIGUEIREDO, 1998) fez uma descrição precisa de manifestações clínicas da FD, com base em estudo de casos durante a epidemia de 1922 e 1923, no Rio de Janeiro e em Niterói, respectivamente.

O primeiro surto com confirmação laboratorial no país ocorreu em 1981, em Boa Vista, estado de Roraima, onde os sorotipos 1 e 4 foram isolados em pacientes e em *pools* de mosquitos vetores. Nesta época, houve um intenso trabalho de controle da epidemia para evitar a expansão do vírus do dengue para outras regiões do país (OSANAI; TRAVASSOS DA ROSA; TANG, 1986; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998).

A reintrodução do vírus no Brasil ocorreu no ano de 1986 com o DENV-1 sendo registrado no estado do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986), e daí disseminando-se para o resto do país, seguido pela introdução do DENV-2, em 1990 (NOGUEIRA et al., 1993), do DENV-3, em 2000 (NOGUEIRA, et al., 2001) e do DENV-4, em 2005 (FIGUEIREDO et al., 2008).

Dados de Brasil (2011, 2012) indicam a circulação do sorotipo 1 como predominante até o final de 2011, com a prevalência sendo substituída pelo sorotipo 4 já nos primeiros quatro meses de 2012. Em 2011, foram registrados no país

764.032 casos do dengue, com maiores índices na região Sudeste (361.350 casos) e menores índices na região Sul (35.978 casos). No ano de 2012 foram registrados 591.534 casos de dengue, observando-se uma redução no número de casos em relação a 2011, onde mais uma vez a região Sudeste apresentou os maiores índices (250.858 casos) e a Região Sul, os menores índices (5.712 casos).

Segundo Brasil (2013e), no ano de 2013, até a 7ª semana epidemiológica (16 de fevereiro) foram registrados 204.650 casos de dengue, com um aumento de 190% das notificações em relação ao mesmo período de 2012. A região Centro-Oeste registrou o maior índice (80.976), enquanto que a região Sul teve o menor índice (12.420).

Os primeiros casos de FGD no Brasil foram registrados em 1990-1991, em um surto do Dengue, no Rio de Janeiro, relacionados provavelmente a infecções sequenciais, DENV-1/DENV-2 (CUNHA; NETO, 1991; NOGUEIRA et al., 1993). A situação de hiperendemicidade do dengue no país tem levado a um elevado número de infecções secundárias. No período de 1990-2012 foram registrados 23.307 casos de FGD, com 1.158 mortes (BRASIL, 2013a, 2013b).

De acordo com Brasil (2011, 2012, 2013c), o dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da Federação, com os quatro sorotipos circulando no país. O dengue é hoje o principal alvo das campanhas de saúde pública do Brasil. A população tem sido seriamente afetada pela doença, pois cerca de 80% dos casos do dengue notificados na América ocorrem no Brasil, e nos últimos anos mais de 5 milhões de casos foram registrados nas cinco regiões brasileiras (FIGUEIREDO, 2010).

1.3 Dengue com enfoque em Roraima

Roraima, localizado na região Norte do Brasil, tem sido um Estado importante para a epidemiologia do dengue desde 1981. Neste ano ocorreu o primeiro registro laboratorial do dengue no Brasil, no município de Boa Vista, com um surto iniciado em Julho de 1981 e finalizado em Agosto de 1982. Estudos indicam que neste período, cerca de 11.000 casos ocorreram, sendo associados aos sorotipos 1 e 4, os quais foram isolados de pacientes e de mosquitos *Ae. aegypti* (FIGUEIREDO, 1998 OSANAI, 1984; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). Após a ocorrência deste surto,

houve um intenso combate ao mosquito vetor, erradicando-o. Novos registros da doença foram relatados no ano de 1996, e a partir daí, em todos os anos foram registrados casos do dengue.

Entre os representantes da região Norte, Roraima destaca-se como um dos Estados com elevada incidência do dengue, fato que está associado a fatores como localização geográfica e circulação simultânea de vários sorotipos (ACOSTA et al., 2006).

De acordo com dados da Vigilância Epidemiológica e Acosta et al. (2009), entre os anos de 1999-2009 foram isolados os sorotipos DENV-2, DENV-1 e DENV-3, com uma média superior a 2.000 casos por ano. Em Agosto de 2010, 28 anos depois da primeira epidemia, o DENV-4 foi reintroduzido no Estado (ACOSTA et al., 2011), com isso a circulação dos quatro sorotipos virais tornou-se uma realidade.

Naveca et al. (2012) realizaram o sequenciamento do genoma completo da cepa Br246RR/10 de DENV-4, isolada em Roraima em 2010 e, concluíram que essa cepa pertencia ao genótipo II. Coincidentemente, trata-se da mesma cepa que circulou durante a primeira aparição do DENV-4 no Brasil e que tem circulado no Caribe e na América do Sul nos últimos anos. Análises filogenéticas mostraram a possível entrada desta cepa pela Venezuela ou pela Colômbia, uma vez que, o genótipo das cepas de DENV-4 isoladas no Amazonas por Figueiredo et al. (2008) e Melo, Romano e Zanoto (2009) foram agrupadas no genótipo I.

Realizando estudo sobre epidemias do dengue entre os anos de 1999-2009, Siqueira et al. (2009) mostraram que desde o ano de 1999, a incidência da doença no Estado está entre as maiores do Brasil, com maior significância para os anos de 2000, 2001, 2003 e 2008, com mais de 3.000 casos do dengue, e também para o ano de 2009, onde só no primeiro trimestre foram registrados mais de 1.000 casos da doença.

No ano de 2010 ocorreram 7.590 casos da doença, o maior número detectado para o Estado em um ano completo (BRASIL, 2010), com a identificação dos quatro sorotipos do dengue, e maior prevalência do DENV-1 (DVE, 2013). Em 2011, os sorotipos isolados no Estado foram o DENV-1, DENV-2 e DENV-4, tendo sido registrados 1.451 casos da doença, indicando uma queda em torno de 80% em relação ao ano de 2010 (BRASIL, 2011).

Para o ano de 2012 foram registrados 1.949 casos da doença, com a identificação dos quatro sorotipos, e maior prevalência para o sorotipo 4 (BRASIL,

2013c; DVE, 2013). Até o mês de Abril de 2013 foram detectados 605 casos da doença em Roraima (DVE, 2013).

Os registros de dengue grave e de óbitos no Estado ocorrem, respectivamente, desde 2003 e 2001 (tabela 1). Esse fato se deve provavelmente à situação hiperendêmica, com a co-circulação de múltiplos sorotipos/genótipos intensificando a virulência, assim como uma maior capacitação dos profissionais de saúde na identificação de FGD (ACOSTA et al., 2012).

Tabela 1 – Casos graves de dengue e óbitos registrados no estado de Roraima entre 1999-2011

Ano	Total casos de Dengue	TI	Dengue Grave	Óbitos	% Dengue Grave	Sorotipos de Dengue isolados
1999	1920	451,3	0	0	0,00	2
2000	4107	965,4	0	0	0,00	1 - 2
2001	3345	786,3	0	1	0,00	1 - 3
2002	1268	298,1	0	0	0,00	1 - 2 - 3
2003	4982	1171,1	7	2	0,14	2 - 3
2004	564	132,6	7	0	1,24	3
2005	2317	544,7	54	0	2,33	2 - 3
2006	817	192,1	11	1	1,35	1 - 2 - 3
2007	672	158,0	5	0	0,74	1 - 2 - 3
2008	5537	1301,6	389	2	7,03	1 - 2 - 3
2009	3134	736,7	172	2	5,49	1 - 2
2010	7037	1654,2	285	6	4,05	1 - 2 - 3 - 4
2011	1325	311,5	21	0	1,58	1 - 2 - 4

Legenda: Dengue Grave = DCC + FHD + SCD; % Dengue Grave – (Dengue Severa/Total de casos de Dengue) * 100; TI – Taxa de incidência por 100.000 habitantes.

Fonte: Acosta et al. (2012)

1.4. O Vírus Dengue (DENV)

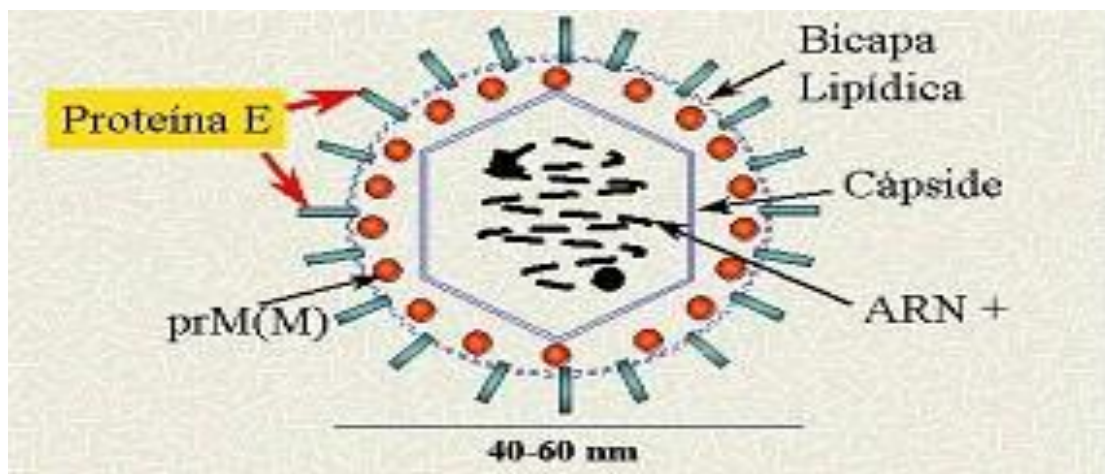
O vírus dengue é um arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes), pertencente ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, classificado em quatro sorotipos antígenicamente relacionados, mas geneticamente distintos DENV-1 a DENV-4 (WESTAWAY; BLOK, 1997). Estudos epidemiológicos e filogenéticos indicam uma extensa diversidade dentro de cada um dos sorotipos do dengue, fato que tem levado ao reconhecimento de diferentes genótipos. Os genótipos dos DENVs são agrupamentos de vírus filogeneticamente distintos e frequentemente

associados com regiões geográficas específicas (KYLE; HARRIS, 2008; LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997; RICO-HESSE, 1990; TWIDDY et al., 2002).

De acordo com Kurane e Ennis (1992) e Kurane (2007), a infecção com um sorotipo de DENV confere imunidade ao longo da vida contra aquele sorotipo (homólogo), e imunidade temporal contra um sorotipo diferente (heterólogo). Estudos têm revelado que o risco de desenvolvimento de FHD/SCD é muito aumentado em uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo (GUZMAN; KOURI, 2002; HALSTEAD, 1997).

O DENV (figura 2) é um vírus envelopado, esférico, com um diâmetro de 40-60 nanômetros (nm). O material genético (RNA) é envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico de 30 nm de diâmetro recoberto por um envelope, que é composto por uma bicamada lipídica de cerca de 10 nm de espessura, a qual é derivada da membrana da célula hospedeira (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001). Ancoradas à superfície do vírus estão 180 cópias de duas glicoproteínas: a glicoproteína de envelope (E) e a proteína de membrana (M) (KUHN et al., 2002).

Figura 2 – Estrutura esquemática da partícula do Dengue

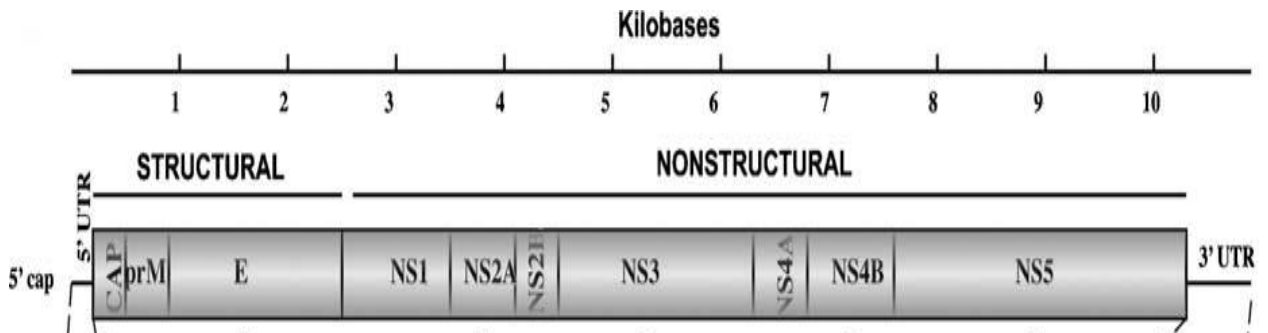


Fonte: <http://correo.biomedicas.unam.mx>

O genoma viral (figura 3) é uma fita simples de RNA de sentido positivo, com aproximadamente 11 kilobases (kb) de comprimento, que codifica em uma matriz aberta de leitura (ORF), uma única poliproteína precursora de cerca de 3.400 aminoácidos (aa). Essa poliproteína é clivada co e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira originando três proteínas estruturais: a do

capsídeo (C), a precursora da proteína de membrana M (prM), e a do envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5. O genoma possui na extremidade terminal 5' uma estrutura *cap* tipo I (7-metilguanossina) e não apresenta cauda poli(A) na extremidade terminal 3'. As proteínas NS não fazem parte da estrutura do vírus, mas são responsáveis pela eficiência da replicação, processamento da poliproteína viral e várias funções celulares (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH; RICE, 2001; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; SHU; HUANG, 2004).

Figura 3 – Representação do genoma do Dengue



Fonte: Weaver e Vasilakis (2009)

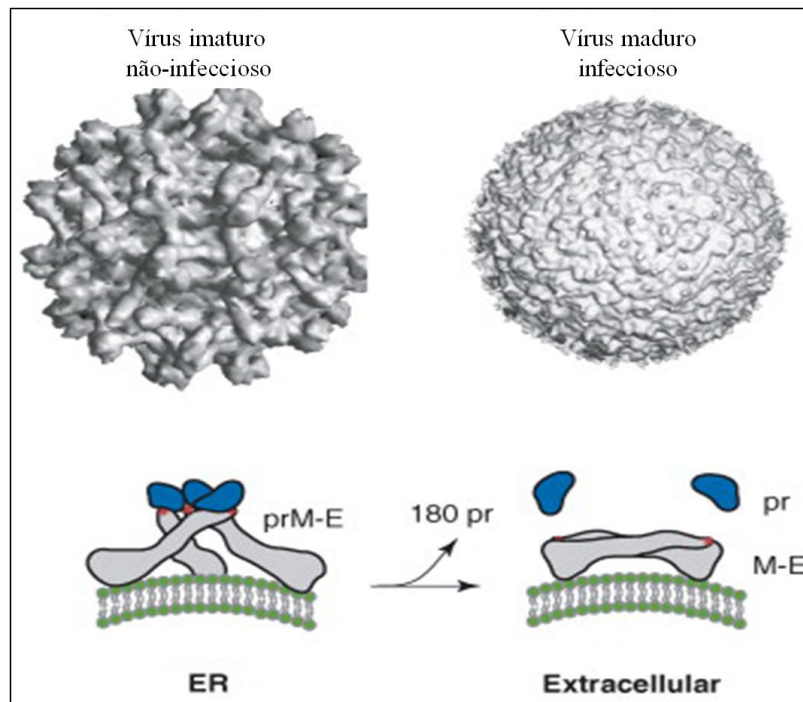
O genoma do DENV é flanqueado por regiões não-traduzidas (UTR – untranslated regions), as regiões 5'-UTR (cerca de 100 nucleotídeos) e 3'-UTR (cerca de 400-800 nucleotídeos). Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA, que são importantes para a replicação do RNA viral, tradução e empacotamento, e provavelmente interagem com os fatores celulares envolvidos nestas funções (MANDL et al., 1998; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

A região 5'-UTR está envolvida na tradução do genoma, possuindo um papel importante na replicação. A região 3'-UTR aumenta a eficiência nos processos de replicação e tradução viral e interage com as proteínas não-estruturais NS3 e NS5, as quais possuem grande relevância funcional (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Quanto à partícula viral, dois tipos de vírions são reconhecidos: as imaturas e as maduras (figura 4). Os vírions DENV são replicados no retículo endoplasmático, como partículas imaturas não-infecciosas. A superfície das partículas imaturas apresenta aparência irregular, porque as proteínas prM e E são inicialmente montadas como picos triméricos que ficam afastados do envelope. No

compartimento de trans-Golgi, uma protease celular do hospedeiro, do tipo furina, cliva a proteína prM para gerar a proteína M madura, o que também resulta no rearranjo dos trimeros da proteína E para formar dímeros, que se encontram sobre a superfície do envelope, criando a superfície lisa, observada em vírions maduros infecciosos, os quais são liberados para o meio extracelular (PERERA; KUHN, 2008; WAHALA; ARAVINDA, 2011).

Figura 4 – Maturação dos vírions DENV



Legenda: ER – retículo endoplasmático
 Fonte: Adaptado de Perera e Kuhn (2008)

1.5 A Proteína E

As principais propriedades biológicas do vírus estão diretamente relacionadas à proteína E. Essa proteína apresenta importante papel funcional na interação do vírus à célula hospedeira, incluindo a ligação aos receptores presentes na superfície das células alvo, mediando a endocitose da partícula viral, e a fusão da bicamada lipídica do vírus com a membrana citoplasmática da vesícula endossômica, além de participar da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001). Também apresenta tropismo celular e capacidade de hemaglutinar eritrócitos, é o principal antígeno para a produção de anticorpos com

capacidade neutralizante, induzindo assim a resposta imune protetora (CHANG, 1997; GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; ROSS, 2010).

A proteína E é uma proteína N-glicosilada, com 12 cisteínas conservadas formando pontes de dissulfeto. Existem dois potenciais sítios de glicosilação na proteína E, nas posições Asn67 e Asn153. O sítio de glicosilação na posição Asn153 é conservado em *Flavivirus*, enquanto que o Asn67 é exclusivo da proteína E do DENV (CHANG, 1997; MODIS et al., 2003; MONDOTTE et al., 2007). Esta proteína que recobre a superfície do vírus é o principal componente protéico do envelope viral, sendo principal determinante antigênico do vírus Dengue, diretamente envolvida no ataque do vírus à célula hospedeira por meio da interação com os receptores celulares, a exemplo o sulfato de heparina e o DC-SING (*Intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin* - lectina tipo C das células dendríticas), sendo, portanto, a mais importante proteína para entrada do vírus na célula (GUZMAN; KOURI, 2004; HENZ et al., 1990; MONDOTTE et al., 2007).

É constituída por aproximadamente 495 aminoácidos (figura 5) e apresenta peso molecular de 53 a 54 kDa. A sequência dos aminoácidos da proteína E define cada um dos quatro sorotipos do Dengue. Dentro de cada sorotipo, os resíduos de aminoácidos da proteína E são bem conservados, e apresentam um grau de similaridade que varia de 90% a 96% (LANCIOTTI; GUBLER, TRENT, 1997; LEWIS et al., 1993). Entretanto, a similaridade na sequência de aa dessa proteína entre os diferentes sorotipos varia geralmente na faixa de 60 a 70%, o que permite a identificação dos quatro sorotipos através da utilização dos testes imunológicos (WESTAWAY; BLOK, 1997).

Figura 5 – Sequência de aminoácidos da proteína E do Dengue

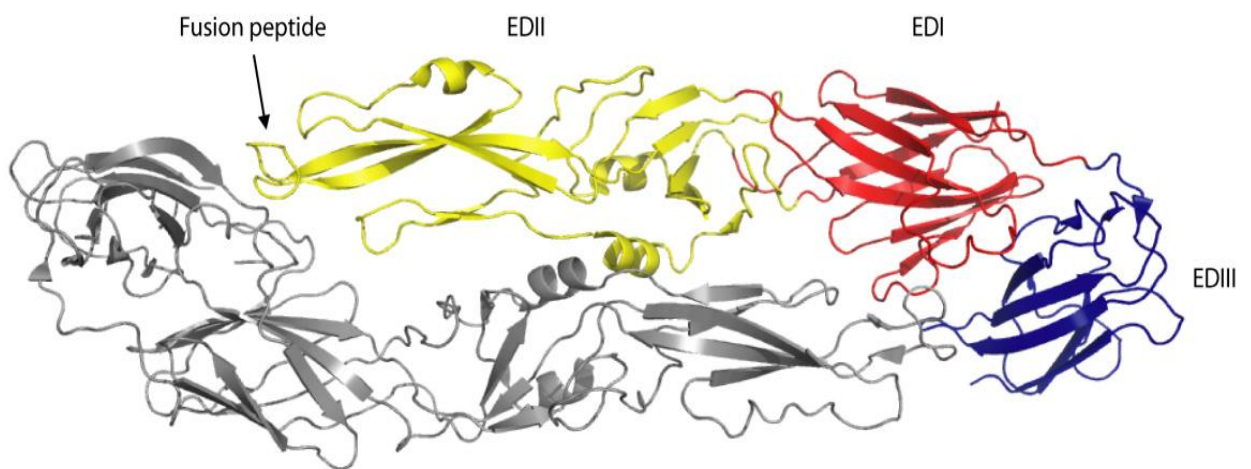


Legenda: representação linear, mostrando a distribuição da cadeia polipeptídica entre os três domínios (I, II, III). Domínio I representado em vermelho, II em amarelo e III em azul escuro. A região de haste e âncora transmembrana estão representadas respectivamente em azul claro e azul hachurado.

Fonte: Modis et al. (2003)

Cada monômero (subunidade) da proteína E é formado pela composição de três domínios estrutural/funcional: I (EDI), II (EDII), III (EDIII), como observado na figura 6. Além dos três domínios que juntos formam um ectodomínio, existem as regiões de haste e de âncora - domínio transmembrana (figura 8), com aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, localizados na porção C-terminal da proteína E (AZEVEDO, 2011; MODIS et al., 2003; PURDY; CHANG, 2005).

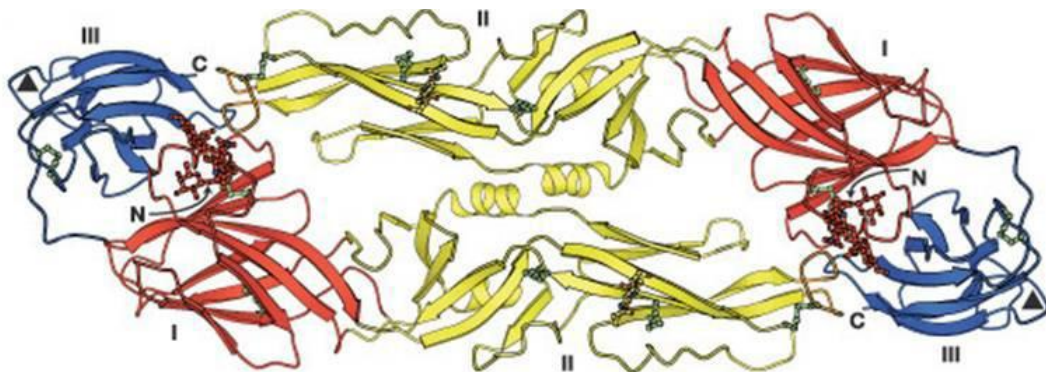
Figura 6 – Monômero formando uma subnidade individual da proteína E



Fonte: Makhopadhyay, Kuhn e Rossmann (2005)

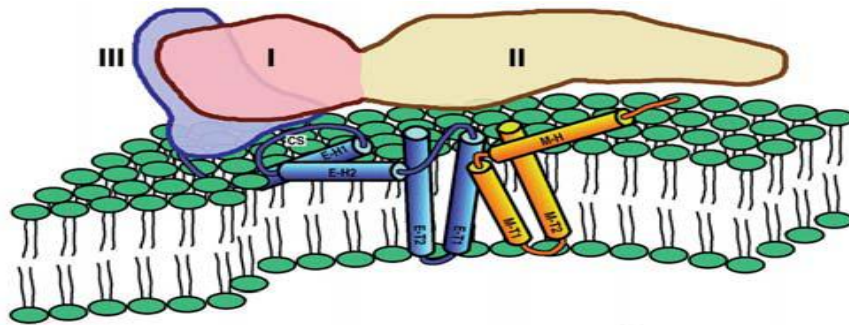
A proteína E é formada por um homodímero alongado (figura 7) que se estende paralelamente à bicamada lipídica que compõem a partícula viral (figura 9), onde 180 monômeros são organizados em 90 dímeros (KUHNE et al., 2002).

Figura 7 – Conformação dimérica da proteína E presente na superfície das partículas virais maduras



Fonte: Modis et al. (2003)

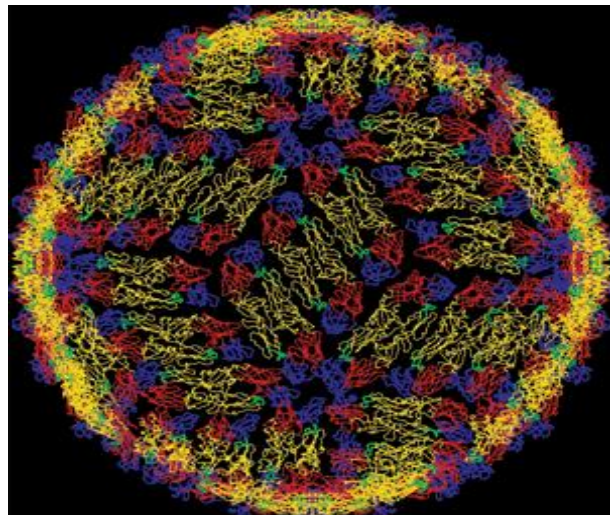
Figura 8 – Apresentação do Ectodomínio do vírus Dengue e do domínio transmembrana



Legenda: o espaço ocupado pelo EDI está representado em rosa, o EDII em marrom, EDIII em lilás e Domínio transmembrana (alça e âncora) em azul e laranja.

Fonte: Zhang et al. (2003)

Figura 9 – Arranjo dos homodímeros da proteína E na superfície do vírus Dengue



Fonte: Kuhn et al. (2002)

O EDI (figura 6) localiza-se centralmente na molécula protéica e contém aproximadamente 120 resíduos de aa (1-52; 133-193; 281-296). Nesse domínio, há vários sítios antigênicos que induzem uma resposta imune predominantemente de anticorpos não-neutralizantes tipo-específico. Entretanto, alguns estudos demonstraram que anticorpos gerados contra esse domínio também podem ter atividade neutralizante (AZEVEDO, 2011; DEGREVÈ; FUSO; CALIRI, 2012; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997; ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998).

