UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de
2010 a 2011

Adriana Moreira Soares

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de
2010 a 2011

Dissertação de mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientada: Adriana Moreira Soares

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06/06/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moreira Soares, Adriana

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011. Ribeirão Preto, 2014.

75p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

1. Dengue. 2. Epidemiologia. 3. Filogenia. 4. Evolução.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriana Moreira Soares

Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai Celso José Soares, minha mãe Aparecida Bordim Moreira Soares e ao meu irmão André Fernando Moreira Soares.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais que acreditaram e me permitiram viver esse sonho, sempre me apoiando e não me deixando desanimar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Victor Aquino Quintana que me aceitou, acreditou em mim e me orientou da melhor forma possível.

Ao meu colega de trabalho Alberto Anastacio Amarilla Ortiz pela paciência e dedicação por todos os ensinamentos e conselhos e a sua esposa Helda Liz com a ajuda e orientação.

Aos meus irmãos de coração Aníbal e Raquel que sempre estiveram do meu lado nos momentos mais difíceis e também, nos momentos mais felizes de descanso e divertimento.

Aos companheiros de laboratório do dia a dia: Aline, Amanda, Lélis, Jaseen, Vanessa, Veridiana, Telma, Nilton, Nicole, Gabriela, Sabrina e Fábio pelo companheirismo.

Ao meu irmão André que mesmo de longe sempre me apoiou.

Aos amigos Camélia, Rafael, Paula e Gustavo que me ajudaram a não desistir dos meus objetivos com sua amizade e companheirismo.

As amigas de Brasília Elisa, Manuela, Ariadne, Flávia e Bárbara que sempre me acompanharam e ajudaram mesmo distantes.

A agência de fomento FAPESP por ter financiado este projeto.

Aos professores, funcionários e alunos do Centro de Pesquisa em Virologia pela amizade e pelo uso da infraestrutura.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por ter fornecido toda a estrutura necessária para a realização deste projeto.

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss)*

RESUMO

SOARES, A. M. **Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011.** 2014. 75f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e transmitida principalmente pela picada de mosquitos *Aedes aegypti*. A dengue é a doença viral transmitida por artrópodes de maior importância em saúde pública, afetando principalmente a países tropicais e subtropicais do mundo. As epidemias de dengue têm aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo e as fronteiras de circulação do vírus vem se expandido constantemente. Assim, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre esta ameaça. Neste sentido, é importante que algumas análises, como as filogenéticas e evolutivas dos vírus sejam realizadas para identificação dos genótipos circulantes, a origem dos mesmos, o relacionamento com outros subtipos e a evolução sofrida ao longo do tempo. Este estudo teve por objetivo analisar o relacionamento filogenético e evolutivo dos DENV isolados em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. Amostras de soro (n=79) de pacientes com dengue estocadas a -80°