O EDII (figura 6) tem forma alongada e compreende à região responsável pelo processo de dimerização dos monômeros da proteína E. Este domínio contém

aproximadamente 180 resíduos de aa. (53-132; 194-280). A sua estrutura tem forma de dedo, possuindo na sua extremidade uma região denominada “loop” de fusão, com uma sequência hidrofóbica altamente conservada entre os sorotipos e, que se expõe apenas na presença de pH ácido. Tal região é responsável por mediar à fusão das membranas viral e endossômica durante a infecção da célula hospedeira. O domínio II induz uma resposta imune humoral com a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes, e ambos reagem cruzadamente com outros sorotipos (AZEVEDO, 2011; DEGREVÈ; FUSO; CALIRI, 2012; MODIS et al., 2003; MODIS et al., 2004).

O EDIII (figuras 6 e 7) localiza-se na porção C-terminal da proteína E e consiste de aproximadamente 98 resíduos de aa (297-394), que se dobram em um módulo independente, semelhante a uma imunoglobulina. Esse domínio é responsável pela interação vírus-célula, apresentando sítios que se ligam a receptores presentes na superfície das células hospedeiras, como por exemplo, o receptor DC-SING situado na membrana de células dendríticas imaturas (AZEVEDO, 2011; BEASLEY; BARRET, 2002; DEGREVÈ; FUSO; CALIRI, 2012; GUZMAN et al., 2010; LEE et al., 1997; MODIS et al., 2003; MODIS et al., 2005). Essa interação mediada pelo domínio III promove a endocitose da partícula viral. Alguns epítomos localizados nessa região são capazes de induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes tipo e subtipo-específico (AZEVEDO, 2011; MODIS et al., 2003; MODIS et al., 2005).

1.6 Ciclo Viral

Depois da picada de um mosquito infectado, acredita-se que inicialmente as células de Langerhans, localizadas na derme, sejam as primeiras a serem infectadas (LIMON-FLORES et al., 2005).

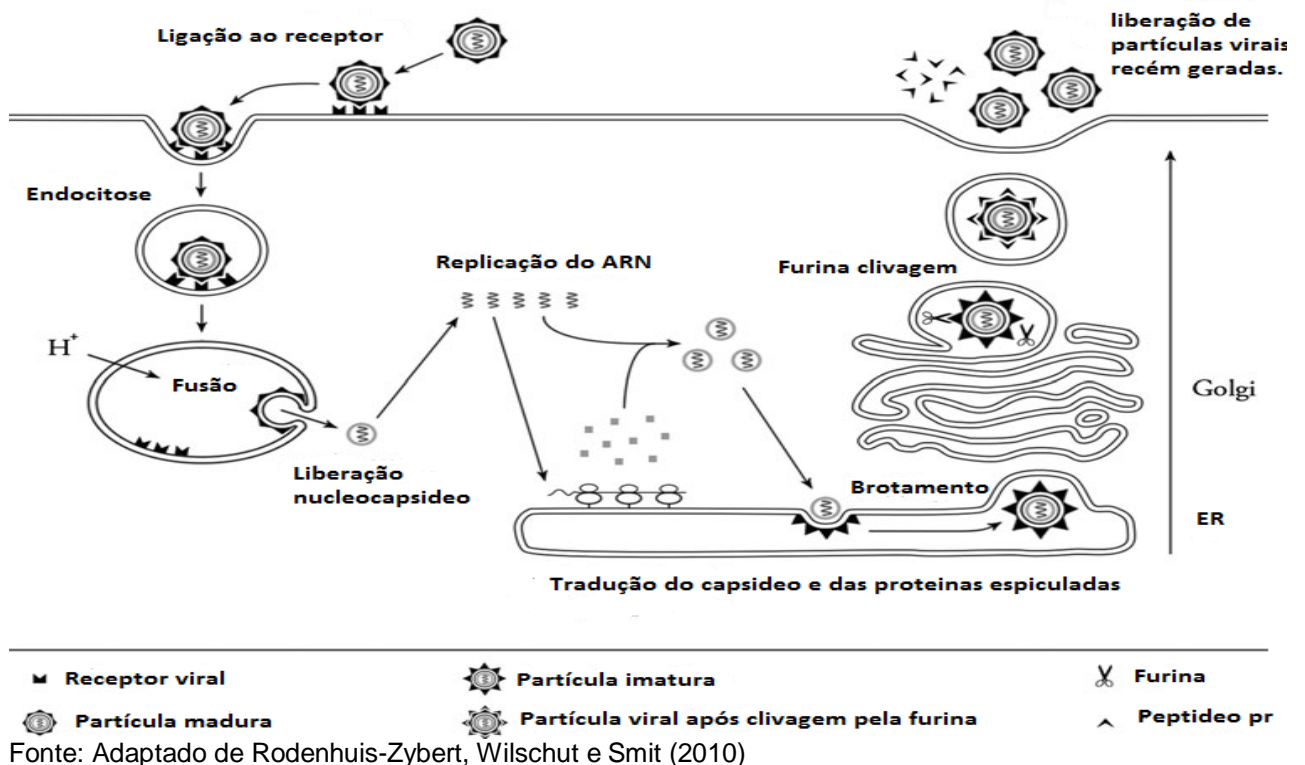
O ciclo de replicação (figura 10) inicia-se quando o vírus funde-se à superfície da célula hospedeira e em seguida entra por endocitose mediada por receptores, como o sulfato de heparina, indispensável para a adsorção do vírus na célula hospedeira, Hsp90 (*Heat shock protein 90*), Hsp70 (*Heat shock protein 70*), receptores de manose, que contribuem para a entrada do vírus nos macrófagos, DC-SING (*Intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), entre outros. Após a

entrada do vírus na célula, com a fusão das membranas celulares e virais, o endossoma é formado, e a acidificação do meio neste compartimento permite mudanças na conformação do vírion. Assim, a partícula viral perde o revestimento do nucleocapsídeo e o material genético é liberado dentro do citoplasma. A replicação ocorre via um RNA intermediário de polaridade negativa, o qual serve de molde para a síntese do RNA genômico de polaridade positiva. O RNA viral de polaridade positiva é traduzido diretamente pelos ribossomos do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, produzindo uma única poliproteína, que então é clivada postraducionalmente por proteases da célula hospedeira, como por exemplo, signalase e furina, dentro do RE, e pela protease viral do tipo NS3pro, no citoplasma, originando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. A montagem da partícula viral se inicia na superfície do RE quando as proteínas estruturais e o RNA recentemente sintetizado estão dentro do lúmen. As partículas virais imaturas e não infecciosas são transportadas através do complexo de Golgi. A maturação viral ocorre no início do processo de exocitose quando a proteína prM é clivada pela protease do tipo furina, originando a proteína M, momento em que os vírions maduros são liberados. Após a liberação, os vírions estão prontos para interação com receptores celulares de outras células hospedeiras, para reiniciar o ciclo viral (CHEN et al., 1997; FIGUEIREDO, 1999; HIDARI; SUZUKI, 2011; MILLER et al., 2008; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; QI; ZHANG; CHI, 2008; STIASNY; HEINZ, 2006).

Células infectadas migram para os linfonodos, resultando na infecção dos macrófagos e monócitos, que por sua vez amplificam a infecção, que é então disseminada via sistema linfático e vascular. Após a viremia primária circulam monócitos no sangue e macrófagos, que infectados, permitem o ataque do vírus ao fígado, baço e medula óssea (DURBIN et al., 2008; JESSIE et al., 2004).

As células alvo naturais da partícula viral nos seres humanos são as células mononucleares de linhagem fagocítica: monócitos, macrófagos e células dendríticas (JESSI et al., 2004), podendo ocorrer também a infecção de outras linhagens de células humanas, como linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais e neuronais. Algumas das células não humanas também são alvo da infecção viral, como as de mosquito *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* clone C6/36, células de macacos e de hamsters (ANDERSON, 2003; ZYBERT et al., 2008).

Figura 10 – Ciclo de replicação do vírus Dengue



1.7 Origem, diversidade e evolução

A origem do DENV tem sido alvo de especulação por décadas, não sendo muito claro seu local de origem. Gaunt et al. (2001) sugerem uma origem Africana, principalmente porque muitos dos mais importantes arbovírus circulam exclusivamente na África, e muitas vezes infectam os primatas, implicando que este clado como um todo se originou na África. Por outro lado, estudos de Wang et al. (2000) sugerem que o vírus tenha uma origem Asiática, fato que se justifica pela presença dos quatro sorotipos em humanos e em macacos na Ásia, e particularmente a posição filogenética das cepas asiáticas silvestres. O apoio para a hipótese de que o DENV foi originalmente zoonótico vieram de estudos filogenéticos do DENV-2 feitos por Rico-Hesse (1990), o qual demonstrou que cepas de habitats silvestres na África Ocidental eram bastante distintas de todas as cepas endêmicas/epidêmicas, diferindo aproximadamente 19% em suas sequências de nucleotídeos e 5% nas sequências de aminoácidos. Twiddy, Holmes e Rambaut (2003) dataram a origem do DENV em aproximadamente 1.000 anos atrás e os

eventos de transmissão de macacos a humanos dos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 em 125, 320, 100 e 200 anos, respectivamente.

Uma das explicações para a existência de quatro sorotipos seria a de que as cepas silvestres ancestrais do vírus dengue teriam se separado em linhagens distintas devido ao isolamento geográfico ou talvez ecológico, em diferentes populações de primatas, de modo que os quatro sorotipos evoluíram de forma independente. A exploração transoceânica no século XV, o estabelecimento de rotas de comércio e a migração humana, permitiram a dispersão dos quatro sorotipos do dengue silvestre e a eliminação do isolamento geográfico. Até então, os quatro sorotipos haviam divergido antígenicamente para sustentar a limitada proteção cruzada heterotípica. Sendo a incompleta proteção cruzada um desafio para as cepas de vírus dengue atuais, a competição dos quatro sorotipos por hospedeiros suscetíveis permitiu simpatria entre eles, supostamente reduzindo a competição por uma população hospedeira comum. A coexistência atualmente observada de múltiplos sorotipos com extensa diversidade genética pode ter se dado ou ainda se dar pela seleção do sistema imune do hospedeiro, através do processo de ADE - intensificação da replicação viral após infecções heterólogas. Dessa forma, cada sorotipo consegue realizar a replicação e a transmissão eficientemente em hospedeiros humanos e/ou primatas devido à reação cruzada imune limitada, de infecções heterólogas anteriores (COLOGNA; RICO-HESSE; ARMSTRONG, 2005; FERGUSON; ANDERSON; GUPTA, 1999; VASILAKIS et al., 2008). A maioria das filogenias mostra que o DENV-4 divergiu primeiro, seguido do DENV-2, e por fim o DENV-1 e o DENV-3 (HOLMES; TWIDDY, 2003).

A base da diversidade genética do DENV pode ser atribuída à propensão ao erro da RNA polimerase RNA dependente (RdRp), que não tem capacidade de reparar erros de leitura, podendo produzir aproximadamente uma mutação por ciclo de replicação do genoma (DRAKE, 1993). A diversidade genética também pode ocorrer na população viral pela migração (CHEN; VASILAKS, 2011), quando sorotipos ou genótipos são introduzidos em grandes áreas geográficas onde cepas geneticamente distantes já são endêmicas. Assim, a diversidade genética pode aumentar drasticamente, resultando em uma maior propensão a variações. Além disso, o aumento da densidade da população de hospedeiro/vetor pode ajudar a manter a diversidade do DENV, aumentando a taxa de transmissão, e, portanto, a quantidade de replicação e o tamanho da população viral (HOLMES; BURCH, 2000).

E, finalmente, embora a evolução clonal (acumulação de mudanças mutacionais selecionadas e mantidas, as quais são adaptadas tanto aos mosquitos quanto aos humanos) seja presumida como principal fundamento de evolução do DENV, a recombinação tem sido sugerida como um fator potencialmente importante no aumento da diversidade genética na população viral (CHEN; VASILAKS, 2011).

Rico-Hesse (1990) analisando a variação intra-sorotípica em um fragmento de 240 pb da junção E/NS1 do genoma dos DENV-1 e DENV-2, definiu o termo genótipo, que é usado para descrever variantes genéticas dentro de cada um dos quatro sorotipos, com sequências de nucleotídeos divergindo não mais que 6% dentro de uma determinada região do genoma.

O aumento da transmissão do vírus nos últimos 50 anos tem mostrado seu potencial adaptativo, com mudanças na posição dos aminoácidos de determinadas cepas de vírus dengue, ou ainda, mutações nos genes não estruturais, tendo um importante papel na mediação da transmissão epidêmica e aumento de formas graves do dengue (BENNETT et al., 2003; TWIDDY; WOELK; HOLMES, 2002). Fatores do hospedeiro como idade, raça, presença de anticorpos não neutralizantes na reação cruzada, também poderiam atuar como pressão seletiva resultando em genótipos mais virulentos que podem estar associados com as formas graves do dengue (RICO-HESSE et al., 1998; RICO-HESSE, 2003, 2007).

Holmes e Burch (2000) também relatam que as mutações, as recombinações, a suscetibilidade do hospedeiro e o fluxo gênico dos sorotipos do vírus dengue têm causado maior predisposição dos mesmos à diversidade genética. Assim, genótipos do mesmo sorotipo que se apresentam geneticamente distintos podem causar sintomas mais graves que outros, pela sua capacidade de ativar anticorpos heterotípicos no hospedeiro.

Holmes, Worobey e Rambaut (1999) sugeriram pela primeira vez eventos de recombinação genética em populações naturais do DENV-1. As análises filogenéticas de 15 sequências do gene E do DENV-1 revelaram que as amostras do Brasil (BR/90) e da Guyana Francesa (FGA/89), continham duas regiões distintas em seus genes E. Ambas apresentavam a maior parte das sequências deste gene estreitamente alinhadas com a sequência de um isolado de um paciente com FHD de Singapura em 1990. Tais sequências mostraram maior similaridade com sequências do genótipo I do DENV-1, enquanto que as outras 13 sequências restantes mostraram maior similaridade com as sequências de um aglomerado de

isolados coletados na região do Caribe entre 1977-1985 que representavam cepas do genótipo IV. Este estudo permitiu a identificação de “*breakpoints*” recombinantes dentro dos genes estruturais de isolados do DENV-1. Posteriormente, outros estudos (AASKOV et al., 2007; DRUMOND et al., 2012; TOLOU et al., 2001) também evidenciaram eventos de recombinação entre cepas de DENV-1 pertencentes a diferentes linhagens/genótipos, ou ainda, eventos de recombinação envolvendo sorotipos distintos (CHEN et al., 2008).

A disponibilidade de sequências genômicas completas permitiu uma análise mais robusta da filogenética dos vírus dengue. De acordo com Weaver e Vasilakis (2009), Zheng et al. (2009) e Chen e Vasilakis (2011), a filogenia atual, baseada na sequência completa do gene E identificou cinco genótipos para o DENV-1. Embora estudos filogenéticos anteriores baseados na sequência completa do gene E (LEWIS et al., 1993) tenham identificado quatro genótipos para o DENV-2, análises subsequentes que utilizavam um conjunto de dados mais amplo desse gene revelaram a existência de dois genótipos adicionais com distribuição geográfica restrita apenas a Ásia (CHEN; VASILAKIS, 2011; SALDA et al., 2005; TWIDDY et al., 2002), sendo assim o DENV-2 é composto por 6 genótipos. Para o DENV-3 estudos filogenéticos (AMARILLA et al., 2009; LANCIOTTI et al., 1994) revelaram a presença de quatro genótipos distintos. Estudos mais precisos da filogenia deste sorotipo feitos por King et al. (2008) e corroborados por Chen e Vasilakis (2011), confirmam os quatro genótipos identificados nos estudos anteriores, mas indicam a presença de um novo genótipo, assim o DENV-3 é composto por cinco genótipos distintos. Por fim, análises filogenéticas realizadas por Vasilakis e Weaver (2008), Villabona-Arenas e Zanotto (2011), indicaram a presença de quatro genótipos distintos para o DENV-4.

Estudos filogenéticos utilizando amostras do vírus dengue de locais e épocas diferentes levaram à diferenciação ou separação de subtipos dentro dos genótipos; nesse trabalho os subtipos foram relacionados com os níveis de gravidade, classificando os vírus do dengue epidemiologicamente como sendo de alto, médio e baixo impacto (RICO-HESSE, 2003). Subtipos dentro do genótipo V (American) do DENV-2 e genótipo IV (cepas de Porto Rico e Taiti) do DENV-3, por exemplo, são menos virulentos e têm capacidade reduzida de crescimento em culturas de células e mosquitos, comparados ao genótipo III (Asian/American) de DENV-2 e ao genótipo I (Asian) de DENV-3 (CHEN; VASILAKIS, 2011; WANG et al., 2000).

Ainda que as diferenças antigênicas e genéticas em cepas do vírus tenham tornado-se evidentes, a ausência de modelos animais adequados e eficientes tem dificultado a caracterização dos fatores envolvidos na patogenia viral. Os estudos feitos com primatas não humanos indicam que, em caso de infecção, ocorre a replicação viral, com o surgimento de resposta imune, porém eles não desenvolvem nenhum sinal clínico da doença. Os camundongos humanizados podem sustentar a replicação viral com presença de alguns sinais da doença, sendo que é necessário o desenvolvimento da patogenia em maior grau para validar a resposta imune (BENTE; RICO-HESSE, 2006; ZOMPI; HARRIS, 2012).

1.8 O Sorotipo DENV-1

O vírus dengue tipo 1 é um dos quatro sorotipos do arbovírus que causa a dengue (THEILER; DOWNS, 1973). O sorotipo 1 foi isolado pela primeira vez por Sabin e Schlesinger (1945), cepa que foi denominada de Hawaii. Estudos indicam que o DENV-1 evoluiu na Ásia e mais tarde se disseminou pela África e nas Américas (CÁCERES et al., 2008), porém a Malásia é considerada uma área onde todos os sorotipos do dengue evoluíram independentemente de uma linhagem silvestre ancestral (WANG et al., 2000). Nas Américas o DENV-1 foi introduzido em 1977 e mesmo com a mobilidade entre os países e aumento da oportunidade de introdução viral, apenas um genótipo circula no continente americano (GONÇALVES et al., 2002; MENDEZ et al., 2010; RICO-HESSE, 2003).

O primeiro relato de circulação do DENV-1 no Brasil aconteceu em Roraima durante a epidemia de 1981-1982 (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998), não existindo mais relato até a reintrodução em 1986, no estado do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986). No mesmo ano a epidemia se disseminou pelo Nordeste do país, com surtos nos estados de Alagoas e Ceará. Na região Centro-Oeste um surto causado pelo DENV-1 foi registrado em 1987. De 1990 a 2002 surtos de DENV-1 foram reportados em praticamente todas as regiões do país (BRASIL, 2002; FIGUEIREDO, 2003). Entre os anos de 2002 a 2006 o DENV-3 foi prevalente na maioria dos estados brasileiros, e de 2007 a 2009 foi substituído pelo DENV-2. Em 2009, depois de uma baixa circulação, o DENV-1 re-emergiu e foi o sorotipo detectado em 50,4% dos isolamentos virais, substituindo

DENV-2 e DENV-3 (DOS SANTOS et al.; 2011). Dados de Brasil (2010; 2011; 2013c) apontam que existiu uma alta soroprevalência deste sorotipo no país entre 2009-2011.

Estudos iniciais sobre a filogenia do DENV-1 feitas por Rico-Hesse (1990) a partir da análise da região E/NS1 de 40 isolados de DENV-1 indicou a presença de cinco genótipos, com os isolados das Américas, África e Ásia agrupando no genótipo I. Um estudo sobre a epidemiologia molecular de 16 cepas de DENV-1 isoladas nas cinco regiões geográficas brasileiras, realizados durante os anos de 1988 a 2001 por Pires Neto et al. (2005), revelaram que as cepas brasileiras do dengue 1 segregaram dentro de um grande grupo com cepas provenientes das Américas e do Caribe. Sardagna (2003) estudando isolados do DENV-1 entre os anos de 1998-2002, na cidade de Brasília-DF, e Vieira et al. (2007), realizando estudos sobre a característica genética do DENV-1 isolados durante os anos de 2001-2003 em Porto Velho-RO, indicaram que, segundo a classificação de Rico-Hesse (1990), todas as amostras analisadas foram classificadas no genótipo composto por isolados provenientes das Américas, África e Sudeste Asiático.

Posteriormente, estudos mais completos de cepas do DENV-1 realizados por Goncalvez et al. (2002), permitiram uma análise mais robusta das sequências, a partir do sequenciamento completo do gene E, indicando que as cepas das Américas/África/Ásia eram pertencentes ao genótipo V. A variabilidade genética dos DENV-1 do Brasil isolados durante os anos de 1994 a 2008 (CARNEIRO, 2009) mostrou que todas as cepas do estudo se agruparam no genótipo V.

Portanto, a filogenia atual do DENV-1 baseada na sequência completa do gene E (CHEN; VASILAKIS, 2011; GONÇALVEZ, 2002; WEAVER; VASILAKIS, 2009; ZHENG et al., 2009) identifica as linhagens da seguinte forma: (i) genótipo I, representando cepas do Sudeste da Ásia, China e África Oriental; (ii) genótipo II, representando variedades da Tailândia coletados na década de 1950 e 1960; (iii) genótipo III, representando a variedade silvestre coletada na Malásia; (iv) genótipo IV, representando cepas das Ilhas do Pacífico Ocidental e Austrália; e (v) genótipo V, representando todas as cepas coletadas nas Américas, variedades da África Ocidental, e um número limitado de cepas coletadas na Ásia.

Além dos genótipos, Myat Thu et al. (2005) e Kukreti et al. (2009) sugerem a existência de linhagens com relações geográficas e temporais distintas, uma vez que o retorno e a substituição de linhagens têm se tornado frequentes em estudos

filogenéticos. O termo linhagem tem sido usado não oficialmente para caracterizar os vírus agrupados em clados num nível taxonômico abaixo de genótipo (MENDEZ et al., 2010).

Análises das sequências do gene E realizadas por Dos Santos et al. (2011) com cepas de DENV-1 isoladas depois da reemergência deste sorotipo em 2009 e 2010, demonstraram que as cepas isoladas no Rio de Janeiro - RJ durante os anos de 2009 e 2010, juntamente com um isolado oriundo do estado do Espírito Santo, isolado no ano de 2009, ainda pertenciam ao genótipo V, mas agruparam em um clado distinto (linhagem II) daquele representado por cepas brasileiras de DENV-1 anteriores (linhagem I), resultantes da primeira introdução no ano de 1986. Estas cepas mostraram estar mais relacionadas às cepas isoladas em Singapura em 1990 e em 2005, fato que sugere uma provável origem Asiática. Entretanto, uma cepa isolada em 2010 e outra recentemente isolada em 2011, ambas no Rio de Janeiro, agruparam juntas formando outro clado distinto (linhagem III). Estas cepas agruparam com cepas isoladas em 2007 e 2008 na Colômbia, Venezuela e México, o que sugere uma origem Latino Americana. Estudos recentes de caracterização molecular utilizando genomas completos do DENV-1, realizados por Carneiro et al. (2012) e Drumond et al. (2012), também mostraram que os isolados brasileiros analisados pertenciam ao genótipo V, divididos em várias linhagens. Além disso, estes estudos indicaram a co-circulação e substituição destas linhagens dentro do território brasileiro.

Cordeiro (2010) analisando filogeneticamente cepas de DENV-1 isolados no município de Boa Vista-RR, classificou todas pertencentes ao genótipo V. Ao analisar as relações entre as cepas de DENV-1 isoladas nas Américas, as amostras de Boa Vista formaram clado com amostras da Venezuela isoladas em 1997 e 2007, mas não com uma cepa isolada no Brasil em 1997, tendo esta se agrupado com amostras da Argentina isoladas em 2000, sugerindo que no ano de 1997, pelo menos duas linhagens de DENV-1 circularam no Brasil.

1.9 Patogênese

A infecção com um dos quatro sorotipos do DENV induz imunidade duradoura, provavelmente por toda vida, contra o sorotipo infectante (imunidade homotípica). Apesar de ser gerada uma resposta imune cruzada entre os sorotipos heterólogos que pode ser protetora, esta resposta é de curta duração (alguns meses) contra os sorotipos heterólogos. Sendo assim, naturalmente ocorrem infecções sequenciais com os diferentes sorotipos virais, principalmente nas regiões hiperendêmicas, onde há co-circulação de vários sorotipos dos DENVs (AZEVEDO, 2011; LAOPRASOPWATTANA et al., 2007; MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

A patogênese do vírus dengue parece ser determinada pela interação de numerosos fatores: virulência viral, interação vírus-mosquito, imunidade e estado imunológico do hospedeiro, genética do hospedeiro, e outros como, por exemplo, doenças pré-existentes (RICO-HESSE, 2010) e cada um dos quatro sorotipos é capaz de causar formas graves do dengue (HOANG et al., 2010). Oscilações na prevalência de cada sorotipo são comuns em regiões endêmicas, sendo típico um sorotipo ser dominante por 2 a 4 anos, depois há um declínio na prevalência, quando um sorotipo diferente surge para substituí-lo (RABAA et al., 2010).

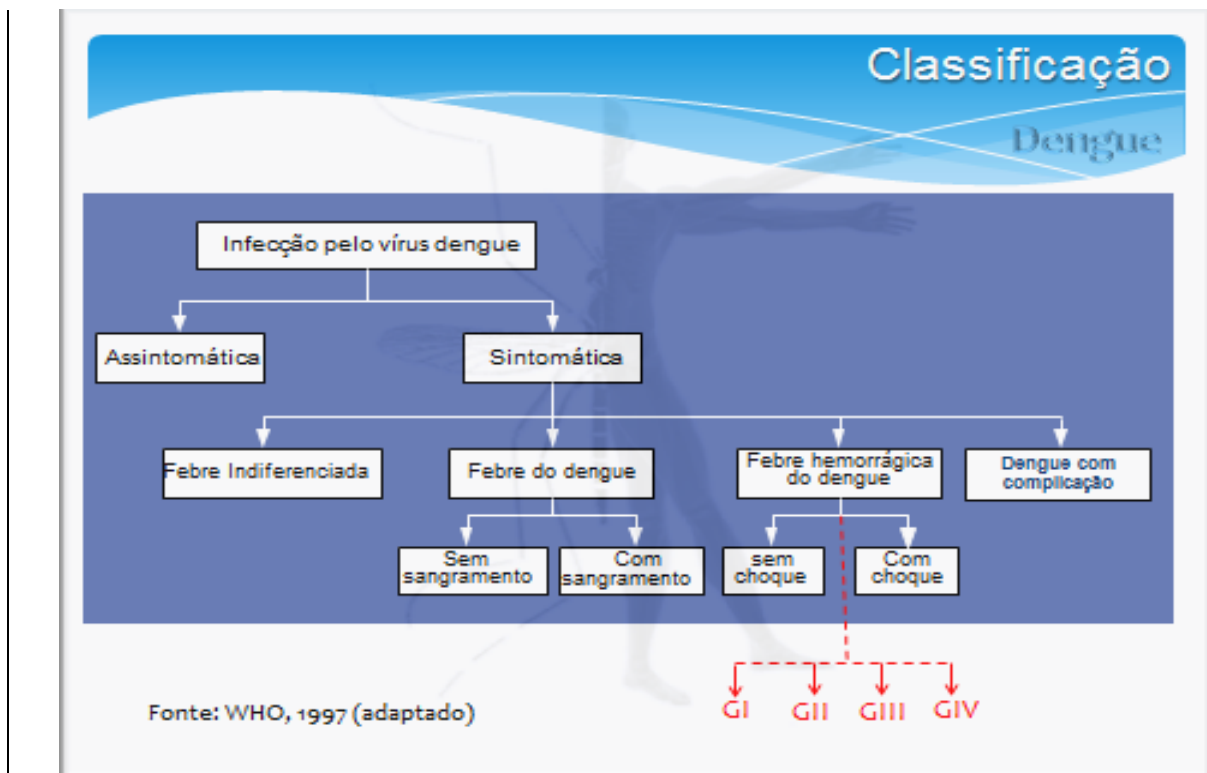
Segundo a WHO (1997), a infecção pelo vírus dengue causa doença que inclui desde formas assintomáticas até quadros graves de hemorragia e choque, podendo evoluir para óbito (figura 11).

Embora cerca de 50-90% de todos os casos do dengue sejam assintomáticos (BALMASEDA et al., 2006), a FD clássica é uma doença febril debilitante, caracterizada por dor de cabeça, mialgia, artralgia, dor retro-orbital e erupções cutâneas, com duração média de 4 a 7 dias (KYLE; HARRIS, 2008).

As FGD representam aproximadamente 2% das infecções humanas (KYLE; HARRIS, 2008). Na DCC, que envolve todos os casos que não se enquadram nos critérios de FHD e quando a classificação de dengue clássica é insatisfatória, dado o potencial de risco, a presença de um dos itens a seguir caracteriza o quadro: alterações neurológicas; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; plaquetopenia igual ou inferior a $50.000/\text{mm}^3$; hemorragia digestiva; derrames cavitários; leucometria global igual ou inferior a $1.000/\text{mm}^3$; óbito. Manifestações clínicas menos frequentes incluem as neurológicas e psíquicas tanto em adultos

como em crianças caracterizadas por delírio, sonolência, coma, depressão, irritabilidade, psicose maníaca, demência, amnésia e outros sinais meníngeos, paresias, paralisias e encefalite surgem no decorrer do período febril ou mais tardiamente, na convalescença (BRASIL, 2002). Na FHD o principal evento é o extravasamento do plasma, frequentemente ocorrendo efusão pleural, ascite e hipoproteinemia. Além disso, febre alta, fenômenos hemorrágicos (petequias, equimoses, epistaxe, sangramento gengival ou gastrointestinal), hepatomegalia e falência circulatória podem ser observadas. Na SCD, pode ocorrer falência circulatória, pulso rápido e fraco, hipotensão, pele fria, úmida e estado mental alterado; mas quando diagnosticadas precocemente, as formas graves podem ser revertidas pela hidratação e alívio dos sintomas (WHO, 1997).

Figura 11 – Esquema indicando as manifestações da infecção pelo vírus Dengue



Legenda: GI; GII; GIII; GIV – Classificação da FHD de acordo com a gravidade. **GI**: Febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva; **GI**: além das manifestações do GI, hemorragias espontâneas leves; **GIII**: SCD - colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação; **GIV**: SCD – choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível.

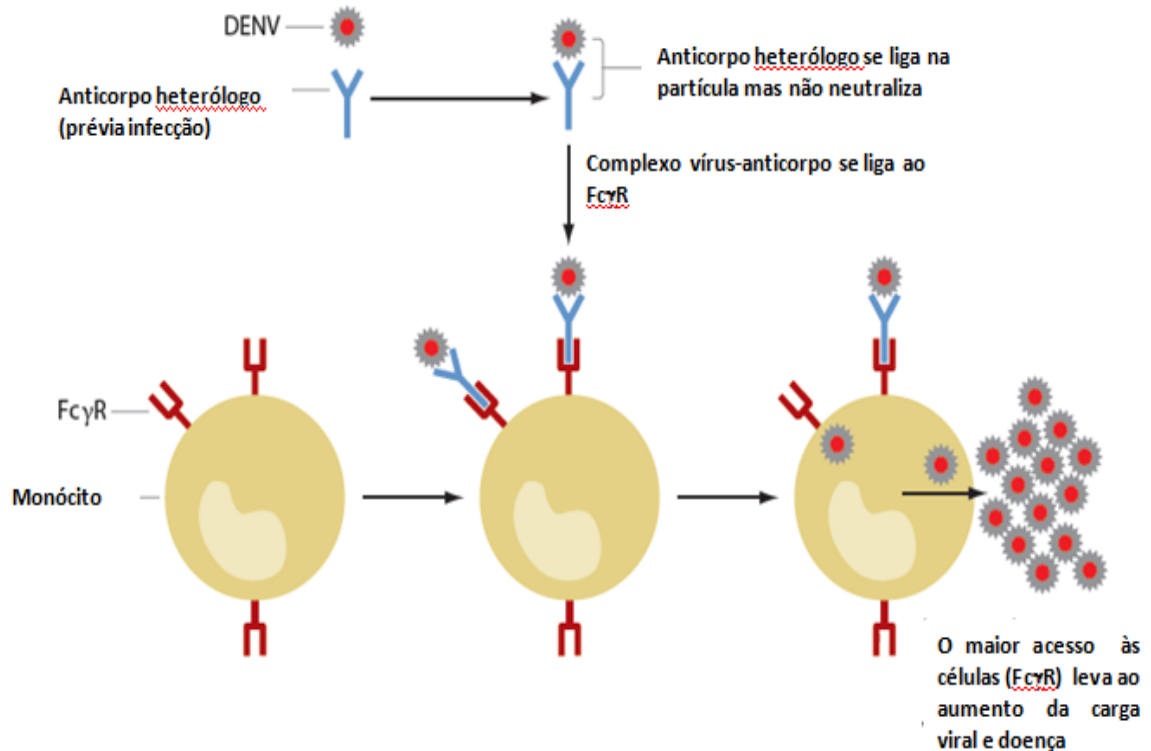
Fonte: Adaptado de WHO (1997)

Alguns fatores são importantes na progressão de uma FD clássica para as formas graves do dengue, tais como: a cepa e o sorotipo do vírus, idade, imunidade, etnia (pessoas brancas têm maior risco que pessoas negras), sexo (sugere-se que mulheres tenham maior risco que homens), estado nutricional, doenças crônicas e fatores genéticos, entretanto, infecção secundária é considerado o principal fator de risco para formas graves do dengue (ANDERS et al., 2011; APPANNA et al., 2010; GUBLER, 2002; GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; HALSTED, 2007; KALAYANAROOJ; NIMMANNITYA, 2005; VAUGHN et al., 2000). Uma epidemia de FHD por DENV-2 registrada em Cuba no ano de 1981, que foi precedida de uma epidemia leve de DENV-1 em 1977, apóia a hipótese de que uma segunda infecção é o principal fator de risco para formas graves do dengue, visto que, dos 10.000 casos de FHD/SCD, a segunda infecção na sequência DENV-1/DENV-2 foi demonstrada em 98% dos casos das formas graves (KOURI et al., 1989).

A teoria predominante e mais aceita que associa infecções secundárias a formas graves do dengue é a do fenômeno do aumento da replicação dependente de anticorpos - ADE (Antibody-Dependent Enhancement). Este fenômeno é proposto como um mecanismo biológico que influencia a rapidez do DENV em infectar as células alvo, intensificando a replicação viral e diminuindo a imunidade humoral derivada de uma infecção por DENV anterior.

O fenômeno ADE (figura 12) ocorre quando anticorpos heterotípicos não-neutralizantes presentes no hospedeiro de uma infecção primária, se ligam ao vírus durante uma infecção secundária heterotípica, mas são incapazes de neutralizá-lo. Ao invés disso, o complexo infeccioso vírus-anticorpo recentemente formado, se liga aos receptores $Fc\gamma R$ na superfície dos monócitos/fagócitos, facilitando assim a infecção, a rapidez no ataque as células alvo e replicação viral. É importante destacar que as células com receptores $Fc\gamma R$ não seriam facilmente infectadas na ausência deste anticorpo (HALSTED, 2003, 2007; MURPHY E WHITEHEAD, 2011).

Figura 12 – Representação esquemática do fenômeno ADE



Fonte: Adaptado de Murphy e Whitehead (2011)

Considerando o ADE como um mecanismo central, é sugerido que a FHD/SCD durante uma infecção secundária é resultado de uma intensificação na infecção dos fagócitos. O complexo imune infeccioso suprime a resposta imune celular, aumentando a infecção intracelular e induzindo a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que juntas, contribuem para o desenvolvimento de doença grave (HALSTEAD, 2008a, 2008b).

1.10 O vetor

Os mosquitos do gênero *Aedes* são considerados os vetores naturais do DENV, especialmente *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*, sendo o *Ae. aegypti* o principal vetor em áreas urbanas (ANDERSON; RICO-HESSE, 2006; BEATTY, 2010; GUBLER, 1998). O mosquito é originário da África e se espalhou pela Ásia e Américas através do comércio de escravos e por meios de transportes cada vez mais rápidos (HALTEAD, 2008a).

O *Ae. aegypti* (figura 13) é um mosquito diurno, endofílico e adaptado a aglomerações humanas. As larvas e pupas do mosquito têm preferência por água limpa e os ovos são depositados na parede de diversos tipos de recipientes artificiais de água, podendo resistir à dessecação por meses e eclodem, quando submersos em água (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; NATAL, 2002).

Figura 13 – Mosquito vetor do vírus Dengue



Fonte: <http://mundo-do-biologo.blogspot.com.br>

O vírus é transmitido aos humanos pela picada da fêmea do mosquito, uma vez que o repasto sanguíneo é necessário para a maturação dos ovos. O mosquito adquire o vírus quando realiza o repasto sanguíneo sobre pessoas infectadas ou por transmissão transovariana, ocorrendo quando a fêmea transmite o patógeno à sua progênie. Esse mecanismo não é muito eficiente e ocorre com baixa positividade, mas representa uma adaptação de extrema importância para a manutenção do vírus dengue em condições limitantes, como estações secas ou frias, falta de lugar propício para oviposição e limitação da população de hospedeiros humanos susceptíveis (ANGEL; SHARMA; JOSHI, 2008; CASTRO et al., 2004; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994; JOSHI; MOUYRA; SHARMA, 2002; ZEIDLER et al., 2008).

Uma grande variedade de fatores influencia a dinâmica espacial e temporal das populações de mosquitos e, portanto, os padrões de transmissão do dengue em populações humanas (GUBLER et al., 2001). Um comportamento do *Ae. aegypti* que aumenta sua capacidade vetorial é a sua natureza nervosa, que permite a

interrupção do repasto sanguíneo ao menor dos movimentos e posterior retorno ao mesmo hospedeiro ou a um diferente, e sua preferência por sangue. Essas características comportamentais aumentam o potencial do vetor em transmitir o patógeno para vários hospedeiros em um pequeno espaço de tempo (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001; PLATT et al., 1997).

Temperatura, precipitação e umidade interferem em todos os estágios de desenvolvimento do vetor como: emergência e viabilidade dos ovos, o tamanho e longevidade dos mosquitos adultos e a sua dispersão no ambiente (LUZ et al., 2008). Além disso, fatores como a urbanização humana não planejada, alta densidade populacional (CARBAJO; CURTO; SCHWEIGMANN, 2006), a precariedade dos sistemas de coleta de lixo e de abastecimento de água – problemas frequentes em países em desenvolvimento – favorecem a proliferação de criadouros e disseminam a infecção (LAZCANO et al., 2006).

1.11 Ciclos de transmissão

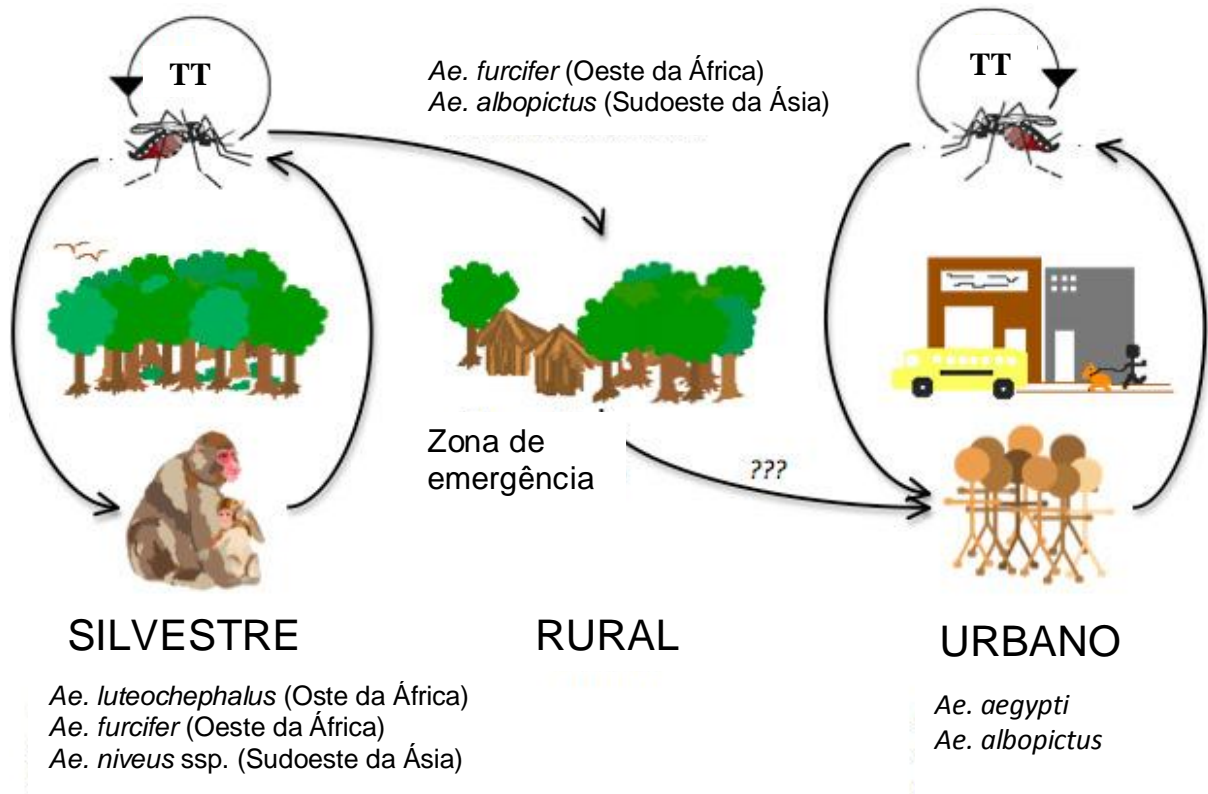
A transmissão do DENV ocorre em dois ciclos distintos (figura 14): o ciclo silvestre e o ciclo urbano, ambos envolvendo um hospedeiro invertebrado (vetor) e outro vertebrado.

O ciclo silvestre envolve mosquitos *Aedes* e primatas nas florestas tropicais da Ásia e da África, podendo ocorrer epidemias em localidades rurais ou ilhas onde a população humana é pequena (GUBLER, 1998). Diferentes espécies de *Aedes* podem atuar neste ciclo de transmissão: na África os principais vetores incluem *Ae. (Stegomyia) luteocephalus*, *Ae. (Diceromyia) furcifer* e *Ae. (Diceromyia) taylori* (DIALLO et al., 2003); na Ásia os principais vetores incluem os mosquitos primatófilos arbóreos do complexo *Ae. (Finlaya) niveus* (RUDNICK, 1986). Estudos filogenéticos mostram que todos os isolados silvestres são geneticamente distintos de todos os isolados urbanos, e são distantes também evolutivamente (WANG et al., 2000).

Já foram isolados sorotipos silvestres do DENV-1, DENV-2 e DENV-4. Apesar de nenhum DENV-3 silvestre ter sido isolado, acredita-se que exista, pois foram encontrados anticorpos contra DENV-3 em macacos. Apesar dessas informações,

pouco se sabe sobre a forma e quando ocorreu essa interação do homem com o ciclo silvestre do DENV (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

Figura 14 – Os ciclos de transmissão do vírus Dengue



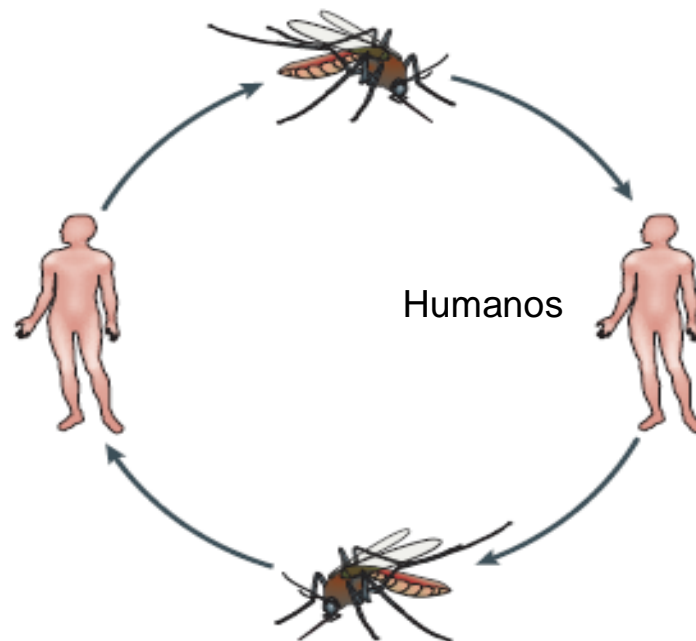
Legenda: **TTO** – transmissão transovariana.
 Fonte: Adaptado de Chen e Vasilakis (2011)

Atualmente, quase todas as infecções por vírus dengue ocorrem devido às cepas que circulam exclusivamente em ambiente doméstico e peridoméstico ao longo dos trópicos, onde os humanos servem como único hospedeiro de amplificação e reservatório viral (CHEN; VASILAKIS, 2011). Dessa forma, o ciclo urbano - endêmico/epidêmico (figura 15) - tem grande importância do ponto de vista de saúde pública, tendo como hospedeiros o humano e o mosquito *Ae. aegypti*, enquanto outras espécies de *Aedes*, como o *Ae. albopictus* e o *Ae. polynesiensis*, servem como vetores secundários (GUBLER, 1997).

A transmissão viral ocorre quando um mosquito infectado pica o humano. Depois que ocorreu a infecção, o vírus passa por um período de incubação dentro do organismo humano, chamado de Período de Incubação Intrínseca (PII) que dura em média de 4 a 7 dias, no qual os sinais e sintomas da fase aguda da doença são

apresentados. Este período é a fase de viremia, onde o vírus circula no sangue periférico. Se outros mosquitos vetores se alimentarem do hospedeiro infectado durante a fase de viremia, tornam-se infectados. O vírus é multiplicado no mosquito durante um Período de Incubação Extrínseca (PIE) que dura em média de 8 a 14 dias, e, subsequentemente, podem transmitir o vírus a outras pessoas susceptíveis até o final da vida, que é de seis a oito semanas (CORRÊA; FRANÇA; BOGUTCHI, 2005; GUBLER, 1998).

Figura 15 – Esquema do ciclo de transmissão do vírus Dengue em área urbana



Fonte: Adaptado de Whitehead et al. (2007)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a epidemiologia molecular dos vírus dengue sorotipo 1 isolados no estado de Roraima no período de 2008 a 2010.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar as amostras com sorotipos DENV-1 nas amostras disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular – LabMoL, entre os anos de 2008 a 2012.
- Sequenciar a região genômica que codifica a proteína E dos vírus dengue sorotipo 1 circulantes no Estado, no período de 2008 a 2010.
- Determinar os genótipos dos vírus dengue sorotipo 1 circulantes no Estado, no período de 2008 a 2010.
- Caracterizar as sequências obtidas com base nas sequências disponíveis no GenBank.
- Estudar a filogenia e a evolução dos vírus dengue 1 isolados.
- Indicar as possíveis rotas de introdução e dispersão do vírus dengue 1 no Estado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia do trabalho seguiu as etapas indicadas no fluxograma (figura 16) a seguir:

Figura 16 - Fluxograma geral indicando a sequência metodológica empregada durante a realização da pesquisa



3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no estado de Roraima, localizado no extremo norte do país, que apresenta uma população de 450.479 habitantes distribuídos em 15 municípios (BRASIL, 2010b), fazendo fronteiras internacionais com República Cooperativa da Guiana (Leste e Nordeste), República Bolivariana de Venezuela (Norte e Noroeste), e fronteiras nacionais com Amazonas (Sul e Sudoeste) e Pará (Sudeste), como pode ser observado na figura 17.

Figura 17 – Mapa do estado de Roraima com suas fronteiras nacionais e internacionais



Fonte: Google Maps

3.2 Amostragem

Este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Roraima, tendo sido aprovado pelo mesmo, sob parecer nº 110605-CoEP (ANEXO A).

O estabelecimento de um convênio entre o Laboratório Central do Estado (LACEN-RR) e o Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol), permitiu a

disponibilidade de amostras de soro de pacientes positivos e/ou negativos para o dengue.

Após a coleta das amostras de soro dos pacientes com suspeita de dengue nos diferentes Centros de Saúde do Estado, o LACEN realizou o teste de detecção do antígeno NS1 (método imunoenzimático para detecção da infecção por dengue na fase aguda da doença). Nas amostras NS1+ (positiva), foi realizada a identificação do sorotipo de dengue, segundo a disponibilidade de reagentes, no próprio LACEN, ou as mesmas foram enviadas ao Instituto Evandro Chagas (IEC/PA).

Alíquotas dessas amostras, ainda com quantidade de soro suficiente, foram enviadas ao LaBMol sob refrigeração, acompanhadas dos dados da coleta, do resultado do teste NS1 e das fichas clínicas, que na maioria das vezes, apresentavam informações incompletas. As amostras receberam uma identificação interna e foram mantidas em freezer, a -80°C até o momento de serem analisadas. Algumas amostras chegam ao LaBMol com identificação do sorotipo, porém, todas as amostras recebidas passam pelos procedimentos de Isolamento Viral e/ou RT-PCR.

Para a realização deste estudo foram analisadas um total de 150 amostras da soroteca do LaBMol, que apresentavam informação de sorotipo ou não, disponibilizadas entre os anos de 2008 a 2012. Deste total, foram utilizadas 13 amostras (quadro 1) de pacientes com Dengue Clássica (DC), registradas entre os anos de 2008 a 2010.

Quadro 1 – Descrição das amostras de DENV-1 utilizadas no estudo

Amostra	Ano	Material Biológico	Procedência (Município)	História de passagem^{B, C}	Clínica	Sexo
RR08/02	2008	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 2	DC	M
RR09/02	2009	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 2	DC	F
RR09/07	2009	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 2	DC	M
RR09/64	2009	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	F
RR09/75	2009	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	M
RR09/76	2009	Fluído celular	Iracema	C6/36; 1	DC	F
RR09/86	2009	Fluído celular	Normandia	C6/36; 1	DC	F
RR09/109	2009	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	F
RR09/183	2009	Fluído celular	Bonfim	C6/36; 1	DC	M

RR10/33	2010	Fluído celular	Boa Vista	C6/36;2	DC	M
RR10/38	2010	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	F
RR10/96	2010	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	M
RR10/108	2010	Fluído celular	Boa Vista	C6/36; 1	DC	M

Legenda: ^B Hospedeiro – C6/36, linhagem de célula de *Aedes albopictus*; ^C Número de passagens no hospedeiro – 1 ou 2; DC – Dengue Clássica; M – masculino; F – feminino.

Fonte: Laboratório de Biologia Molecular – LaBMol – UFRR (2013)

3.3 Isolamento viral

A técnica seguiu a metodologia desenvolvida por Igarashi (1985). Células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 foram cultivadas em garrafas estéreis, com capacidade para 55 mL, contendo 5 mL de meio de cultura Leibovitz's L-15 a 5%, modificado com L- glutamina (Himedia – Mumbai/India), suplementado com uma solução de 2,95% de triptose fosfato, 25 mL de soro fetal bovino (InvitrogenTM, USA), 10 mL de estreptomicina 100 µg/mL – penicilina 100 U/mL (GIBCO – InvitrogenTM, USA), 1 mL de antifúngico (Fungizone - 5µg/mL) e 10 mL de solução de aminoácidos não-essenciais 100x (Sigma[®] – São Paulo/BR). As garrafas foram incubadas por sete dias, em estufa BOD a 28°C até a formação da monocamada de células.

Após a formação da monocamada celular, as garrafas contendo 5 mL de meio de manutenção L-15 a 2%, suplementado com 10 mL de soro fetal bovino (InvitrogenTM, USA) foram inoculadas com 20 µL de soro da amostra analisada. As garrafas inoculadas foram incubadas em estufa BOD a 28°C por dez dias. Durante o período de incubação, as monocamadas celulares foram inspecionadas diariamente utilizando o microscópio invertido WILOVERT Standard (Hund, Germany) para detecção ou não de efeito citopático (ECP). O ECP é caracterizado pela formação de sincícios (células gigantes multinucleadas), curvatura da célula, destacamento da superfície, lise, arredondamento, picnose nuclear ou fagocitose, ou seja, definido como alterações morfológicas que podem ocorrer nas células em cultura, quando infectadas por vírus. Findo os dez dias de incubação, o material com ou sem ECP resultante da inoculação das amostras de soro (fluído celular) foi coletado e armazenado em freezer a -80°C para posterior realização do teste de Imunofluorescência Indireta para identificação dos sorotipos, e RT-PCR para confirmação da infecção celular.

3.4 Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A técnica seguiu a metodologia desenvolvida por Gubler et al. (1984). O teste de IFI para a identificação da infecção celular consistiu na transferência de 10 µL do fluido celular (1ª ou 2ª passagem), para *spots* de lâminas de microscopia apropriada para imunofluorescência. O material foi seco à temperatura ambiente e fixado com acetona gelada (-20°C) por 10 min, e novamente, seco a temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados em cada um dos *spots* 10 µL de anticorpos monoclonais sorotipo-específicos para os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 diluídos em tampão PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4) na proporção de 1:40, com posterior incubação a 37°C por 30 min em câmara úmida. As lâminas foram lavadas por imersão, uma vez, rapidamente, em PBS (pH 7,4), sendo que em seguida foram deixadas em nova solução de PBS durante 10 min, e logo após foram lavadas rapidamente em água destilada, sendo secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado aos *spots* 10 µL de anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína diluído em solução de azul de Evans na proporção de 1:40, sendo que esta última solução foi diluída em PBS (pH 7,4) na proporção de 1:100. As lâminas foram incubadas mais uma vez a 37°C por 30 min, sendo o procedimento de lavagem repetido. As lâminas foram montadas em glicerina tamponada e lamínula de vidro para visualização em microscópio de fluorescência L-200A-Fluor (PHYSIS, China). O teste foi considerado positivo quando houve evidente fluorescência celular em comparação ao controle positivo e controle negativo.

3.5 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral das amostras de fluido celular (1ª passagem / 2ª passagem) foi realizada utilizando-se o Axyprep™ Fluido Corporal DNA/RNA Viral Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA), seguindo as instruções do protocolo recomendado pelo fabricante. Uma alíquota de 200 µL da amostra (fluido celular) foi adicionada a 200 µL do tampão V-L, essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Logo após, foram acrescentados 75 µL do tampão V-N, sendo realizada a centrifugação a 12.000 x g por 5 min. Ao sobrenadante foram

adicionados 250 µL de isopropanol com 1% de ácido acético, o qual foi posteriormente transferido para tubos novos, contendo colunas de Miniprep, para realização centrifugação a 6.000 x g por 1 min. Finda a centrifugação, o filtrado foi descartado e à coluna foram adicionados 500 µL do tampão W1, que foi centrifugado a 12.000 x g por 1 min. O filtrado foi novamente descartado e à coluna foram acrescentados 800 µL do tampão W2 com centrifugação a 12.000 x g por 1 min. Novamente o filtrado foi descartado, sendo realizada outra centrifugação a 12.000 x g por 1 min. A coluna foi transferida para novos tubos onde adicionou-se 60 µL de tampão TE. Esse sistema foi incubado à temperatura ambiente por 1 min, mais uma vez centrifugado a 12.000 x g por 1 min, e finalmente, o eluído foi armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso.

3.6 Sorotipagem do vírus Dengue por RT- Hemi - *Nested* - PCR

A detecção do sorotipo viral foi realizada pela técnica de RT-PCR modificada de Lanciotti et al. (1992). Esta metodologia é uma técnica validada em vários laboratórios no mundo, bastante utilizada no diagnóstico de rotina da dengue em vários países (ALVES, 2005). Todos os fragmentos amplificados na RT- Hemi - *Nested* - PCR estão localizados na região de confluência entre o gene C/prM (figura 18-a). A sequência dos iniciadores utilizados nesta técnica é mostrada na tabela 2.

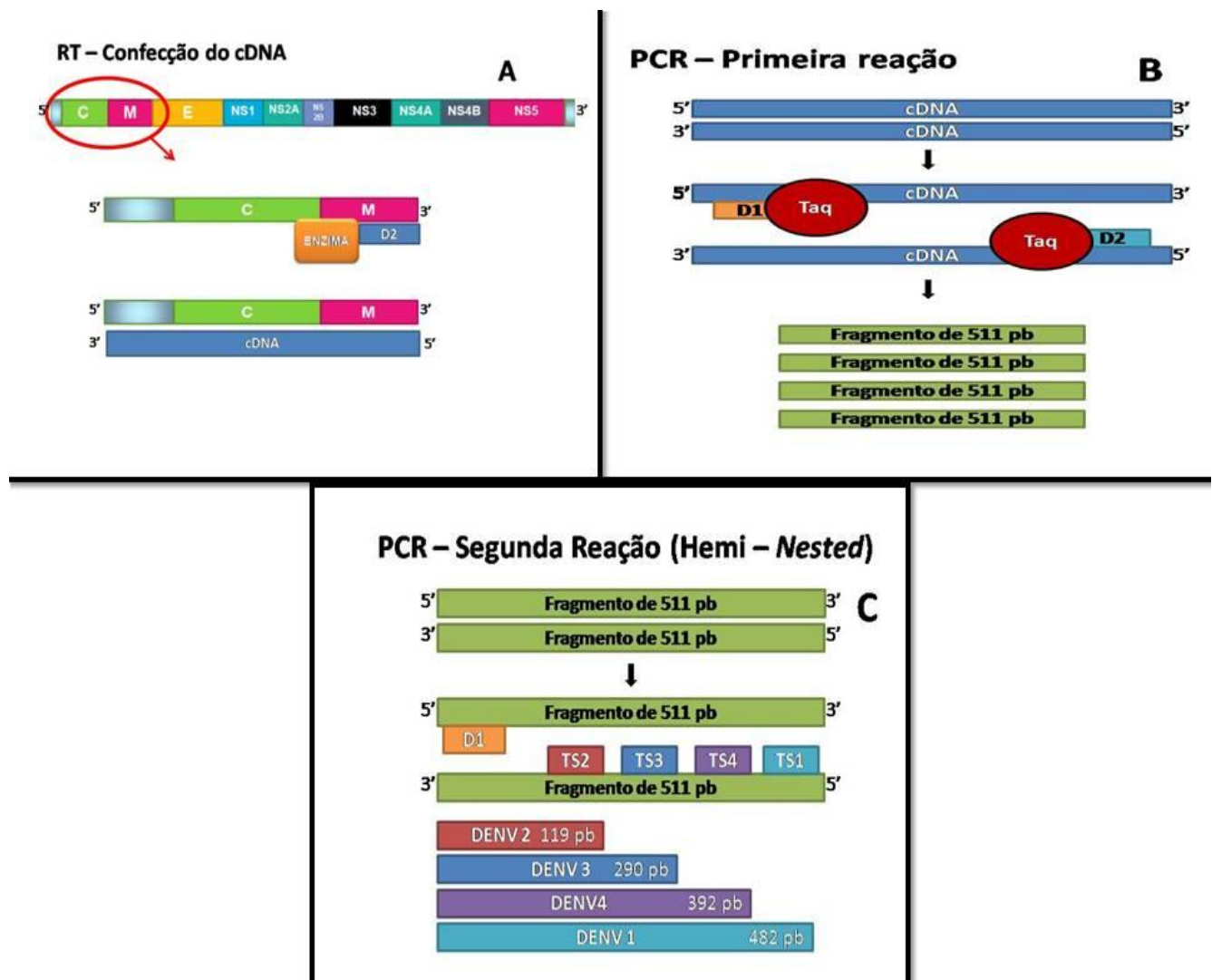
A sequência do RNA viral foi sintetizada para um cDNA (figura 18-a), que posteriormente passou por duas etapas de amplificação. No primeiro turno da PCR (figura 18-b) foram utilizados o par de iniciadores D1 e D2 que amplificam um fragmento de 511 pares de bases (pb). No segundo turno da PCR - Hemi-*nested* (figura 18-c) foram utilizados os iniciadores TS1, TS2, TS3, TS4, que amplificam fragmentos específicos para cada sorotipo viral, com os tamanhos de 482 pb (DENV-1), 119 pb (DENV-2), 290 pb (DENV-3) e 389 pb (DENV-4).

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores usados para determinar o sorotipo do vírus Dengue

INIC	Sequência 5'– 3'	Região	Referência	Pb
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	C/prM	LANCIOTTI et al., 1992	511pb
D2	TTGCACCAACAGTCAAATGCTTCAGGTTTC	C/prM	LANCIOTTI et al., 1992	511pb
TS1	CGTCTCAGTGATCCCCGGGGG	C/prM	LANCIOTTI et al., 1992	482pb
TS2	CGCCACAGGGCCATGAACAG	C/prM	LANCIOTTI et.al., 1992	119pb
TS3	TAAATCATCATGAGACAGAGC	C/prM	LANCIOTTI et.al., 1992	290pb
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGGA	C/prM	LANCIOTTI et.al., 1992	389pb

Legenda: Pb – número de pares de bases.
Fonte: Adaptado de Lanciotti et al. (1992)

Figura 18 – Esquema da técnica de RT-PCR para sorotipagem do vírus Dengue com o uso da metodologia de Lanciotti et al. (1992)



Fonte: Freitas (2011)

3.6.1 *Transcrição Reversa (RT)*

Para confecção da fita de cDNA foram utilizados 5 µL do RNA, além de um controle positivo e um controle negativo. Em cada tubo foi adicionado 1µL de iniciador D2 (10µM) e em seguida, as amostras foram aquecidas a 70°C por 5 min e rapidamente resfriadas em gelo. Posteriormente, a cada amostra foram adicionados 19 µL do MIX-RT (mistura da Transcriptase Reversa) contendo tampão 1X (250 mM Tris-HCL [pH 8,3], 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 2,5 mM de espermidina, 50 mM DTT), 0,4 U/µL de inibidor de RNase (HexapurBiotechnology), 1mM de dNTPs (Amresco®, USA), 0,2 U/µL de AMV-RT (Promega®, Madison, USA) e água livre de nucleases em q.s.p. 19 µL. A mistura foi incubada a 42°C por 60 min em termociclador (PxEThermalCycler, ThermoElectron Corporation, USA). Após a incubação, o cDNA de cada amostra e os controles foram armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.6.2 *Primeira reação da PCR*

Após a confecção do cDNA de cada amostra realizou-se a primeira reação de PCR para a amplificação do cDNA.

A 22,5 µL do mix da PCR, que continha tampão 1X (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 0,2 mM de dNTPs (Amresco®, USA), 0,2 µM dos primers D1 e D2, 0,025 U/µL de *Taq* DNA Polimerase with Standard *Taq* Buffer (Biolabs®, New England) e água livre de nucleases em q.s.p. 22,5 µL, foram adicionados 2,5 µL do cDNA. Foram acrescentados um controle positivo e um controle negativo. Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador (PxEThermalCycler, Thermo Electron Corporation, USA) e submetidas a 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 30 seg, 20 ciclos térmicos, cada um composto pelas etapas de desnaturação a 95°C por 30 seg, hibridização dos iniciadores a 55°C por 30 seg e extensão a 68°C por 45 seg, seguida de 1 ciclo de extensão final a 68°C por 5 min.

3.6.3 Reação de Hemi-nested-PCR (2ª Reação de PCR)

Após o primeiro turno de amplificação, realizou-se o segundo turno de amplificação, neste caso, um Hemi-*nested*-PCR.

A 25 µL do mix da Hemi-*nested*-PCR, que continha tampão 1X (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 0,2 mM de dNTPs (Amresco®, USA), 0,1 µM de cada um dos iniciadores D1, TS1, TS2, TS3 e TS4, 0,025 U/µL de *Taq* DNA Polimerase with Standard *Taq* Buffer (Biolabs®, New England) e água livre de nucleases em q.s.p. 25 µL, foi adicionado 0,1 µL do produto amplificado da primeira reação de PCR. Foram acrescentados um controle positivo e um controle negativo. Em termociclador (PxEThermalCycler, ThermoElectron Corporation, USA), as amostras foram submetidas a 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 30 seg, 30 ciclos térmicos, cada um composto por etapa de desnaturação a 95°C por 30 seg; hibridização dos iniciadores a 55°C por 30 seg e extensão a 68°C por 30 seg, seguida de 1 ciclo de extensão final a 68°C por 5 min.

Após os ciclos térmicos, 9 µL dos produtos amplificados da reação de Hemi-*nested*-PCR acrescido com 1 µL de azul de bromofenol (Proquimios, Brasil) foram submetidos à corrida eletroforética a 100 V por 35 min, em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, acrescido de 1 µL de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10.000 X (Biotium). Foi observada a presença do produto amplificado através de fotodocumentador (MiniBis Pro, Bio-Imaging Systems, Uniscience) com luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Amresco®, USA). Os tamanhos dos fragmentos dos diferentes sorotipos do dengue são: DENV-1(482pb), DENV-2 (119pb), DENV-3 (290pb), DENV-4 (389pb).

3.7 RT-PCR da região que codifica a proteína E de cepas do DENV-1

A região que codifica a proteína E do envelope viral está localizada entre as posições 934 e 2419 do genoma do DENV, representando um fragmento de 1485 pb de comprimento. Para a confecção do cDNA, amplificação e sequenciamento da região que codifica a proteína E das cepas de DENV-1 estudadas, foram utilizados

os iniciadores desenhados pelo pesquisador Prof. Dr. Felipe Gomes Naveca e representados nas tabelas 3 e 4 (dados ainda não publicados).

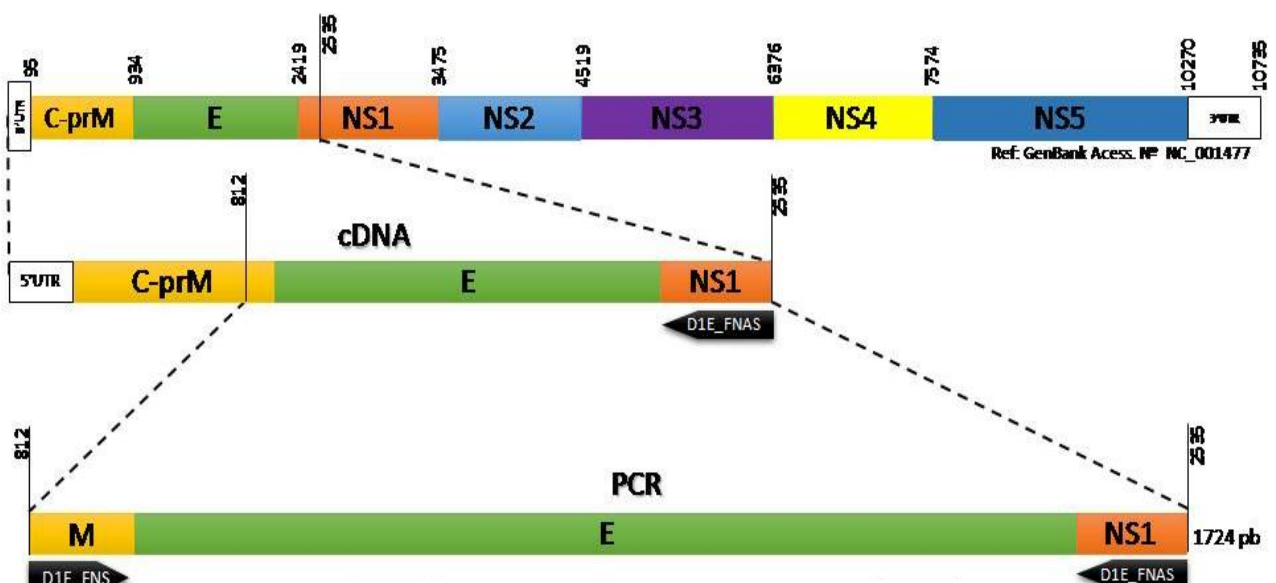
Tabela 3 – Iniciadores utilizados na RT-PCR da região da proteína E das cepas de DENV-1

Nome do iniciador	Sequência 5'-3'	Número de NT's	Sentido	Posição referente a sequência NC_001477	Tamanho do fragmento
D1E_FNS	TGGGCYYTGVGACACCCAGG	20	S	812-831	1724 pb
D1E_FNAS	GGRGARTCRGCTGRAATTTTRATTG	26	AS	2510-2535	

Legenda: S – sentido senso; AS – sentido antisenso; NT's – nucleotídeos; pb – pares de bases.
Fonte: Naveca (2011)

Os iniciadores (tabelas 3 e 4) foram desenhados com base na sequência referência para o DENV-1 (NC_001477), disponível no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001477). A posição dos mesmos no genoma do DENV estão indicados na figura 19.

Figura 19– Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados na RT-PCR da região da proteína E das cepas do DENV-1



3.7.1 Confeção do cDNA

Inicialmente foram misturados 5µL do RNA extraído à 1 µL de iniciador antisense D1E_FNAS 10 µM. Foram utilizados um controle positivo e um controle negativo. Em seguida, as amostras foram aquecidas à 70°C por 5 min para desnaturação da molécula de RNA e rapidamente resfriadas em gelo por 5 min. Posteriormente, em cada tubo (amostra) foram adicionados 14 µL do MIX-RT contendo tampão 1X, 20 U de inibidor de RNase Recombinant RNasin[®] (Promega[®], Madison, USA), 2 mM de dNTPs (Amresco[®], USA), 1,5 mM de MgCl₂, 160 U de *GoScriptTM Reverse Transcriptase* (Promega[®], Madison, USA), e água livre de nucleases q.s.p. 20 µL. A mistura foi incubada a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 60 min e a 70 °C por 15 min.

3.7.2 Reação de PCR

A reação de PCR continha 2,5 µL do cDNA e 22,5 µL de tampão 1X (100 mM Tris-HCl [pH 8.6] 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 0,2 µM de dNTPs (Amresco[®], USA), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador D1E_FNS e D1E_FNAS, 1 U de *HotStart-ITTM Taq DNA Polymerase* (USB[®] Products, Affymetrix, Inc., USA), e água livre de nucleases q.s.p. 22,5 µL. As amostras foram submetidas, em termociclador (PxE Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, USA), a 1 ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 2 min, 40 ciclos para amplificação dos amplicons com desnaturação a 94 °C por 45 seg, hibridização dos iniciadores a 68 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 2 min, seguido de 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min.

Após a amplificação, 9 µL dos produtos amplificados foram homogeneizados com 1 µL de azul de bromofenol (Proquimios, Brasil) e separados por corrida eletroforética em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5 X corado com 1 µL de GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium) a 100 V por 35 min. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 1724 pb que foi observado através de fotodocumentador (MiniBis Pro, Bio-Imaging Systems, Uniscience) com luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos foi determinado pela comparação com o marcador *Quick-Load 1Kb DNA Ladder* (Biolabs[®], New England).

3.7.3 Purificação e quantificação do produto da PCR

O produto amplificado da PCR foi purificado pela precipitação com Polietilenoglicol (PEG) 20%, seguindo as instruções do protocolo utilizado na plataforma de genômica do Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane (CpLMD) - FIOCRUZ, Manaus - AM. Todo o volume do produto amplificado foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, sendo adicionado volume igual de PEG (20%). Essa mistura foi agitada em vórtex por 10 seg, incubada a 37 °C por 15 min, e logo depois procedeu-se uma centrifugação a 2500 rcf por 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 125 µL de etanol 80% gelado, e procedeu-se uma centrifugação a 1450 rcf por 2 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo foi incubado a 37 °C por 15 min para remoção dos resíduos de etanol. Finalmente, adicionou-se ao microtubo o mesmo volume inicial do produto amplificado da PCR de água livre de nucleases. Essa mistura foi agitada por 10 seg e armazenada a -20 °C até o momento do uso. Posteriormente, cada produto purificado foi quantificado em espectrofotômetro (ASP-3700, ATCGene, USA) em comprimentos de onda de 260 a 280 nm.

3.8 Sequenciamento da região da proteína E do genoma viral

O sequenciamento foi realizado no Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus – AM.

Para o sequenciamento da região que codifica a proteína E das cepas de DENV-1 estudadas, foram utilizados os iniciadores representados na tabela 4. O sequenciamento descrito abaixo corresponde ao método de interrupção da cadeia automatizado, como o qual foi idealizado por Sanger et al. (1977).

Os iniciadores foram desenhados com base na sequência referência para o DENV-1 (NC_001477), disponível no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001477). A posição dos mesmos no genoma do DENV estão indicados na figura 20.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados no sequenciamento da região da proteína E das cepas de DENV-1

Nome do iniciador	Sequência 5'-3'	Número de NT's.	Sentido	Posição referente a sequência NC_001477	Tamanho do fragmento
D1E_FNSb	HGGAGAYCAGCAYCARGTKGG	21	S	1369-1389	723 pb
D1E_FNASb	GYTTTTTCRCCYGCYCCTAYYVCGA	25	AS	2067-2091	
D1E_FNSc	TCGBRRTAGGRGCRGGYGAAAAARC	25	S	2067-2091	469 pb
D1E_FNAS	GGRGARTCRGCTGRAATTTTRATTG	26	AS	2510-2535	
D1E_FNS	TGGGCYYTGVGACACCCAGG	20	S	812-831	578 pb
D1E_FNASc	CCMACYTGRGTGCTGRTCYCC	20	AS	1370-1389	

Legenda: S – sentido senso; AS – sentido antisenso; NT's – nucleotídeos; pb – pares de bases
 Fonte: Naveca (2011)

Para cada uma das reações de sequenciamento, foram utilizados 1 µL da amostra, 0,3 µL de *BigDye® Terminator versão 3.1* (Applied Biosystems™, USA), 1µL de iniciador 3,3 µM (D1E_FNSb/ D1E_FNASb/ D1E_FNASc/ D1E_FNAS/ D1E_FNAS/ D1E_FNASc) por reação, 2 µL tampão 5X e água livre de nucleases para um volume final de 10 µL. Cada amostra foi submetida a seis reações de sequenciamento, cada uma com um iniciador diferente. A amplificação foi realizada em termociclador seguindo o programa indicado no quadro 2.

Figura 20– Representação esquemática da posição dos iniciadores utilizados no sequenciamento da região da proteína E das cepas de DENV-1



Quadro 2 – Programa de amplificação usado nas reações de sequenciamento

Ordem	Programação
1	96 °C por 60 segundos
2	96 °C por 10 segundos
3	50 °C por 15 segundos
4	60 °C por 75 segundos
5	Repetir etapas 2-4 por 15 vezes
6	96 °C por 10 segundos
7	50 °C por 15 segundos
8	60 °C por 90 segundos
9	Repetir etapas 6-8 por 5 vezes
10	96 °C por 10 segundos
11	50 °C por 15 segundos
12	60 °C por 120 segundos
13	Repetir etapas 10-12 por 5 vezes

Fonte: Protocolo Fast – Plataforma de Genômica – Fiocruz Amazônia (2010)

O produto final das reações foi purificado pela precipitação com EtOH, EDTA e acetato de sódio, seguindo as instruções do protocolo (anexo B) modificado do kit BigDye® (Applied Biosystems™, USA). Posteriormente, os produtos foram analisados em sequenciador automático modelo ABI 3130 (Applied Biosystems™, USA).

3.9 Análise e Alinhamento das sequências

O programa Geneious versão 5.5.4 (DRUMMOND et al., 2011) foi utilizado para a análise das sequências. Para cada amostra foram obtidas seis sequências parciais, que foram visualizadas, analisadas, editadas e combinadas para obter uma sequência consenso. O mesmo programa também foi utilizado para avaliar a qualidade das sequências obtidas, pela análise do cromatograma, retirando regiões da sequência com mais de 5% de possibilidade de erro. Essa possibilidade de erro leva em consideração o valor de QV (do inglês – Quality Value), que indica a qualidade das sequências obtidas, sendo que sequências de boa qualidade devem apresentar $QV > 20$.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas a uma pesquisa pela ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) para confirmação da identidade das mesmas, pela comparação com sequências homólogas do DENV-1. Após esta confirmação foi montado um banco de dados com sequências de DENV-1 disponíveis no GenBank. As sequências foram alinhadas e editadas manualmente, usando o programa CLUSTAL W, incluído no pacote Mega versão 5.0 (TAMURA et al., 2011).

As sequências obtidas e utilizadas neste estudo foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

3.10 Análises filogenéticas

Para comparação com as 13 sequências nucleotídicas obtidas nesse estudo, foram utilizadas 87 sequências (anexo D) de cepas representativas dos cinco genótipos do DENV-1, incluindo cepas representativas de outros Estados brasileiros, da América do Sul e do Caribe. Todas as cepas referência para as análises filogenéticas foram retiradas do banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

As reconstruções filogenéticas foram feitas por três métodos. Para o método de distâncias Neighbor-Joining (NJ) e para o método de Máxima Verossimilhança (ML) foram usados, respectivamente, o programa Mega versão 5.0 (TAMURA et al., 2011) e o programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010), sendo que, para estes dois métodos, a confiabilidade da árvore obtida foi estimada pelo método de *Bootstrap* com 1.000 replicatas. O método de Inferência Bayesiana (IB) foi executado através do programa Mr Bayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003; RONQUIST; MARK; HUELSENBECK, 2009; RONQUIST et al., 2012) e a confiabilidade analisada pelo modelo da Cadeia Markov de Monte Carlo (MCMC), utilizando o parâmetro de máxima Probabilidade Posterior (PP) acima de 90%. A análise foi feita para 7.000.000 de réplicas (gerações), sendo que, a amostragem foi fixada a cada 7.000 árvores geradas e *burnin* de 700 (representando 10% da amostra). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Tracer v. 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2003; 2009), que é utilizado para verificar se as análises feitas pelo MrBayes alcançaram a convergência apropriada (valor menor que 0,01), o que pode

ser feito a partir da análise do gráfico gerado e pela medida de convergência da corrida, a qual é estimada a partir dos valores do tamanho da amostra efetiva (ESS - Effective Sampling Size; valor > 200). As árvores obtidas pelos métodos de ML e IB foram visualizadas usando o Programa FigTree v. 1.3.1 (RAMBAUT, 2009).

Para determinar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as sequências, foi utilizado o programa jModeltest 2.1.1 (DARRIBA et al., 2012), baseado no critério de informação Akaike (AIC).

Para permitir o enraizamento das árvores foram usadas cepas referência de DENV-1 (NC_001477), DENV-2 (NC_001474), DENV-3 (NC_001475) e DENV-4 (NC_002640), para a reconstrução filogenética pelo método de NJ. Para a reconstrução filogenética pelos métodos de ML e IB foi utilizado como grupo externo o genótipo III (silvestre) de DENV-1, representado por duas sequências isoladas na Malásia, uma no ano de 1972 (AF425622) e outra no ano de 1995 (FN825674). Todas as sequências citadas estão disponíveis no banco de dados do Genbank.

A fim de observar a distância genética entre os membros dentro de um mesmo genótipo e entre genótipos diferentes, foi estimada a distância intra-grupo e inter-grupo. Esta análise foi realizada pelo método de NJ, utilizando o programa Mega versão 5.0 (TAMURA et al., 2011). Para determinar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para as sequências, foi utilizado o programa jModeltest 2.1.1 (DARRIBA et al., 2012), baseado no critério de informação Akaike (AIC). Todos os valores foram convertidos em porcentagem.

3.11 Inferência sobre as possíveis rotas de introdução e dispersão do vírus no estado

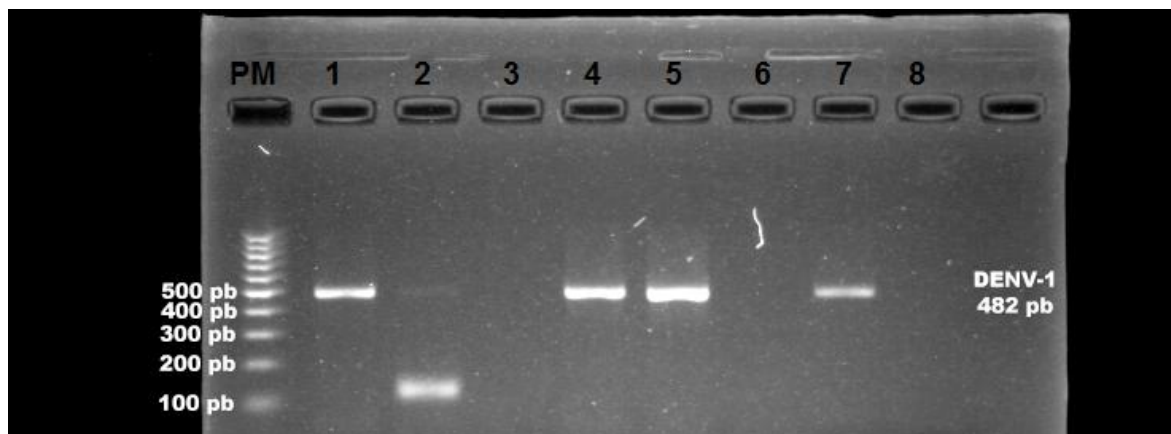
As sequências obtidas no estudo foram comparadas com as sequências referência de regiões de fronteira Internacional como Venezuela e Guiana Inglesa, e com as de regiões de fronteira Nacional, como Amazonas e Pará, pela reconstrução filogenética de ML e IB. A partir da reconstrução filogenética destas sequências pôde-se inferir uma possível rota de introdução e dispersão do DENV-1 no estado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das amostras positivas de DENV-1

De um total de 150 amostras testadas, 31 apresentaram resultado positivo para o sorotipo DENV-1 pela técnica de RT-Hemi-Nested-PCR, distribuídas da seguinte forma: 2008 (n=1), 2009 (n=12), 2010 (n=14), 2011 (n=3), 2012 (n=1). Cada uma das amostras positivas, apresentou um fragmento de 482 pb referente à região de junção entre as proteínas C/prM (figura 21).

Figura 21 — Observação dos produtos amplificados a partir da RT-Hemi-Nested-PCR de amostras de DENV-1 através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%



Legenda: (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb; (1;4;5) Amostras positivas de DENV-1 – fragmento de 482 pb; (2) Amostra positiva de DENV-2 – fragmento de 119 pb; (3) amostra negativa; (7) Controle positivo; (6;8) Controle negativo.

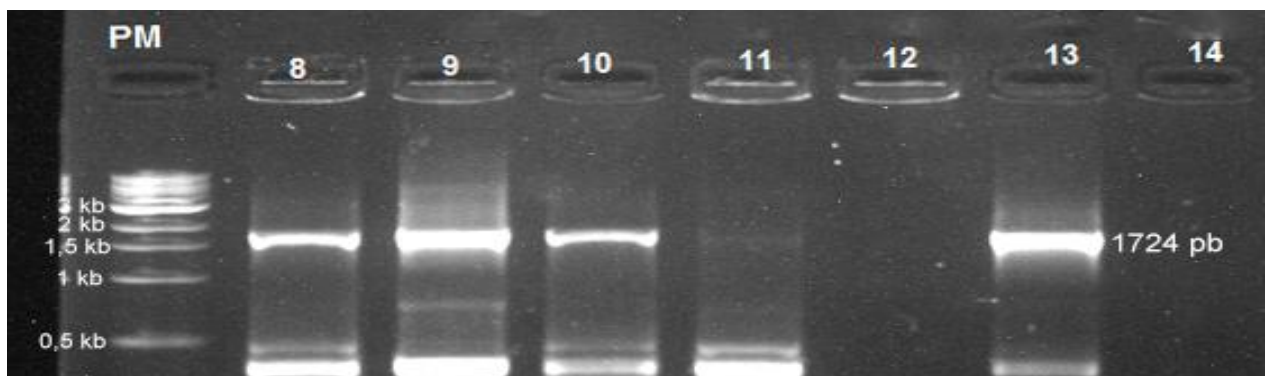
Com exceção das amostras referentes ao ano de 2012, todas as outras amostras apresentavam informação de sorotipagem prévia para DENV-1 no sistema de registros do LabMol, informação fornecida pelo LACEN no momento da entrega das alíquotas das amostras. A partir destas informações, foram realizados os testes com as mesmas e verificou-se que algumas apresentaram as seguintes particularidades: baixa concentração viral, fato que não permitia a amplificação do fragmento esperado na RT-Hemi-Nested-PCR, sendo necessária a realização da 2ª passagem de fluido celular; outras amostras testadas apresentavam no resultado final um sorotipo diferente daquele informado pelo LACEN; ou eram negativas, reduzindo o número de amostras a serem selecionadas, ou ainda, o próprio

manuseio das amostras, como por exemplo, a retirada das mesmas do freezer (ciclos de congelamento e descongelamento) pode ter provocado a degradação do RNA o que refletiu no resultado final dos testes.

4.2 Obtenção das sequências de nucleotídeos da região que codifica para a proteína E

Das 31 amostras positivas para o DENV-1, 13 foram positivas na RT-PCR para a região do gene E, onde se amplificou um fragmento de 1724 pb. As amostras que não apresentaram amplificação do fragmento esperado, como por exemplo, bandas fracas ou negativas, foram submetidas a uma segunda PCR. Após a segunda amplificação, 18 amostras não amplificaram o fragmento esperado, assim, foram descartadas do experimento. Após a eletroforese, as amostras positivas apresentaram um fragmento de 1724 pb (figura 22).

Figura 22 – Observação de alguns produtos amplificados a partir da RT-PCR da região que codifica para a proteína E das amostras de DENV-1 através da eletroforese em gel de agarose a 1%



Legenda: (PM) marcador de peso molecular de 1Kb; (8;9;10) amostra positiva; (11) amostra positiva com banda fraca; (12) controle negativo – RT; (13) controle positivo – PCR; (14) controle negativo – PCR.

Como pode ser observado na figura 22, as amostras testadas apresentaram a banda esperada, porém também amplificaram bandas inespecíficas acima de 400 pb, resultado que foi observado em todas as amostras analisadas. Alguns testes de concentração de reagentes foram feitos, principalmente em relação às concentrações de cloreto de magnésio, no entanto, as bandas permaneceram.

Após os resultados da RT-PCR do envelope, as amostras foram sequenciadas, gerando seis seqüências parciais para cada amostra. Para a determinação da seqüência de bases nitrogenadas em cada seqüência parcial, utilizou-se o cromatograma gerado a partir do sequenciamento de cada amostra.

As amostras apresentaram uma boa qualidade dos picos (figura 23), porém as regiões de início e fim de cada seqüência precisaram ser eliminadas, devido à baixa qualidade dos picos e alta quantidade de ruídos (figura 24).

Por fim, as seis seqüências foram editadas e, a partir delas, montada a seqüência consenso. As seqüências resultantes de cada amostra foram analisadas pela ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que indicou similaridade das mesmas com outras seqüências de DENV-1 depositadas.

Figura 23 – Cromatograma gerado a partir do sequenciamento da amostra BR/RR/09_64 de DENV-1

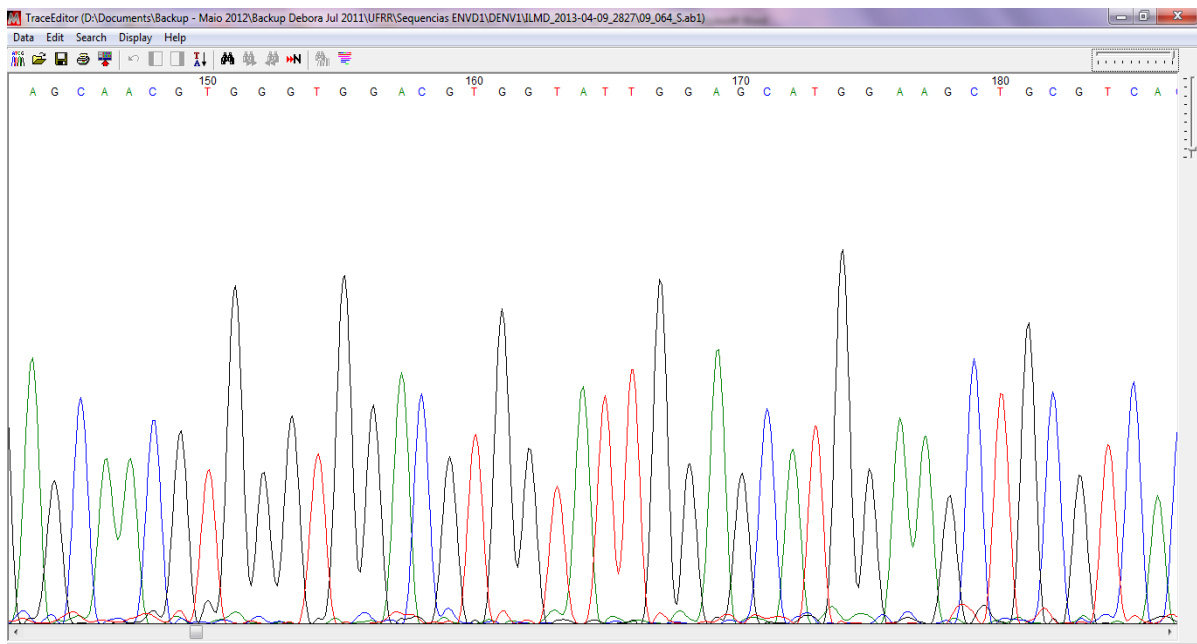
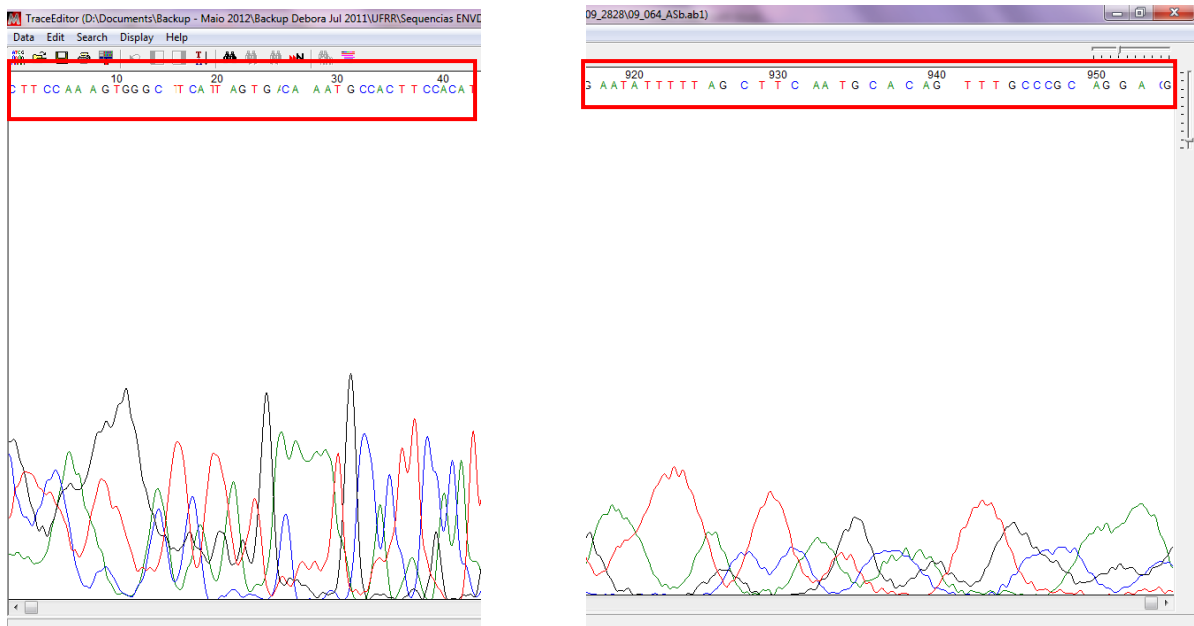


Figura 24 – Regiões de início e fim da sequência BR/RR/09_64 que foram eliminadas a partir da análise do cromatograma



Das 13 sequências obtidas, uma foi referente ao ano 2008, oito foram referentes ao ano de 2009 e quatro foram referentes ao ano de 2010. Por não ter se obtido êxito na amplificação da região do gene E das amostras analisadas referentes aos anos de 2011 e 2012, as mesmas não foram incluídas neste trabalho, e serão objeto de futuras investigações.

As sequências obtidas foram cortadas, visando à obtenção de um fragmento de tamanho específico para a região do gene E, que é de 1485 nucleotídeos de comprimento, referentes à posição no genoma 934 a 2419 em relação à cepa de referência de DENV-1 (NC_001477). Esta sequência genômica codifica 495 aminoácidos da proteína do envelope. As sequências geradas foram depositadas no GenBank e podem ser localizadas a partir dos seus números de acesso: KF444780 (BRA/RR/09_02); KF444781 (BRA/RR/09_64); KF444782 (BRA/RR/09_75); KF444783 (BRA/RR/09_76); KF444784 (BRA/RR/09_86), KF444785 (BRA/RR/09_109); KF444786 (BRA/RR/10_33); KF444787 (BRA/RR/10_38); KF444788 (BRA/RR/10_108); KF444789 (BRA/RR/08_02); KF444790 (BRA/RR/09_07); KF444791 (BRA/RR/09_183); KF444792 (BRA/RR/10_96).

2006	JN819405	99%	99%	99%	99%	99%	99%	
Amazonas								
2007	HM450103	99%	99%	99%	99%	99%	99%	
Colômbia								
2005	GQ868562	99%	99%	99%	99%	99%	99%	
Venezuela								
2007	FJ850100	99%	99%	99%	99%	99%	99%	
Brasil (AL)								
2010	JQ015184	98%	98%	98%	98%	98%	98%	

É notória a alta similaridade encontrada entre todas as amostras de DENV-1 obtidas no estado de Roraima referentes aos anos de 2008 a 2010, e aquelas relacionadas a Estados de fronteira nacional, como Amazonas, e de países de fronteira internacional como Venezuela e Guiana Inglesa, relação esta que é mantida ao longo dos diferentes anos. Entretanto, a similaridade não foi tão próxima com o isolado brasileiro, coletado no estado do Alagoas em 2010 (JQ015184). Acosta et al. (2012) reforçam estas observações quando indicam a relação filogenética dos sorotipos circulantes no estado, principalmente DENV-1, DENV-3 e DENV-4, com isolados provenientes da Venezuela e da Colômbia.

Outro fator que poderia manter esta proximidade genética entre os isolados seria a frequente interação da população de Roraima com estes países ou Estados endêmicos, permitindo assim o fluxo gênico das populações virais nestas regiões. Allicock et al. (2010) afirmam que eventos de migração ocorrem principalmente entre países vizinhos, tendo significativamente mais ligações que outros que não o são, e assim, desempenham papel de pólos de disseminação do vírus. Fato que é observado entre o extremo Norte do Brasil (Roraima) e Venezuela ou Guiana Inglesa.

Para análise e comparação das sequências de nucleotídeos e aminoácidos das amostras deste estudo entre elas e entre anos diferentes, elegeu-se como referência um isolado do ano de 2001 (HM450089), que foi analisado nos estudos feitos por Carneiro et al. (2012). Esta cepa foi escolhida por ter sido proveniente do período de reintrodução do DENV-1 no estado de Roraima, no ano 2000.

estudos anteriores (CARNEIRO, 2009; CARNEIRO et al., 2012; DRUMOND et al., 2012; GONÇALVEZ et al., 2002).

Figura 26 – Regiões conservadas referentes à sequência do peptídeo de fusão (resíduos 98 a 113) observadas nas amostras utilizadas neste estudo

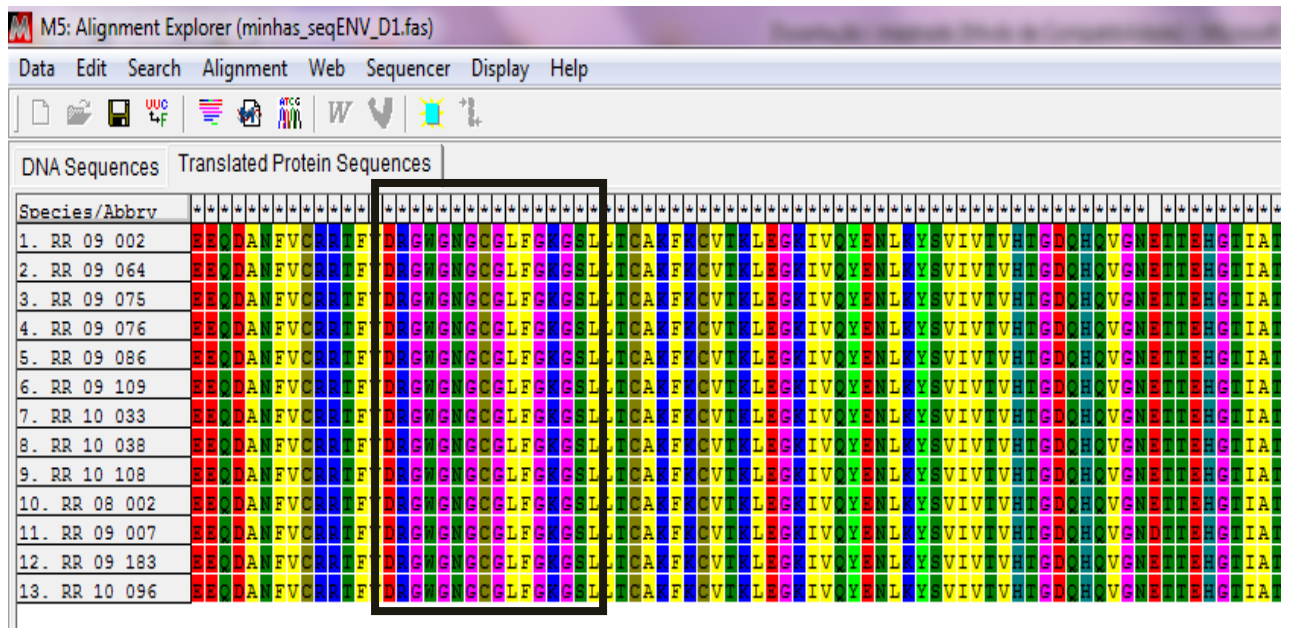
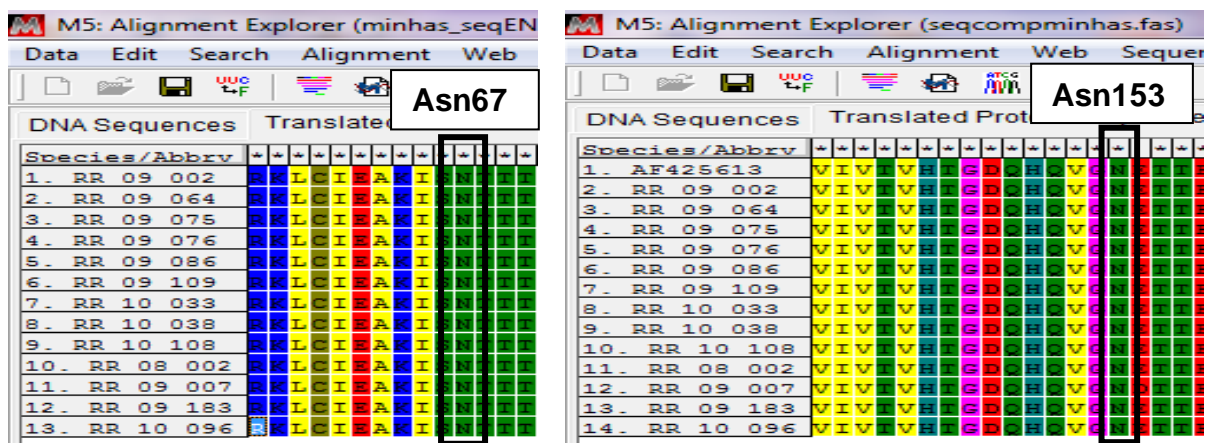


Figura 27 – Regiões conservadas referentes às regiões de glicosilação Asn67 e Asn153 observadas nas amostras utilizadas neste estudo



Na comparação das 13 amostras analisadas com a cepa referência, foram identificadas nove alterações (figura 28) entre elas, quatro principais (tabela 5 e figura 29), e dessas, duas resultaram em aminoácidos bioquimicamente diferentes.

Figura 28 – Sítios de aminoácidos variáveis entre as sequências utilizadas neste estudo e a amostra referência RR/2001

RR/2001	A	R	R	M	A	I	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S	I	G	G	L	F	T	S	V	G	K	L	I	H	Q	V	F	G	T	A	Y	G	V	L	F	S	G	V	S	W	T	M														
<input type="checkbox"/> 8. FJ850075 BRA 02 V																																																													
<input type="checkbox"/> 9. FJ850077 BRA 03 V																																																													
<input type="checkbox"/> 10. FJ850084 BRA 05 V																																																													
<input type="checkbox"/> 11. FJ850093 BRA 08 V																																																													
<input type="checkbox"/> 12. HM043710 BRA 09																																																													
<input type="checkbox"/> 13. HM450077 BRA 07																																																													
<input type="checkbox"/> 14. HM450080 BRA 96																																																													
<input type="checkbox"/> 15. HM450081 BRA 97																																																													
<input type="checkbox"/> 16. HM450087 BRA 00																																																													
<input type="checkbox"/> 17. HM450090 BRA 02																																																													
<input type="checkbox"/> 18. HM450097 BRA 04																																																													
<input type="checkbox"/> 19. HM450101 BRA 07																																																													
<input type="checkbox"/> 20. HM450102 BRA 07																																																													
<input type="checkbox"/> 21. HM450103 BRA 07																																																													
<input type="checkbox"/> 22. HM450104 BRA 08																																																													
<input type="checkbox"/> 23. HQ026761 BRA 09																																																													
<input type="checkbox"/> 24. JN122280 BRA 86																																																													
<input type="checkbox"/> 25. JN122281 BRA 11																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 26. BR RR 08 02																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 27. BR RR 09 02																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 28. BR RR 09 07																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 29. BR RR 09 64																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 30. BR RR 09 75																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 31. BR RR 09 76																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 32. BR RR 09 86																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 33. BR RR 09 109																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 34. BR RR 09 183																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 35. BR RR 10 33																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 36. BR RR 10 38																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 37. BR RR 10 96																																																													
<input checked="" type="checkbox"/> 38. BR RR 10 108																																																													

Site# 1/495 Variable: 9/495 Data

Sítios

É interessante salientar que as quatro alterações (figura 29) descritas a seguir, ocorreram em todas as amostras analisadas. No Domínio II ocorreu uma alteração na posição E227 (Pro → Ser), levando a uma alteração na característica bioquímica do aminoácido, uma vez que a prolina é um aminoácido com cadeia lateral cíclica, típico de regiões de curvatura nas proteínas e serina um aminoácido hidroxilado, não podemos deixar de descartar a possibilidade de que essa prolina seja hidroxilada na pós-tradução e então, também apresente grupo hidroxila. No Domínio III, todas as amostras apresentaram mudança na posição E338 (Leu → Ser), resultando na alteração de característica bioquímica do aminoácido, mudando de um aminoácido apolar para um polar. Na região transmembrana, as alterações ocorreram nas posições E428 (Leu → Val) e E436 (Ile → Val).

Tabela 5 – Diferenças de aminoácidos codificados pelo gene E presente na cepa RR/2001 e nos DENV-1 isolados em Roraima, nos anos de 2008 a 2010

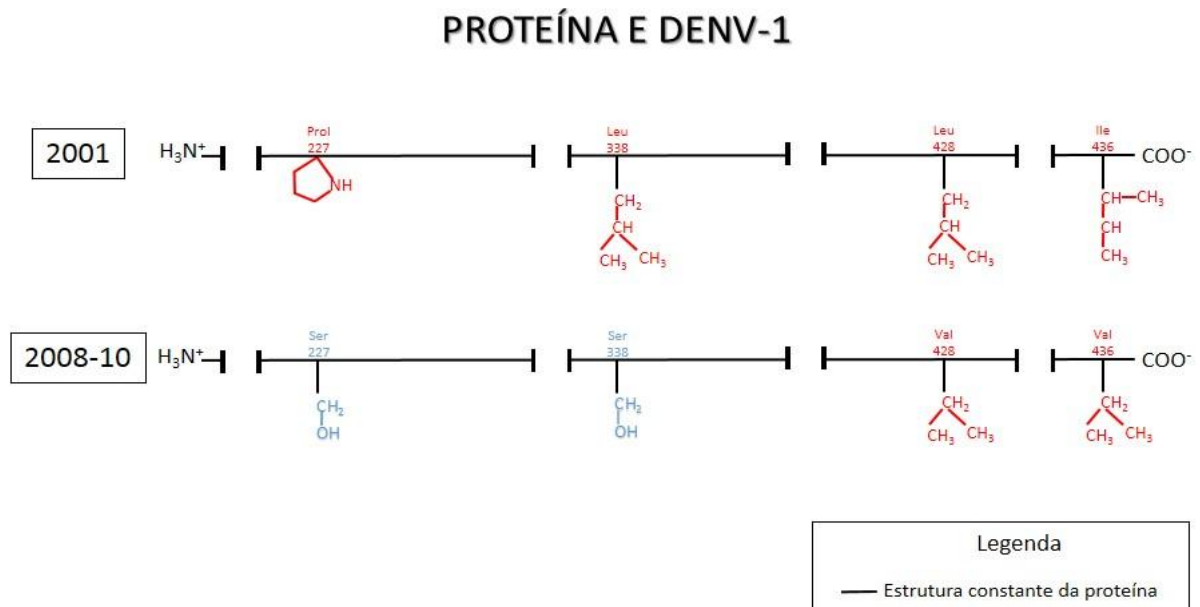
Gene	Posição ^a	RR ^b	RR	RR	RR	RR	RR	RR	
		2001	08_02	09_02	09_07	09_64	09_75	09_76	
	E154DI ^c	E	*	*	D	*	*	*	
	E227DII	P	S	S	S	S	S	S	
	E305DIII ^d	S	*	*	*	*	*	L	
E	E338DIII	L	S	S	S	S	S	S	
	E428TM ^e	L	V	V	V	V	V	V	
	E436TM	I	V	V	V	V	V	V	
	E478TM	T	*	M	*	*	*	*	
	E481TM	A	*	*	*	*	*	*	
	E494TM	Q	*	*	*	*	R	*	
Gene	Posição ^a	RR ^b	RR	RR	RR	RR	RR	RR	
		2001	09_86	09_109	09_183	10_33	10_38	10_96	10_108
	E154DI ^c	E	*	*	*	*	*	*	*
	E227DII	P	S	S	S	S	S	S	S
	E305DIII ^d	S	*	*	*	*	*	*	*
E	E338DIII	L	S	S	S	S	S	S	S
	E428TM ^e	L	V	V	V	V	V	V	V
	E436TM	I	V	V	V	V	V	V	V
	E478TM	T	*	*	*	*	*	*	*
	E481TM	A	V	*	*	*	*	*	V
	E494TM	Q	*	*	*	*	*	*	*

Legenda: ^a – Posição do aminoácido; ^b – cepa de DENV-1 (gene E) isolada em 2001 RR/BR utilizada para comparação (HM450089), Ref. (CARNEIRO et al., 2012); ^c – posição no Domínio I da proteína E; ^d – posição no Domínio III da proteína E; ^e – posição na região *trans*-membrana da proteína E; Aminoácidos em vermelho – mudanças que levaram a alteração na característica bioquímica do aminoácido; Simbologia dos aminoácidos: A – Alanina; D – Ácido Aspártico; E – Ácido glutâmico; I – Isoleucina; L – Leucina; M – Metionina; P – Prolina; Q – Glutamina; R – Arginina; S – Serina; T – Treonina; V – Valina.

Os dados indicam que os isolados de Roraima (2008-2010) apresentam aminoácidos altamente conservados, com apenas duas substituições, ocorrendo mudança de aminoácido polar para apolar, em um total de 495 posições, sugerindo possível seleção negativa. Estes dados são reforçados por resultados de um estudo feito por Gonçalves et al. (2002) que estimou o número de substituições sinônimas por sítio para diferentes regiões do gene E, em 23 cepas representativas dos cinco genótipos, e mostrou que os valores das taxas de mutação sinônima superou entre 13 e 37 vezes os valores das taxas de substituição não sinônima, indicando uma forte seleção negativa no gene E dos DENV-1. Entretanto, vários estudos filogenéticos que analisaram as proteínas estruturais do DENV mostraram que a maioria das mutações/substituições não-sinônimas ocorre no gene E (ANOOP et al.,

2012; CÁCERES et al., 2008; CARNEIRO et al., 2012; DESCLOUX et al., 2009; DRUMOND et al., 2012; TANG et al., 2010).

Figura 29 – Representação esquemática das quatro principais diferenças de aminoácidos codificados pelo gene E presente na cepa RR/2001 e nos DENV-1 isolados em Roraima



Legenda: Vermelho – aminoácido apolar; Azul – aminoácido polar

É importante destacar que três das quatro alterações que foram observadas em todas as amostras do estudo, referentes às posições E338, E428 e E436, já foram descritas em estudos anteriores. Dos Santos et al. (2002), estudando isolados brasileiros entre os anos de 1990 e 2001, Barrero e Mistchenko (2004) analisando isolados da Argentina de 1999-2000 e Carneiro et al. (2012) realizando estudos com cepas brasileiras obtidas de diferentes estados, entre os anos de 1994-2008, encontraram uma mudança na posição E338 (Ser → Leu). Uma mudança na posição E428 (Val → Leu) foi encontrada por Carneiro et al. (2012). A mudança na posição E436 (Val → Ile) foi identificada por Anoop et al. (2012) em seus estudos com cepas isoladas em 2009, no Sul da Índia (Kerala), e por Carneiro et al. (2012).

Uma destas alterações (E338), como já foi dito anteriormente, ocorreu no Domínio III da proteína E representando supostamente uma alteração importante para as cepas analisadas neste estudo, em relação aos seus padrões de

disseminação. Em seus estudos Wang et al. (2000) sugerem que as mudanças nos aminoácidos da proteína E tem acompanhado a emergência endêmica/epidêmica, e que o Domínio III tem papel importante na adaptação do vírus a novos hospedeiros mosquitos e/ou humanos.

Ao considerarmos que estas alterações estão presentes em todas as amostras analisadas e que estão permanecendo fixas na população viral ao longo de três anos distintos, pode-se sugerir que as mesmas possam ter alguma influência na manutenção destes vírus no ambiente, como por exemplo, uma maior eficiência das cepas quanto à replicação no hospedeiro. Isto pode ter tido influência, uma vez que as cepas isoladas neste estudo são representantes dos anos em que, de todos os sorotipos, o DENV-1 foi o mais isolado no estado, período compreendido entre os anos de 2008 a 2011 (ACOSTA et al., 2012; DVE 2013).

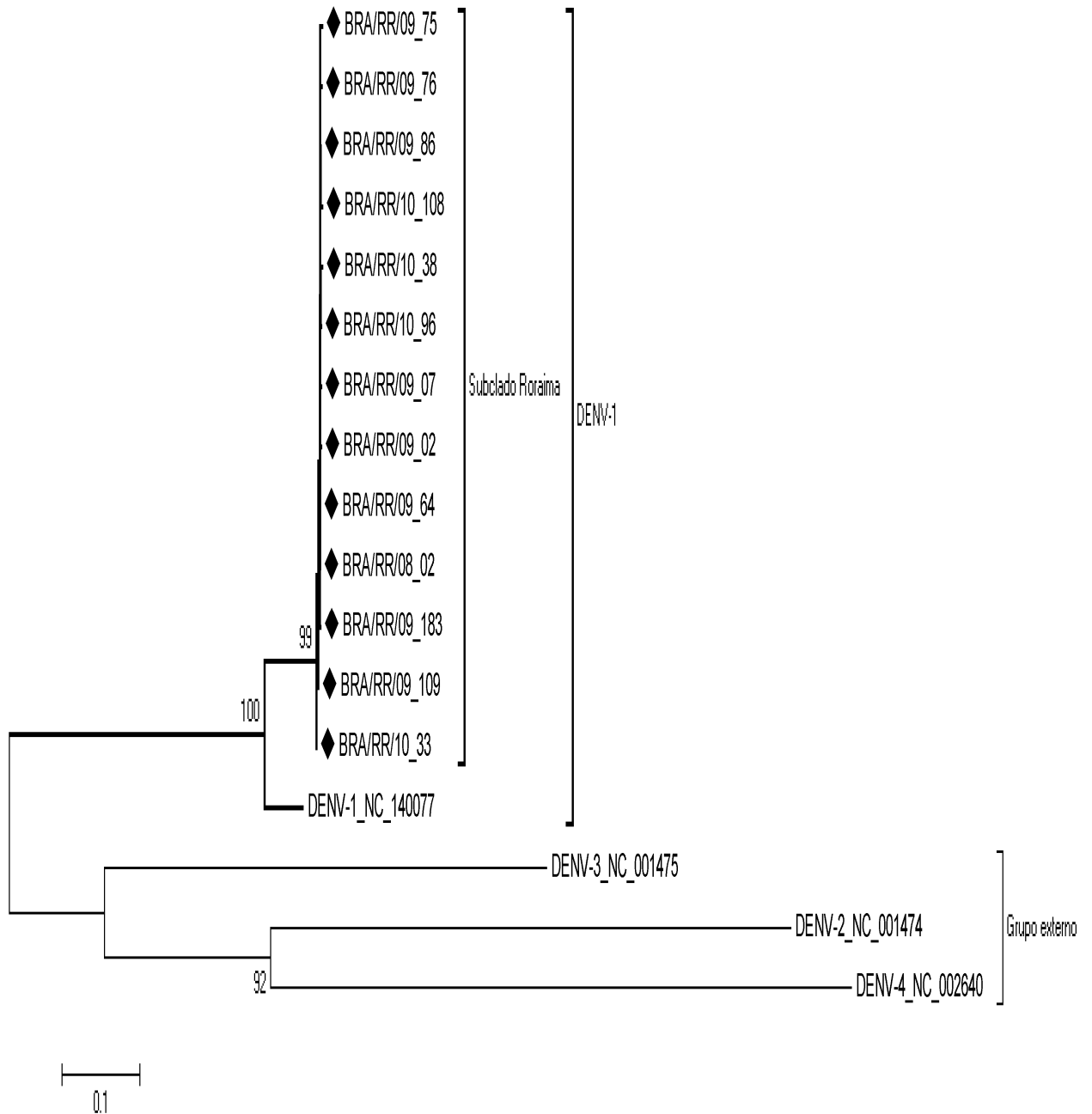
A análise filogenética das 13 cepas, juntamente com as quatro sequências referência para os sorotipos de DENV-1 a DENV-4, disponíveis no GenBank, confirmaram (figura 30) o sorotipos DENV-1 destas amostras, pois agruparam com a sequência referência de DENV-1 sob um suporte de *Bootstrap* de 100%.

A árvore filogenética foi construída pelo método de NJ. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos selecionado foi o modelo TrN+G (modelo Tamura-Nei com taxa de distribuição *gamma* de variação entre os sítios) com valor *gamma* de 0,3560. A confiabilidade dos ramos foi apoiada estatisticamente pelo método de *Bootstrap* com 1000 réplicas. A árvore obtida é mostrada na figura 30.

Como pode ser observado, as cepas estudadas se agruparam em um único subclado, podendo indicar que as mesmas estão fortemente relacionadas geneticamente, fato que foi mostrado anteriormente nos resultados de similaridade entre as mesmas. Isto também pode ser observado quando se leva em consideração que o tamanho das linhas/barras horizontais em uma árvore filogenética é proporcional a distância genética das sequências analisadas.

Por outro lado, foi observada uma maior afinidade evolutiva entre os sorotipos DENV-1 e DENV-3, estando de acordo com estudos anteriores, que têm mostrado estes sorotipos como sendo os mais estreitamente relacionados (COSTA; VOLOCH; SCHAGO; 2012; HOLMES; TWIDDY, 2003; TWIDDY; HOLMES; RAMBAUT; 2003).

Figura 30 – Análise filogenética realizada pelo método de Neighbor – Joining (NJ) utilizando as 13 cepas analisadas juntamente com todos os sorotipos do DENV



Legenda: Árvore filogenética reconstruída pelo método de Neighbor – Joining (NJ) utilizando um fragmento de 1485 nt. O modelo de evolução molecular usado foi o TrN+G com correção *gamma* de 0,3560 e a filogenia foi feita utilizando o programa Mega versão 5.0. A confiabilidade da árvore foi apoiada por *Bootstrap* com 1000 réplicas. Valores de *Bootstrap* >75% são mostrados nos nós. O comprimento dos ramos indica a distância entre as sequências. Cepas referência dos sorotipos 2, 3 e 4 foram usadas como grupo externo. As sequências utilizadas no estudo estão indicadas pelo símbolo ◆.

O efeito do tamanho da população do DENV também tem sido alvo dos estudos filogenéticos. Aliado aos dados epidemiológicos que indicam um dramático aumento do tamanho da população do DENV circulando em muitas áreas dos trópicos, subtropicais e, recentemente, em áreas temperadas, análises filogenéticas têm documentado o aumento da diversidade genética consistente com a expansão da população viral. E, uma vez que, as cepas do DENV podem diferir na virulência, isso prediz um aumento nas taxas de propriedades patogênicas (HOLMES; BURCH, 2000; LA RUCHE et al., 2010; WEAVER; VASILAKS, 2009).

Costa, Voloch e Schrago (2012) realizando estudos sobre a dinâmica populacional dos quatro sorotipos do DENV em nível mundial, mostraram que, nos últimos 50 anos, o DENV-1 apresentou três períodos de efetivo aumento do tamanho da população: no começo dos anos 70, nos anos 80 e nos anos 2000, fato que pode estar provavelmente associado a uma maior movimentação da população humana, assim como o crescimento descontrolado da população de mosquitos. Resultados que podem ser comprovados pelos órgãos de saúde pública mundial. Entre os quatro sorotipos do DENV, o DENV-1 é o sorotipo predominante que circula em todos os principais países onde a doença é prevalente (GUZMAN et al., 2010).

As 13 sequências da região do gene E foram comparadas com 87 sequências representativas dos cinco genótipos do DENV-1, além de cepas representativas das Américas do Sul e do Caribe, disponíveis no GenBank.

Posteriormente, as sequências foram alinhadas por Clustal W e editadas manualmente. As análises filogenéticas foram feitas pelos métodos de ML e de IB. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para o conjunto de dados foi selecionado com o programa jModelTest, baseado no menor valor de informação Akaike (AIC). O modelo escolhido foi o GTR + I + G (onde GTR é General time reversible model; I – sítios invariáveis; G – distribuição Gamma) com valor *gamma* de 2,61 e *p* – inv: 0,5480.

A árvore filogenética de ML (figura 31) foi construída pelo programa PhyML 3.0. A confiabilidade dos grupamentos filogenéticos foi calculada usando análise de *Bootstrap* com 1000 réplicas. A árvore filogenética gerada pelo método Bayesiano (figura 32) foi construída pelo programa MrBayes 3.1.2 e analisada pelo modelo de confiabilidade da Cadeia Markov de Monte Carlo (MCMC), utilizando o parâmetro de máxima Probabilidade Posterior (PP) acima de 90%. O genótipo III (silvestre) do

sorotipo DENV-1 foi usado como grupo externo, permitindo o enraizamento das árvores.

As árvores filogenéticas construídas pelos métodos de ML (figura 31) e IB (figura 32) apresentaram resultados similares (mesma topologia), porém a árvore construída pelo método Bayesiano apresentou uma topologia mais robusta de distâncias e agrupamentos entre as cepas analisadas. Em ambos os métodos, foi observado o agrupamento de cinco genótipos distintos, com valores de 100% de confiabilidade para cada nó. Os resultados concordam com estudos genéticos de diferentes cepas de DENV-1 circulantes no mundo, que dividem o sorotipo dentro de cinco genótipos (GONÇALVES et al., 2002; LAILLE; ROCHE, 2004; RICO-HESSE, 1990). As 13 amostras analisadas neste estudo se agruparam dentro do genótipo V.

Villabona-Arenas e Zanotto (2013) realizaram um estudo sobre a disseminação mundial do DENV-1, e indicaram que a maioria dos clados pertencentes ao genótipo V corresponde aos países da América Central, América do Sul e Caribe, e que a ampla distribuição destes isolados nesta região sugere uma evolução *in situ* entre as populações susceptíveis.

Allcock et al. (2012) reconstruíram a disseminação espaço temporal dos vírus Dengue nas Américas, utilizando 109 cepas representativas do genótipo V, e estimaram que, no caso do DENV-1, a localização geográfica da infecção ancestral foi em Grenada, porém a Jamaica foi o país de primeiro registro. Dados de Schneider e Droll (2001) confirmados por Allcock et al. (2012) indicam que depois da introdução do genótipo V, em 1977, na Jamaica, o vírus rapidamente se espalhou para a América do Sul, América Central e Antilhas. Surtos epidêmicos de DENV-1 foram documentados em 1977, em Porto Rico, México e Estados Unidos (PAHO, 1981). Em 1978 surtos de DENV-1 ocorreram, talvez ao mesmo tempo, na Colômbia, Venezuela, Suriname e Guiana Francesa (MENDEZ et al., 2010). No Brasil, o DENV-1 foi detectado pela primeira vez no ano de 1981, em Roraima, juntamente com o DENV-4 e foi reintroduzido no ano de 1986, a partir de um surto ocorrido no Rio de Janeiro (SCHATZMAYR et al., 1986).

Figura 31– Análise filogenética da região do gene E dos DENV-1 isolados em Roraima entre os anos de 2008 a 2010 pelo método de Máxima Verossimilhança

Legenda: Árvore filogenética reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) utilizando um fragmento de 1485 nt. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi o GTR+I+G com valor *gamma* de 2,61 e p-inv de 0,54. A análise filogenética foi construída pelo programa PhyML 3.0. A confiabilidade da árvore foi apoiada por *Bootstrap* com 1000 réplicas. O genótipo V, o subclado “Caribe” e as linhagens estão representados pelas chaves. O genótipo III do DENV-1 foi usado como grupo externo. As amostras do estudo estão indicadas pelo símbolo *; a cepa RR/2001 está indicada pela seta →.

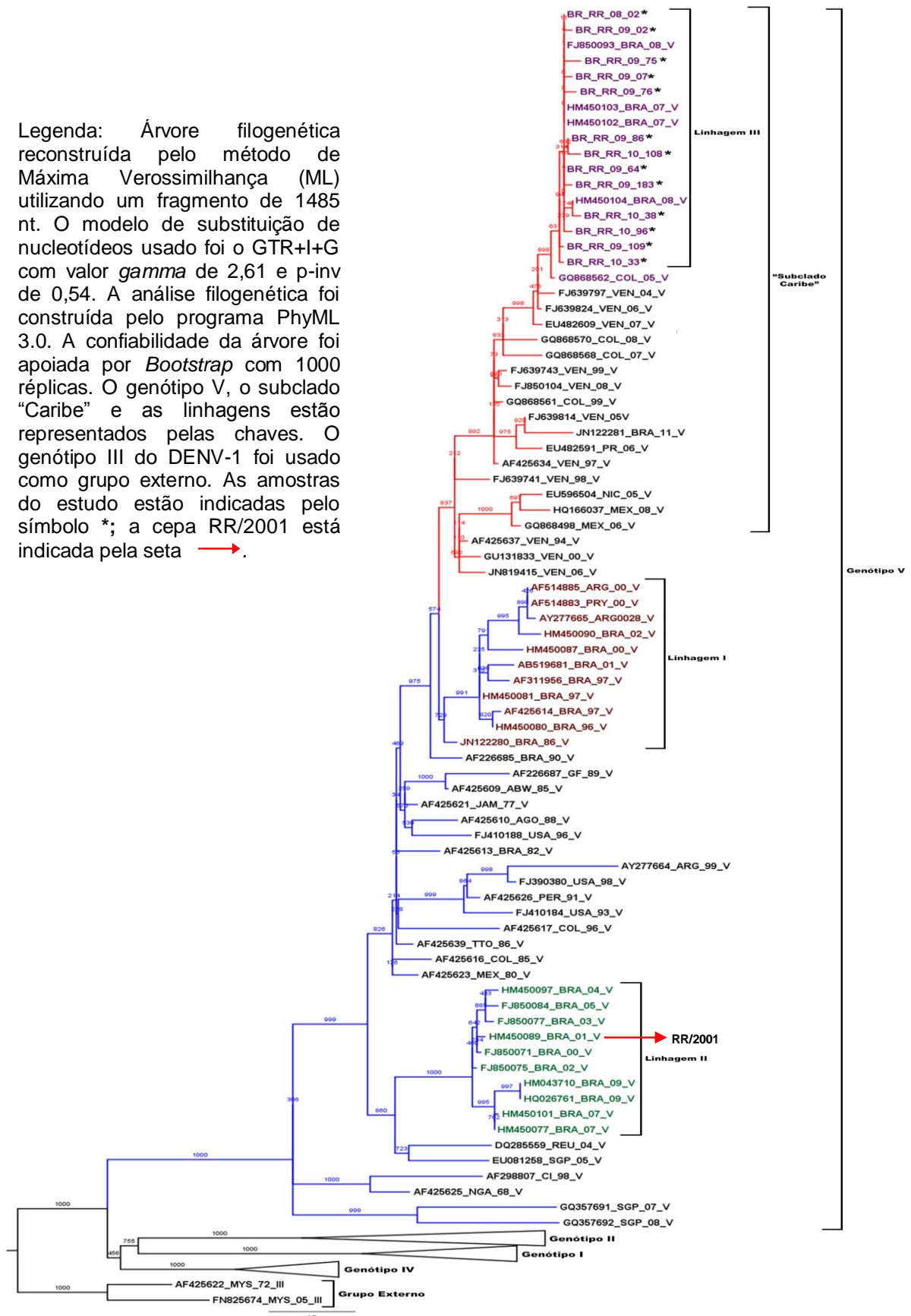
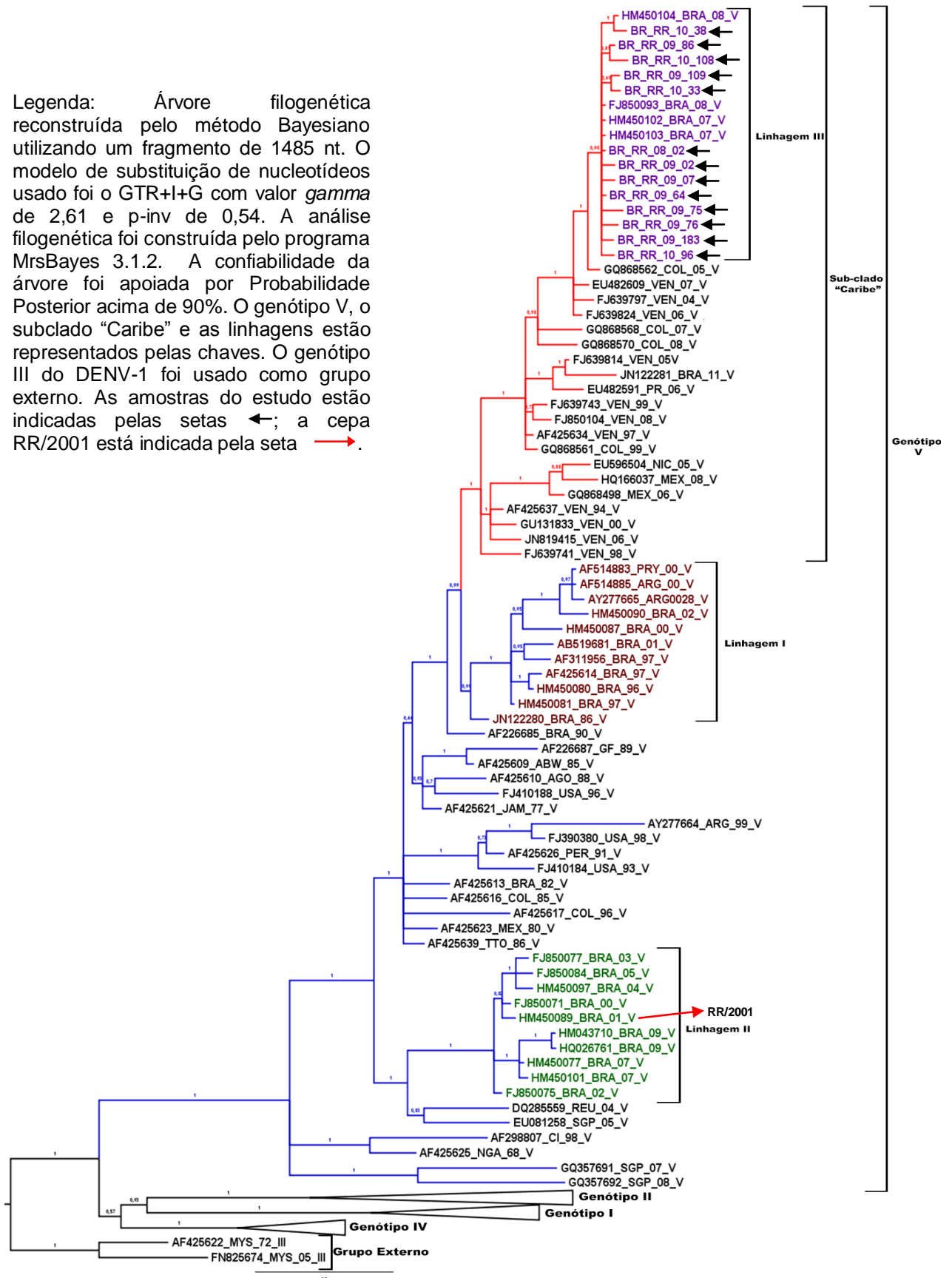


Figura 32 – Análise filogenética da região do gene E dos DENV-1 isolados em Roraima entre os anos de 2008 a 2010 pelo método Bayesiano

Legenda: Árvore filogenética reconstruída pelo método Bayesiano utilizando um fragmento de 1485 nt. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi o GTR+I+G com valor *gamma* de 2,61 e p-inv de 0,54. A análise filogenética foi construída pelo programa MrsBayes 3.1.2. A confiabilidade da árvore foi apoiada por Probabilidade Posterior acima de 90%. O genótipo V, o subclado “Caribe” e as linhagens III e I do DENV-1 foram usados como grupo externo. As amostras do estudo estão indicadas pelas setas ←; a cepa RR/2001 está indicada pela seta →.



Os DENV-1 a DENV-4 são antigenicamente distintos, principalmente devido às diferenças de 25-40% encontradas nas sequências de aminoácidos, presentes na proteína E dos diferentes sorotipos virais. Adicionalmente, estudos indicam alterações na proteína E de genótipos que compõem o mesmo sorotipo de DENV, tanto na sequência nucleotídica, quanto na sequência de aminoácidos, com aproximadamente 6% e 3%, respectivamente (AZEVEDO, 2011; SHRESTHA et al., 2010).

A evolução dos vírus Dengue tem sido um dos principais impactos quando se considera a sua virulência em humanos e a epidemiologia da doença ao redor do mundo (RICO-HESSE, 2003). A diversidade dos quatro sorotipos permanece ampla devido à: 1) ausência de capacidade de autocorreção da RNA polimerase RNA dependente, que pode dar origem a cepas que provoquem aumento do nível de infecção na população, portanto mais virulentas (DRAKE; HOLLAND, 1999; GUBLER; TRENT, 1993), 2) emergência de diferentes linhagens ou clados durante epidemias (MYAT THU et al., 2005; ZANG et al., 2005), 3) aumento de recombinação natural (CHEN et al., 2008; TOLOU et al., 2001; WOROBEY; RAMBAUT; HOLMES, 1999) e 4) co-circulação de mais de um sorotipo em uma localidade (BHARAJ et al., 2008; LAILLE; DEUBEL; SAINT-MARIE, 1991; PENG et al., 2005).

As distâncias genéticas entre e dentro de cada genótipo é estimada pelo número de substituições de bases por sítio. Os cálculos de distância foram estimados pelo programa Mega v. 5.0, e indicaram que a distância dentro de cada genótipo foi de: 2,8% para o Genótipo I; 2,2% para o genótipo II; 2,5 % para o genótipo III; 3,8 % para o genótipo IV e 3,2% para o genótipo V.

Para a determinação da distância genética entre os genótipos, foi calculada uma média entre o maior valor da distância dentro dos grupos (0,038) e o menor valor entre os grupos (0,067), que representa o valor de cutt-off. Essa média separa os genótipos em grupos distintos. O valor de cutt-off foi de (0,0525) 5,25%. Como pode ser observado no quadro 4, todas as distâncias estão acima do valor médio.

Quadro 4 – Estimativa de divergência genética entre os genótipos do DENV-1

Genótipos	I	II	III	IV
I	-	-	-	-
II	7,9%	-	-	-
III	8,6%	6,7%	-	-
IV	9,1%	7,8%	8,6%	-
V	9,3%	8,3%	8,8%	9,9%

Todas as sequências brasileiras, incluindo as amostras utilizadas neste estudo, se agruparam no genótipo V (figuras 31 e 32), juntamente com as sequências representativas das Américas, África e Caribe, como já havia sido demonstrado em estudos filogenéticos prévios (CARNEIRO, 2009; CARNEIRO et al., 2012; dos SANTOS et al., 2011; DRUMOND et al., 2012; GONÇALVES et al., 2002).

Este resultado também foi corroborado por Acosta et al. (2012), que estudando a região de junção entre as proteínas estruturais C/prM de isolados de Roraima dos quatro sorotipos do Dengue, indicou que as cepas de DENV-1 eram representativas do genótipo V. Portanto, três amostras utilizadas neste estudo (RR_08_02; RR_09_02; RR_0907) já apresentavam também, sequenciamento da região de junção entre as proteínas C/prM. As mesmas estão depositadas no GenBank sob o número de acesso (JX502770/JX502768/JX502769). O estudo foi publicado no periódico *Dengue Bulletin* (ANEXO E).

A árvore indicou que dentro do genótipo V, ocorreu a formação de um clado maior, agrupando as amostras de Roraima mais proximamente com isolados da Venezuela, Colômbia, Nicarágua, México, e isolados do estado do Amazonas, que foi chamado de subclado “Caribe” (figuras 31 e 32). As demais sequências brasileiras se agruparam em dois cladros distintos. Um reunindo cepas isoladas entre os anos de 1986-2002, representantes das regiões Norte (Pará), Nordeste (Paraíba, Ceará), Centro-Oeste (Distrito Federal, Minas Gerais, Mato Grosso) e Sudeste (Rio de Janeiro), também estando mais relacionados com cepas da Argentina e Paraguai, isoladas no ano 2000; e outro reunindo cepas isoladas entre os anos de 2000-2009, representantes das regiões Norte (Pará, Roraima-2001 e outras localidades não informadas) e Sudeste (Rio de Janeiro).

Os resultados encontrados se assemelham aos estudos anteriores feito por Cordeiro (2010), que analisou filogeneticamente os DENV-1 circulantes no município de Boa Vista – RR, no ano de 2009, e mostrou que todas as cepas pertenciam ao genótipo V, formando um grupo mais relacionado com representantes da Venezuela.

Carneiro (2009) e Carneiro et al. (2012) também analisando a composição genética de isolados brasileiros, entre eles um representante de Roraima, do ano de 2007, observaram que essa cepa mostrou-se mais relacionada com cepas da Venezuela, do Amazonas, e de outros países Latino americanos. Os autores sugeriram uma origem Latino Americana para esta cepa, que deve ter entrado no país devido à proximidade geográfica. Drumond et al. (2012) realizando estudos sobre a dinâmica da população dos DENV-1 brasileiros, indicaram que uma cepa representativa de Roraima do ano de 2008 formou um grupo mais relacionado com Venezuela e Colômbia.

Fica evidente a relação estreita entre as cepas isoladas neste estudo e aquelas pertencentes às regiões de fronteira nacional ou internacional, indicando, como dito anteriormente, um alto fluxo gênico entre estas populações.

Outro ponto interessante que deve ser analisado quanto a este subclado “Caribe”, seria que as cepas brasileiras agrupadas neste clado parecem pertencer exclusivamente à região Norte, mais especificamente, Roraima e Amazonas (figuras 31 e 32), com exceção de uma cepa isolada nos estudos feitos por dos Santos et al. (2011), que também se agrupou neste subclado maior, indicando que Roraima serve como centro de dispersão do vírus para outras regiões do Brasil. Estes resultados reforçam ainda mais o que Acosta et al. (2012) mostraram em seus estudos. Os autores concluíram que Roraima, por apresentar esta relação de proximidade fronteiriça com países da região do Caribe, é potencialmente uma porta de entrada para novas cepas de DENV no país.

Segundo Cordeiro (2010), isso pode ser favorecido pela característica geográfica de Roraima, que por não apresentar comunicação via terrestre com outros estados brasileiros, com exceção do Amazonas, fica isolado do restante do país, permitindo um fluxo maior com este Estado. Da mesma forma, o comércio facilitado e o turismo com a Venezuela e a Guiana Inglesa intensificam o fluxo de pessoas de Roraima para estes países, permitindo assim, que o ciclo de transmissão fique restrito a estas regiões.

Cada sorotipo pode ser dividido em amplos grupos/clados geneticamente diversos, que consistem em geral, de múltiplas linhagens distintas (HOLMES; TWIDDY, 2003). Linhagens podem ser caracterizadas como grupamentos de vírus em clados dentro dos genótipos (MYATH THU et al., 2005), que correlatam com a origem geográfica e/ou tempo de isolamento (DOMINGO et al., 2006; ZHANG et al., 2005).

Considerando a análise das cepas oriundas de Roraima juntamente com as cepas brasileiras, como citado anteriormente, foi observada a formação de três grupos distintos ou linhagens, onde as cepas de Roraima analisadas neste estudo agruparam na linhagem III (figuras 31 e 32). Este resultado está de acordo com o que foi encontrado por dos Santos et al. (2011), que realizou estudos com cepas brasileiras de DENV-1 obtidas nos anos de 1986/2009-2011, utilizando o gene E. Sendo que estas também foram agrupadas em três linhagens distintas.

Porém, uma cepa de Roraima isolada em 2001, agrupou na linhagem II (figuras 31 e 32), juntamente com outras cepas isoladas entre os anos de 2000-2009, representantes da Região Norte e Sudeste. A linhagem I engloba cepas isoladas entre os anos de 1996-2002, representantes das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, junto com isolados da Argentina e do Paraguai.

Vários estudos têm demonstrado a circulação de diferentes linhagens de DENV-1 (DUONG et al., 2011; KUKRETI et al. 2009; MYAT THU et al., 2005; ZHANG et al., 2005). A circulação destas linhagens foi definida com os estudos feitos por Domingos et al. (2006) que detectou a circulação de duas linhagens de DENV-1 na Índia, posteriormente, Kukreti et al. (2009), analisando cepas de DENV-1 oriundas da Índia entre os anos de 2001-2007, definiram a circulação de quatro diferentes linhagens. Na América Latina, a presença de duas diferentes linhagens de DENV-1 circulando na Colômbia, foi demonstrado por MENDEZ et al. (2010), que sugeriu a existência de linhagens com diferentes relações geográficas e temporais.

Antes dos estudos de dos Santos et al. (2011) que mostraram a circulação de duas novas linhagens de DENV-1 no Brasil, todos os isolados brasileiros se agrupavam dentro de uma única linhagem com pouca diversidade genética, que pensou-se ser resultado de um único evento de introdução de DENV-1 nos anos 80, no período do primeiro registro de casos de DENV-1 no Brasil (PIRES-NETO et al., 2005; SCHARTZMAYR et al., 1986). Estudos feitos por Drumond et al. (2012), baseados em sequências do genoma completo dos DENV-1 isolados de diferentes

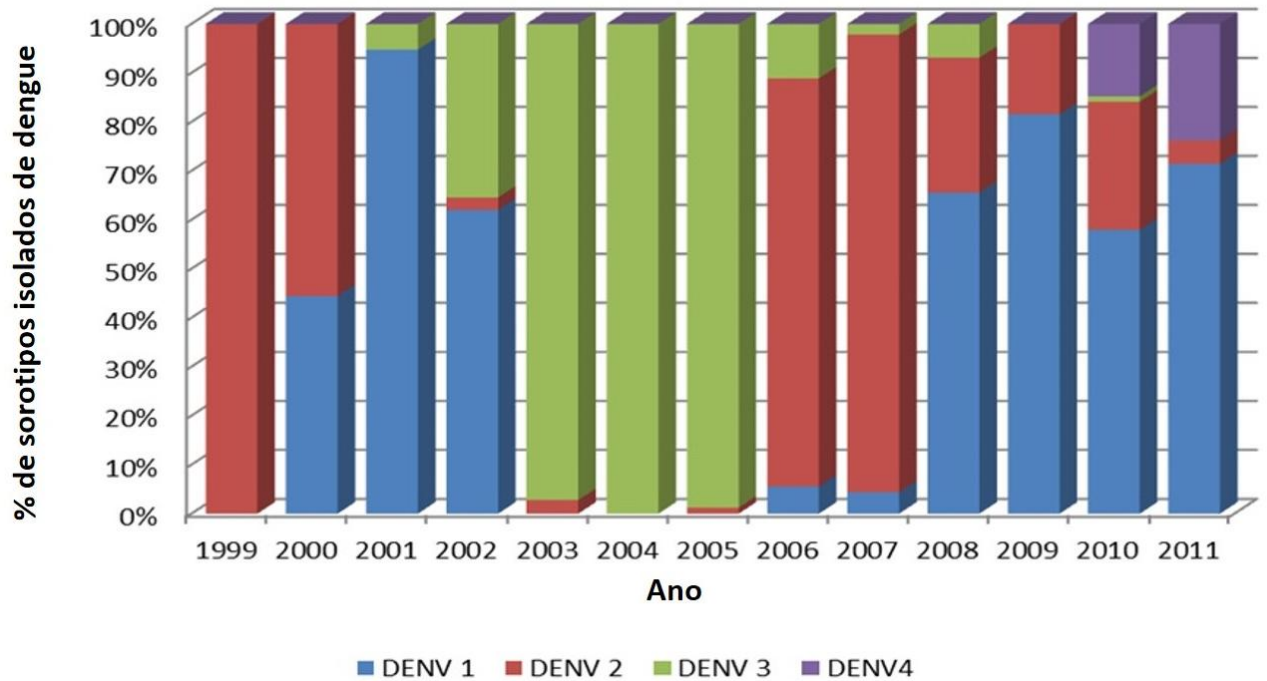
regiões brasileiras, evidenciaram que diferentes linhagens de DENV-1 têm sido introduzidas com o estabelecimento da circulação no Brasil, apresentando alta diversidade entre elas, contribuindo para o aumento da diversidade genética entre as cepas de DENV-1 circulantes no país. Ainda complementam que, pelo menos, duas linhagens estão circulando em diferentes regiões do Brasil.

Como pode ser observado na análise filogenética (figuras 31 e 32), as cepas de Roraima utilizadas neste estudo (2008-2009-2010), se agruparam com uma linhagem diferente daquela isolada no ano de 2001, sugerindo que possivelmente houve uma substituição ou extinção da linhagem II pela linhagem III, ou que as mutações nos aminoácidos supostamente levaram a uma seleção positiva. A linhagem III parece vir se mantendo desde a reintrodução ou terceira introdução do DENV-1 em Roraima no ano de 2006, uma vez que a linhagem II não foi mais detectada.

Então, uma possível sugestão para explicar este processo, poderia ser a ocorrência, ainda que remota, de sinais de seleção positiva nas cepas, quando se considera as quatro modificações de aminoácidos no envelope presentes em todos os isolados deste estudo, em relação à cepa de 2001 (tabela 5). Uma evolução adaptativa nos vírus Dengue, embora limitada, tem sido registrada em estudos anteriores (BENNETT et. al., 2003, 2006; THU et al., 2005). Contudo, uma investigação mais específica quanto à estrutura funcional da proteína seria necessário para confirmar e caracterizar estas mudanças encontradas.

Quanto à segunda sugestão, é necessário analisar o padrão de circulação de sorotipos no estado desde a reintrodução do Dengue no ano de 1999, como mostrado por Acosta et al. (2012) na figura 33. Pela análise do gráfico, fica clara a circulação do DENV-1 em dois períodos distintos, entre 2000-2002 período representado pela cepa isolada em 2001 (linhagem II), e a partir de 2006, período representado pelas cepas analisadas neste estudo (linhagem III). É importante destacar, que entre estes períodos houve a reintrodução do DENV-3 e a não identificação do DENV-1, ao longo de três anos consecutivos (2003-2004-2005). Como foi explicado anteriormente, estas cepas diferem entre si com relação à proteína E, na substituição de quatro aminoácidos, sendo que, em duas destas substituições (posições E227 e E338) são trocados aminoácidos apolares (prolina e leucina) por polares (serina e serina).

Figura 33 – Variação na prevalência dos sorotipos de Dengue em Roraima (1999-2011)



Fonte: Adaptado de Acosta et al. (2012)

Resultados similares foram sugeridos por Zhang et al. (2005). Em seus estudos os autores observaram que a substituição de linhagens de DENV-1 foi associada com um declínio na prevalência deste sorotipo, e um concomitante aumento do DENV-4 na Tailândia, indicando que a diminuição da frequência do sorotipo pode levar à substituição de um novo clado do vírus, ou em algumas vezes, à extinção. A substituição de linhagens parece ser um evento mais comum do que a persistência de uma linhagem por um longo tempo (BENNETT et al., 2003).

Carneiro et al. (2012) também encontraram em seus estudos com cepas de DENV-1 brasileiras dos anos de 1994-2008 a segregação entre duas linhagens, demonstrando que a substituição de linhagens tem ocorrido desde a introdução do DENV-1 no Brasil.

A introdução de novos sorotipos/genótipos/linhagens do DENV é o principal fator de risco para epidemias (dos SANTOS, et al., 2011). De acordo com a história natural do Dengue, eventos evolutivos que trazem novas variantes genéticas podem eventualmente aumentar a severidade da doença (MENDEZ, et al., 2010). Segundo Lee et al. (2012), a diversidade da população viral providencia ampla oportunidade

para seleção e emergência de cepas virais mais epidêmicas aumentando assim o risco de surtos de doença grave.

De acordo com Acosta et al., (2012), no ano de 2008 foram registrados no Estado 5.537 casos de Dengue com 389 casos de Dengue Severa. E como pode ser observado no gráfico da figura 33, ocorreu uma prevalência do DENV-1 em relação aos outros sorotipos. Porém, como não foi possível analisar amostras em que o paciente apresentasse Dengue Grave, não se pode afirmar que este aumento de casos de Dengue e Dengue Severa possa ter sido devido a este evento de substituição de linhagens, fato que precisa ser melhor estudado.

Ainda é escasso o entendimento de características como virulência e potencial epidêmico, para vários genótipos e cepas do vírus Dengue. É necessária uma maior vigilância global e regional do vírus, juntamente com os conhecimentos em níveis clínico, epidemiológico e genético, para que se tenha um entendimento amplo tanto da doença como do vírus causador (LEE et al., 2012), considerando os aspectos ligados à identificação dos sorotipo, genótipos e linhagens, a presença de alterações genéticas como mutação e rota de dispersão.

5 CONCLUSÕES

- A análise de substituição de aminoácidos das cepas de Roraima comparadas com a cepa RR/01 indicou quatro principais mudanças que ocorreram em todos os isolados estudados.
- As cepas de DENV-1 isoladas em Roraima entre os anos de 2008 a 2010 são representantes do genótipo V.
- Dentro das três linhagens identificadas nas análises filogenéticas, as amostras de Roraima se agruparam na linhagem III.
- As cepas de Roraima formaram um clado maior, separado dos outros isolados do genótipo V, chamado subclado “Caribe”, mais proximamente relacionados com amostras do Caribe e Amazonas
- Sugere-se a ocorrência de substituição ou extinção da linhagem II do DENV-1 circulante no estado de Roraima no ano de 2001, pela linhagem III que circula na região desde 2006. Acredita-se que esta substituição de linhagens se deu devido à mudança na prevalência de sorotipos em intervalos distintos.
- Não foi possível relacionar o aumento de casos de dengue severa registrados em 2008/2009 com o evento de substituição de linhagens/sorotipos, pela falta de amostras que representassem esta forma da doença, e também devido ao fato de que, no período indicado, foram identificados três dos quatro sorotipos.

REFERÊNCIAS

- AASKOV, J. et al. Multiple recombinant dengue type 1 viruses in an isolate from a dengue patient. **Journal of General Virology**, London, v. 88, n. 12, p. 3334–3340, dez. 2007.
- ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue infection in Boa Vista, Roraima, Brazil, 1999-2002. **Virus Reviews & Research**, [s.l.], v.11, n. 1, p. 136. 2006.
- ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue vírus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 10, p. 1979-1980, out. 2011.
- ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue infection in Boa Vista, Roraima, Brazil, 1999-2009. **Virus Reviews & Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 253. 2009.
- ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains. **Dengue Bulletin**, New Delhi, v. 36, [s.n.], p. 50-63. 2012.
- ALLICOCK, O. et al. Phylogeography and Population Dynamics of Dengue Viruses in the Americas. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 29, n. 6, p. 1533–1543, jan. 2012
- ALLISON, S. L. et al. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 75, n. 9, p. 4268-4275, maio. 2001.
- ALVES, V. L. F. **Otimização de Teste Diagnóstico Molecular e Análise da Variabilidade Genética dos Diferentes Sorotipos do Vírus Dengue Baseado na Técnica Proposta por Lanciotti (1992)**. 2005. 88 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ, Recife, 2005.
- AMARILLA, A. A. et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. **Virology Journal**, London, v. 6, [s.n.], p.113, jul. 2009.
- ANDERS, K. L. et al. Epidemiological factors associated with Dengue Shock Syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 84, n. 1, p. 127-134, jan. 2011.
- ANDERSON, J. R.; RICO-HESSSE, R. Aedes aegypti vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue vírus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 75, n. 5, p. 886-892, nov. 2006.
- ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: CHAMBERS, T. J.; MONATH, T. P. (eds.). **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution**. California: Elsevier, 2003. v. 59, p. 229 – 274.

ANGEL, B.; SHARMA, K.; JOSHI, V. Association of ovarian proteins with transovarial transmission of dengue viruses by *Aedes* mosquitoes in Rajasthan, India. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 128, n. 3, p. 320-323, set. 2008.

ANOOP, M. et al. Complete genome sequencing and evolutionary analysis of dengue virus serotype 1 isolates from an outbreak in Kerala, South India. **Virus Genes**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 1–13, ago. 2012.

APPANA, R. et al. Susceptible and protective HLA class 1 alleles against dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in a Malaysian population. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 5, n. 9, [s.p.], set. 2010.

AZEVEDO, A. S. **Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da Dengue baseadas na proteína do envelope viral**. 2011. 200p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ, Rio de Janeiro, 2011.

BALMASEDA, A. et al. High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. **Tropical Medicine and International Health**, London, v. 11, n. 6, p. 935-942, jun. 2006.

BARRERO, P. R.; MISTCHENKO, A. S. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. **Virus Research**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 135-145, maio. 2004.

BEASLEY, D. W.; BARRETT, A. D. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 24, p. 13097-13100, dez. 2002.

BEATTY, M. E. et al: Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 11, p. 1-7, nov. 2010.

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

BENNETT, S. N. et al. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 10, p. 1650–1658, out. 2003.

BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discovery Today Disease Model**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 97-103. 2006.

BENNETT, S. N. et al. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 4, p. 885–893, abr. 2006.

BHARAJ, P. et al. Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India. **Virology Journal**, London, v. 5, n. 1, p. 1-5, jan. 2008.

BLUT, A. Dengue Fever (DENV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, [s.l.], v. 38, S. 1, p. 318-330, set. 2011.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002. 28 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2012. 2013a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_graves_2012_at032013.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Óbitos por Febre Hemorrágica da Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990-2012. 2013b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_obitos_2012_at032013.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas – 1990-2012. 2013c. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 4ª ed. Brasília, 2013d. 80 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Casos de Dengue no Brasil**. Brasília. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Dengue. Semanas 1 a 7 de 2013. 2013e. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/25/ppt_final_dengue_25fev14h.pdf> Acesso em: 25 jul. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da dengue – Semanas de 1 a 52 de 2010. 2010a. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da dengue – Semanas de 1 a 39 de 2011. 2011. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 14 out. 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico – 2010b. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 01 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Balanço Dengue – Janeiro a Abril de 2012. 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/ap_balnco_dengue.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2013.

CACERES, C. et al. Complete nucleotide sequence analysis of a Dengue-1 virus isolated on Easter Island, Chile. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, n. 11, p. 1967–1970, nov. 2008.

CARBAJO, A. E.; CURTO, S. I.; SCHWEIGMANN, N. J. Spatial distribution pattern of oviposition in the mosquito *Aedes aegypti* in relation to urbanization in Buenos Aires: southern fringe bionomics of an introduced vector. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 209-218, jun. 2006.

CARNEIRO, A. R. **Caracterização molecular de cepas do vírus dengue 1 isoladas no Brasil entre os anos de 1994 a 2008**. 2009. 144 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2009.

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

CASTRO, M. G. et al. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* for Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 809-814, dez. 2004.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome, organization, expression and replication. **Annual reviews of microbiology**, [s.l.], v. 44, [s.n.], p. 649-688. 1990.

CHANG, G. J. Molecular biology of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G., (eds.). **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997. p. 175-198.

CHAVEZ, J. H. et al. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. **Biologicals**, London, v. 38, n. 6, p. 613–618, nov. 2010.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue – Quo tu et quo vadis? **Viruses**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 1562-1608, set. 2011.

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 866-871, ago. 1997.

CHEN, S. P. et al. Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, n. 7, p. 1175–1179, jul. 2008.

CHEN, W. J.; WU, H. R.; CHIOU, S. S. E/NS1 modifications of Dengue 2 virus after serial passages in mammalian and/or mosquito cells. **Intervirology**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 289–295, set/out. 2003.

COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R.; ARMSTRONG, P. M. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 79, n. 2, p. 853-859, jan. 2005.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228 p.

CORDEIRO, J. S. **Caracterização molecular e análise filogenética dos vírus dengue circulantes na cidade de Boa Vista, Roraima, Brasil**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – INPA, Manaus, 2010.

CORRÊA, P. R. L.; FRANÇA, E.; BOGUTCHI, T. F. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 33-40, jan. 2005.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 12, n. 2, p. 309–314, mar. 2012.

CUNHA, R. V.; NETTO, G. F. Aspectos clínico epidemiológicos do Dengue Hemorrágico no Município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 24, n. 2, p. 123-128, abr/jun. 1991.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 8, p. 772, ago. 2012.

DEEN, J. L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **The Lancet**, [s.l.], v. 368, n. 9530, p. 170-173, jul. 2006.

DEGRÈVE, L.; FUZO, C. A.; CALIRI, A. Extensive structural change of the envelope protein of dengue virus induced by a tuned ionic strength: conformational and energetic analyses. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s.l.], v. 26, n. 11, p. 1311–1325, nov. 2012.

DESCLOUX, E. et al. Dengue 1 Diversity and Microevolution, French Polynesia 2001–2006: Connection with Epidemiology and Clinics. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 1-15, ago. 2009.

DVE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos de Dengue por sorotipo em Roraima 2009-2013**. Boa Vista, Roraima, 2013. Relatório digitado.

DIALLO, M. et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999–2000: Entomologic findings and epidemiologic considerations. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 362-367, mar. 2003.

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, n. 4, p. 1519-1529, abr. 2006.

DOS SANTOS, F. B. et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 387-390, ago. 2011.

DOS 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 nonstructural proteins. **Virus Research**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 197-205, dez. 2002.

DRAKE, J. W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 9, p. 4171–4175, maio. 1993.

DRAKE, J. W.; HOLLAND, J. J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13910-13913, nov. 1999.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious v.5.5**. Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand. 2011.

DRUMOND, B. P. et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, Wien, v. 157, n. 11, p. 2061–2073, nov. 2012.

DUONG, V. et al. Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. **Infection, Genetics and Evolution**, doi:10.1016/j.meegid.2011.06.019. 2011.

DURBIN, A. P. et al. Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology**; [s.l.], v. 376, n. 2, p. 429–435, jul. 2008.

FÉRES, V. C. R. **Epidemiologia Molecular dos vírus dengue em Goiânia 1994-2006: Vigilância laboratorial e caracterização dos sorotipos circulantes**. 2008. 183 p. Tese (Doutorado em Patologia Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2008.

FERGUSON, N.; ANDERSON, R.; GUPTA, S. The effect of antibody dependent enhancement on the transmission dynamics and persistence of multiple-strain pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 96, n. 2, p. 790-794, jan. 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. Dengue. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 345-358.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus dengue. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 1, p. 15-20, jan./mar. 1999.

FIGUEIREDO, L. T. M. History, present and future of Dengue Fever in Brasil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA

ROSA, J. F. S. (eds.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 154-163.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, present and future perspective. **Dengue Bulletin**, [s.l.], v. 27, [s.n.], p. 25-33, dez. 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil during 1999-2009: A review. **Dengue Bulletin**, India, v. 34, [s.n.], p. 6-12, dez. 2010.

FIGUEIREDO, R. P. M. et al. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 667-669, abr. 2008.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 82, n. 8, p. 1867-1876, ago. 2001.

GJENERO-MARGAN, I. et al. Autochthonous dengue fever in Croatia. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 16, n. 9, p. 1-4, ago./set. 2011.

GONCALVEZ, A. P. et al. Diversity and Evolution of the Envelope Gene of Dengue Virus Type 1. **Virology**, [s.l.], v. 303, n. 1, p. 110-119, jul. 2002.

GOULD, E. A. et al. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, England, v. 16, n. 12, p. 1702-1704, dez. 2010.

GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 158-165, jan. 1984.

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

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 3, p. 480-496, jul. 1998.

GUBLER, D. J. et al. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent-borne diseases. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 223-233, fev. 2001.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 100-103, fev. 2002.

GUBLER, D. J. Dengue/ dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Foundation Symposium**, Chichester, v. 277, [s.n.], p. 3-16. 2006.

- GUBLER, D. J.; TRENT D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents Disease*, New York, v. 2, [s.n.], p. 383–393. 1993.
- GUINDON, S. et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. ***Systematic Biology***, [s.l.], v. 59, n. 3, p. 307-321, maio. 2010.
- GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. ***Viruses***, [s.l.], v. 2, n. 12, p. 2649-2662, dez. 2010.
- GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. ***Lancet Infectious Diseases***, New York, v. 2, n. 1, p. 33–42, jan. 2002.
- GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue Diagnosis, Advances and Challenges. ***International Journal of Infectious Diseases***, [s.l.], v. 8, [s.n.], p. 69-80. 2004.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. ***Nature Reviews Microbiology***, [s.l.], v. 8, n. 12, S7-16, dez. 2010.
- HALSTEAD, S.B. 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, abr. 1970.
- HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever – a public health problem and a field for research. ***Bulletin World Health***, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 1-21. 1980.
- HALSTED, S. B. Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (eds.). ***Dengue and dengue Hemorrhagic Fever***. New York: CAB International, 1997. p. 23-44.
- HALSTED, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue virus. ***Advances in Virus Research***, [s.l.], v. 60, [s.n.], p. 421-467. 2003.
- HALSTED, S. B. Dengue. ***The Lancet***, [s.l.], v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, nov. 2007.
- HALSTED, S. B. Dengue Virus – Mosquito Interactions. ***Annual Reviews Entomology***, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 273-291. 2008a.
- HALSTED, S. B. Pathophysiology. In: PASVOL, G.; HOFFMAN, S. L. (eds.). ***Dengue***. London: Imperial College Press, 2008b. v. 5, p. 285-326.
- HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. ***Science***, [s.l.], v. 131, [s.n.], p.1102–1103. 1960.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of Medical Entomology**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 411–422, maio. 2001.

HEINZ, F. X. et al. Molecular basis of antigenicity and attenuation of a Flavivirus: Tick-borne encephalitis virus. **Vaccine**, [s.l.], v. 90, [s.n.], p. 97-100. 1990.

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

HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Tropical Medicine and Health**, Nagasaki, v. 39, n. 4, suplemento, p. 37-43, abr. 2011.

HOANG, L. T. et al. The early wholeblood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults. **Journal of Virology**, [s.l.], v. 84, n. 24, p. 12982-12994, dez. 2010.

HOLMES, E. C.; WOROBEY, M.; RAMBAUT, A. Phylogenetics evidence for recombination in dengue virus. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 405-409, mar. 1999.

HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in microbiology**, [s.l.], v.8, n. 2, p. 74-77, fev. 2000.

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

HOWE, G. M. A world geography of human diseases. **Academic Press**, New York, [s.v.], [s.n.], p. 302-317. 1977.

IGARASHI, A. Mosquito cell cultures and the study of arthropodborne togaviruses. **Advances in Virus Research**, [s.l.], v. 30, [s.n.], p. 21-39. 1985.

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

JOHANSON, M.; DOMINICI, F.; GLASS, G. Local and global effects of climate on dengue transmission in Puerto Rico. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 382, fev. 2009.

JOSHI, V.; MOUYRA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 158-161, ago. 2002.

- KALAYANAROOJ, S.; NIMMANNITYA, S. Is dengue severity related to nutritional status? **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health**, [s.l.], v. 36, [s.n.], p. 378–384. 2005.
- KING, C. C. et al. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. **Virology Journal**, [s.l.], v. 5, [s.n.], p. 63, maio. 2008.
- KOURI, G. P. et al. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: Lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bulletin World Health Organ**, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 375–380. 1989.
- KROEGER, A.; NATHAN, M. Dengue: setting the global research agenda. **The Lancet**, [s.l.], v. 368, n. 9554, p. 2193-2195, dez. 2006.
- KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, [s.l.], v. 108, [s.n.], p. 717–725. 2002.
- KUKRETI, H. et al.: Phylogenetic studies reveal existence of multiple lineages of a single genotype of DENV-1 (genotype III) in India during 1956-2007. **Virology Journal**, London, v. 6, [s.n.], p. 1, jan. 2009.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 30, n. 5-6, p. 329-340, set. 2007.
- KURANE, I.; ENNIS, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**, London, v. 4, [s.n.], p. 121-127. 1992.
- KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Reviews in Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 71-92. 2008.
- LAILLE, M.; DEUBEL, V.; SAINTE-MARIE, F. F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 34, n. 1, p. 51-54, maio. 1991.
- LANCIOTTI, R. S. et al. 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, mar. 1992.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue – 3 viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 75, n. 1, p. 65-75, jan. 1994.
- LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, London, n. 78, v. 9, p. 2279–2284, set. 1997.
- LA RUCHE, G. et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 15, n. 39, p. 1-5, set. 2010.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. **The Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 195, n. 8, p. 1108-16. 2007.

LAZCANO, J. A. B. et al. Factores ecológicos asociados con La presencia de larvas de *Aedes aegypti* em zonas de alta infestación Del municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 19, n. 6, p. 379-384, jun. 2006.

LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, [s.l.], v. 232, n. 2, p. 281-90. 1997.

LEE, K. S. et al. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 1, p. 77–85, jan. 2012.

LEWIS, J. A. et al. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, [s.l.], v. 197, [s.n.], p. 216–224. 1993.

LIMON-FLORES, A. Y. et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: an effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 86, n. 5, p. 323–334, out. 2005.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. (eds). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2001. p. 991-1041.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replications. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (eds). **Fields Virology**. Phyladelphia: Lippincott William & Wilkins, 2007. p. 1102-1103.

LUZ, C. et al. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 214-215, mar. 2008.

MANDL, C. et al. Spontaneous an engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a Flavivirus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 72, n. 3, p. 2132-2140, mar. 1998.

MELO, F. L.; ROMANO, C. M. ZANOTTO, P. M. A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia ? **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 390, abr. 2009.

MENDEZ, J. A. et al. Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. **Virology Journal**, [s.l.], v. 7, [s.n.], p. 226, set. 2010.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 307–313, maio. 2006.

MILLER, J. L. et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. **PLoS Pathogen**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. e17, fev. 2008.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, jun. 2003.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, [s.l.], v. 427, n. 6972, p. 313-319, jan. 2004.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, Baltimore; v. 79, n. 2, p. 1223-1231, jan. 2005.

MONDOTTE, J. A. et al. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 81, n. 13, p. 7136–7148, jul. 2007.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 13-22, jan. 2005.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Reviews Immunology**, [s.l.], v. 29, [s.n.], p. 587-619. 2011.

MYAT THU, H. et al. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. **Virology**, [s.l.], v. 336, [s.n.], p. 163-172. 2005.

NAVECA, F. G. et al. Complete Genome Sequence of a Dengue Virus Serotype 4 Strain Isolated in Roraima, Brazil. **Journal of Virology**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 1897-1898, fev. 2012.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 205-207, jul./dez. 2002.

NATIELLO, M. et al. Indigenous dengue fever, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 9, p. 1498–1499, set. 2008.

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

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 925-926, out. 2001.

NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 205-211, jan./mar. 2000.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1991: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection**, [s.l.], v. 111, n. 1, p. 163–70. 1993.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TANG, A. T. Surto de Dengue em Boa Vista, Roraima: Nota prévia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 23, [s.n.], p. 53-54. 1986.

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

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue in Mexico and in the United States, 1980. **Epidemiological Bulletin**, v. 2, p. 9–11. 1981. Disponível em: <http://www1.paho.org/english/dd/ais/EB_v2n1.pdf> Acesso em: 01 jul. 2013.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue in the Americas: an update. **Epidemiological Bulletin**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 1-3, dez. 1993.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Re-emergence of Dengue in the Americas. **Epidemiological Bulletin**, Ottawa, v. 18, n. 2, [s.p], jul. 1997.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Fact Sheet: Dengue. 2011. Disponível em: <http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=54493&Itemid=52479&lang=en>. Acesso em: 22 maio. 2013.

PENG, W. et al. Simultaneous infection with dengue 2 and 3 viruses in a Chinese patient return from Sri Lanka. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 3, p. 194-198, mar. 2005.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 369–377, ago. 2008.

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**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 6, p. 843-852, jun. 2005.

PLATT, K. B. et al. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 119–125, ago. 1997.

PURDY, D. E.; CHANG, G. J. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. **Virology**, [s.l.], v. 333, n. 2, p. 239-250. 2005.

QI, R.; ZHANG, L.; CHI, C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 40, n. 8, p. 91-101, fev. 2008.

RABAA, M. et al. Phylogeography of recently emerged DENV-2 in Southern Viet Nam. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 4, n. 7, p. 766, jul. 2010.

RAMBAUT, A. Fig Tree, v. 1.3.1. 2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>. Acesso em: 23 de maio. 2013.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. Tracer: MCMC Trace Analysis Tool. Version v1.5.0. 2003-2009. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/>>. Acesso em: 23 maio. 2013.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, [s.l.], v. 174, n. 2, p. 479-493. 1990.

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

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advance in Virus Research**, [s.l.], v. 59, [s.n.], p. 315-341, fev. 2003.

RICO-HESSE, R. Dengue vírus evolution and virulence models. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 44, n. 11, p. 1462-1466, jun. 2007.

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

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Science**, [s.l.], v. 67, n. 16, p. 2773-2786, ago. 2010.

ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, [s.l.], v. 246, [s.n.], p. 317-328. 1998.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 19, n. 12, p. 1572-1574, ago. 2003.

RONQUIST, F.; MARK, V. D. P.; HUELSENBECK, J. P. Bayesian phylogenetics analysis using MrBayes. In: LEMEY, F.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. (eds.). **The Phylogenetic Handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p. 210-266.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice across a Large Model Space. **Systematic Biology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 539-542, fev. 2012.

RORAIMA. Secretaria de Estado da Saúde. **Relatório**. Roraima, 2009. Relatório digitado.

ROSS, T. M. Dengue Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 149-160, mar. 2010.

RUDNICK, A. Dengue virus ecology in Malaysia. **Institute for Medical Research Malaysia - Bulletin**, [s.l.], v. 23, [s.n.], p. 51–152. 1986.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 1, n. 1, p. 30-50, jan. 1952.

SABIN, A. B.; R. W. SCHLESINGER. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, [s.l.], v. 101, [s.n.], p. 640-642. 1945.

SALDA, L. T. et al. Molecular epidemiology of dengue 2 viruses in The Philippines: Genotype shift and local evolution. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 73, n. 4, p. 796–802, out. 2005.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 74, n. 12, p. 5463-5467, dez. 1977.

SAN MARTIN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 82, n. 1, p. 128-135, jan. 2010.

SARDAGNA, A. A. **Caracterização Molecular de dengue virus sorotipo 1 autóctones ao Distrito Federal – Brasil**. 2003. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2003.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. 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, abr./jun. 1986.

SCHNEIDER, J.; DROLL, D. A timeline for **Dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences**. Division of Disease Prevention and Control Pan American Health Organization. 2001.

SILVA, M. O. **Filogenia e caracterização genética do vírus dengue 2 circulante no Brasil**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Biologia dos agentes infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2010.

SIQUEIRA, T. C. S. et al. Epidemias de dengue no estado de Roraima de 1999 a 2009: sorotipos circulantes e formas graves da doença. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Progresso da Ciência, 61, 2009, Manaus. **Resumos...** Manaus: Resumos de comunicação Livre, 2009.

SHEPARD, D. S. et al. Economic impact of Dengue illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 84, [s.n.], p. 200-207. 2011.

SHRESTHA, B. et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS Pathogen**. v. 6: e1000823. 2010.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 4, p. 642–650, jul. 2004

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 10, p. 2755-2766, out. 2006.

SWAMINATHAN S.; BATRA, G.; KHANNA, N. Dengue vaccines: state of the art. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s.l.], v. 20, [s.n.], p. 819–835. 2010.

TAPIA-CONYER, R.; MENDEZ-GALVAN, J. F.; GALLARDO-RINCON, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 46, s. 2, p. S3-S6, out. 2009.

TAMURA, K. et al. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 2731-2739, out. 2011.

THEIN, S. et al. Risk factors in dengue shock syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 56, n. 6, p. 566-572, jun. 1997.

THEILER, M.; DOWNS, W. G. **The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of The Rockefeller Foundation Virus Program**. London: Yale University Press, 1973. p. 1951-1970.

THU, H. M. et al. Lineage extinction and replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural selection. **Virology**, [s.l.], v. 336, [s.n.], p. 163–172. 2005.

TOLOU, H. J. G. et al. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 7, p. 1283–1290, jul. 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. The first laboratory confirmed cases of dengue fever in Brazil: vírus isolation and serological results. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (eds.). **An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 164-167.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUTA A. Inferring the rate and Time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 122-129, jan. 2003.

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

TWIDDY, S. S. et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, [s.l.], v. 298, [s.n.], p. 63–72. 2002.

VASILAKIS, N. et al. Antigenic relationships between sylvatic and endemic dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s.l.], v. 79, n. 1, p. 128–132, jul. 2008.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Advances in Virus Research**, [s.l.], v. 72, [s.n.], p. 1–76. 2008.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. The **Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 181, [s.n.], p. 2–9. 2000.

VAZQUEZ, Y. et al. Monoclonal antibody to dengue capsid protein. **Landes Bioscience**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 157-162, mar./abr. 2009.

VIEIRA, D. S. et al. Characterization of dengue virus serotype 1 in epidemics in Porto Velho, Rondônia, in 2001-2003. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 268-271, maio/jun. 2007.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. Evolutionary history of dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 11, [s.n.], p. 878–885. 2011.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 1-11, maio. 2013.

XU, G. et al. An outbreak of Dengue virus serotype 1 infection in Cixi, Ningbo, people's Republic of China, 2004, associated with a traveler from Thailand and high density of *Aedes albopictus*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 76, n. 6, p. 1182-1188, jun. 2007.

WAHALA, M. P. B. W.; ARAVINDA, M. S. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. **Viruses**, Switzerland, v.3, n. 12, p. 2374-2395, dez. 2011

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

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 523-540, jul. 2009.

WESTAWAY, E. G.; BLOK, J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (eds.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. London: CAB International, 1997. p. 147-173.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 7, p. 518-528, jul. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Who Fact Sheet**, [s.l.], [s.v], n. 117, [s.p]. 2009a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. WHO Media centre. Fact Sheet, nº 117. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 26 maio. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of Dengue Scientific Working Group. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/swg_dengue>. Acesso em: 13 fev. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical Diagnosis in Dengue Hemorrhagic Fever**. Diagnosis, treatment, prevention and control. 2 ed. Geneva: TDR/WHO, 1997. 84 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. DengueNet database and geographic information system. 2009b. Disponível em: <<http://www.who.int/denguenet>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue in the Western Pacific Region**. Manila, 2009c. Disponível em: <http://www.wpro.int/health_topics/dengue>. Acesso em: 20 nov. 2011.

WOROBAY, M.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n. 13, p. 7352-7357, jun. 1999.

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, New York, v. 10, n. 11, p. 907-912, nov. 2003.

ZHANG, C. et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. **Journal of Virology**, London, v. 79, n. 24, p. 15123-15130, dez. 2005.

ZEIDLER, J. D. et al. Vírus dengue em larvas de *Aedes aegypti* e sua dinâmica de infestação, Roraima, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 986-991, dez. 2008.



ZHENG, K. et al. Molecular characterization of the E gene of the dengue virus type 1 isolated in Guangdong province, China, in 2006. **Epidemiology and Infection**, [s.l.], v. 137, n. 1, p. 73-78, jan. 2009.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal models of Dengue virus infection. **Viruses**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 62-82, jan. 2012.

ZYBERT, I. A. et al. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 12, p. 3047-3051, dez. 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da UFRR

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA**

Carta nº 24/CoEP-UFRR Boa Vista, 21 de setembro de 2011.

A Sua Senhoria
Pesquisador Pablo Oscar Amézaga Acosta.

Assunto: Parecer projeto de pesquisa

Senhora Pesquisadora,

Informamos a Vossa Senhoria que o CoEP/UFRR constituído nos termos da Resolução 196/06 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre documentação referente ao projeto de pesquisa: **Características epidemiológicas, clínicas, bioquímicas e moleculares da infestação do vírus dengue em Boa Vista, RR, Brasil**, conforme abaixo discriminado.

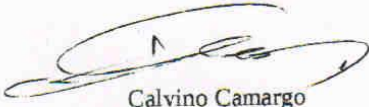
Protocolo de pesquisa: 110605-CoEP

Pesquisador responsável: Pablo Oscar Amézaga Acosta.
Data da reunião: 09/09/2011.

Parecer: "APROVADO"

Outrossim, informamos que V. Senhoria deverá enviar relatório anual ou final, para que este comitê possa acompanhar o desenvolvimento do projeto conforme item VII. 13. d. Resolução 196/06 – CNS/MS.

Atenciosamente,



Calvino Camargo
Presidente do Comitê

ANEXO B – Protocolo de Purificação e precipitação com Polietilenoglicol (PEG)

Precipitação de produto da PCR com Polietilenoglicol (PEG)

A precipitação com Polietilenoglicol (PEG) atua como método de purificação da PCR com objetivo de remoção de oligos e nucleotídeos não incorporados na PCR que poderiam interferir na reação de sequenciamento. Apresenta um bom rendimento, podendo utilizar somente 0,5-1 μ L da amostra na reação de sequenciamento. O método não é recomendado para PCR com bandas inespecíficas ou com primer dimers.

Antes de iniciar o procedimento:

- A- Armazene o etanol 80% a -20°C;
- B- Programe o banho-maria ou banho seco a 37°C.

Procedimento:

- 1- Transfira o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicione PEG (20%);

Obs: o volume de PEG a ser adicionado deve ser igual ao volume da PCR.

- 2- Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;

- 3- Após incubação, centrifugue a 2500 rcf por 15 minutos a temperatura ambiente;

- 4- Descarte o sobrenadante e adicione 125 μ L de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 rcf por 2 minutos;

- 5- Descarte o sobrenadante e deixe secando a 37°C por 15 minutos para remoção de resíduos de etanol;

- 6- Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume inicial da PCR.

- 7- Agite em vórtex por 10 segundos e armazene amostra a -20°C

Obs: antes de armazenamento da amostra a -20°C armazene a 4-5°C por algumas horas para uma melhor eluição do DNA.

Solução PEG (20% w/v PEG, 2,5M NaCl)

10g de Polietilenoglicol 8000

7,3g de NaCl

Adicione 35 mL de ddH₂O

Agite para solubilizar o PEG durante 20 minutos, ou até que o mesmo encontre-se solúvel. Após, complete o volume para 50 mL com ddH₂O.

ANEXO C - Protocolo de purificação da reação de sequenciamento - EtOH/EDTA/Acetato de Sódio. – Bula Kit BigDye® v3.1 - Applied Biosystem™, USA

Para precipitar reações de 10uL em placas com 96 poços:

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue 1 min 2000 RCF;
2. Adicionar 1µL de EDTA 125mM a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o EDTA foi adicionado no fundo dos poços.

3. Adicionar 1µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2) a cada um dos poços;

Nota: tenha certeza que o acetato foi adicionado no fundo dos poços.

4. Adicionar 25µL de EtOH 100% gelado, a cada um dos poços;
5. Sele a placa com *strips* e misture por inversão (4x);
6. Incube por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz;
7. Centrifugue a 2.000 RCF por 45 minutos;

Importante: o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se isto não for possível, então faça um spin na placa por mais 2 minutos antes de recomeçar

8. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: Antes de inverter a placa, desprezei o conteúdo da mesma na pia junto com uma leve batida na mesa. Após esta centrifugação, programá-la para a temperatura de 4°C

9. Adicione 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços;
10. Centrifugue por 15 minutos, à 4°C e 1.650 RCF;

Obs: Caso tenha esquecido a programação para 4°C, acione o FAST temperatura

11. Inverta a placa e faça um *spin* até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Nota: comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover.

12. Incube a placa à 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (termociclador)
 13. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congelar a placa seca ao abrigo da luz;
 14. No momento de sequenciar ressuspender com 10 uL de formamida Hi-Di, lavando as paredes dos poços;
 15. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto, monte e coloque no sequenciador.¹
-

ANEXO D – Sequências das cepas de DENV-1 selecionadas do GenBank

Número de Acesso	País	Ano de Isolamento	Genótipo
AF309641	Camboja	1998	I
AF425630	Tailândia	1980	I
AB111076	Tailândia	2002	I
AY620953	Myanmar	2001	I
AY732475	Tailândia	1994	I
AY726555	Myanmar	1998	I
AF350498	China	1980	I
AF425629	Tailândia	1963	II
D10513.1	Tailândia	1954	II
AF180817	Tailândia	1964	II
AF425622	Malásia	1972	III
FN825674	Malásia	2005	III
AF425611	Austrália	1983	IV
U88535	Nauru	1974	IV
AB232666	Indonésia	2002	IV
AB195673	Japão	2003	IV
AB189121	Indonésia	1998	IV
AY630407	Polinésia Francesa	2001	IV
DQ285558	Reunion	2004	IV
AF425614	Brasil	1997	V
AF425610	Angola	1988	V
HM450103	Brasil	2007	V
BeH721251	Brasil	2007	V
AF226687	Guiana Francesa	1989	V
FJ639824	Venezuela	2006	V
AF425621	Jamaica	1977	V
AF425313	Brasil	1982	V
AF226685	Brasil	1990	V
AF311956	Brasil	1997	V
AF514883	Paraguai	2000	V
AF514885	Argentina	2000	V
AY277664	Argentina	1999	V
EU863650	Chile	2002	V
GQ868561	Colômbia	1999	V
DQ677561	Estados Unidos	2001	V
EU482591	Porto Rico	2006	V
EU596504	Nicarágua	2005	V
FJ390380	USA	1998	V
FJ410184	USA	1993	V
FJ410188	USA	1996	V
FJ639814	Venezuela	2005	V

ANEXO D – Sequências das cepas de DENV-1 selecionadas do GenBank (continuação)

Número de Acesso	País	Ano de Isolamento	Genótipo
GQ868568	Colômbia	2007	V
GQ868570	Colômbia	2008	V
FJ850093	Brasil	2008	V
FJ850071	Brasil	2000	V
FJ850077	Brasil	2003	V
HM450097	Brasil	2004	V
AF425625	Nigéria	1968	V
HM450089	Brasil	2001	V
HM450077	Brasil	2007	V
HM043710	Brasil	2009	V
AY277665	Argentina		V
FJ850075	Brasil	2002	V
AB519681	Brasil	2001	V
HM450087	Brasil	2000	V
AF298807	Costa Ivore	1998	V
HM450081	Brasil	1997	V
HM450090	Brasil	2002	V
EU482609	Venezuela	2007	V
GQ868562	Colômbia	2005	V
HM450104	Brasil	2008	V
FJ850104	Venezuela	2008	V
GU131833	Venezuela	2000	V
HQ166037	México	2008	V
AF425626	Peru	1991	V
GQ357692	Singapura	2008	V
GQ367691	Singapura	2007	V
FJ639741	Venezuela	1998	V
JN819415	Venezuela	2006	V
HM450080	Brasil	1996	V
HM450102	Brasil	2007	V
FJ850084	Brasil	2005	V
JN122281	Brasil	2011	V
JN122280	Brasil	1986	V
HQ026761	Brasil	2009	V
AF425609	Aruba	1985	V
AF425617	Colômbia	1996	V
AF425623	México	1980	V
AF425637	Venezuela	1994	V
AF425634	Venezuela	1997	V

ANEXO D – Sequências das cepas de DENV-1 selecionadas do GenBank (continuação)

Número de Acesso	País	Ano de Isolamento	Genótipo
AF425616	Colômbia	1985	V
GQ868498	México	2006	V
DQ285559	Reunion	2004	V
AF425639	Trinidad e Tobago	1986	V
EU081258	Singapura	2005	V
FJ639797	Venezuela	2004	V
FJ639743	Venezuela	1999	V

ANEXO E – Artigo do grupo de pesquisa do LaBMol publicado no periódico *Dengue Bulletin* (2013)

Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains

*Pablo Oscar Amézaga Acosta,^{a#} Joel da Silva Cordeiro,^a Fabiana Granja,^a
Thalita Caroline da Silva Siqueira,^a Francisco Eduardo Gomes Brito,^a
Aline Gondim de Freitas,^a Débora Dinelly de Sousa,^a Joel de Melo Lima,^b
George Allan Villarouco da Silva,^c Raphaela Honorato Barletta-Naveca,^d
Victor Costa de Souza,^c Vera Margarete Scarpassa^d & Felipe Gomes Naveca^c*

^aMolecular Biology Laboratory, Biodiversity Studies Center, Federal University of Roraima (UFRR),
2413 Ene Garcez Avenue, Campus de Paricarana, Bairro Aeroporto. Boa Vista, Roraima,
Brazil.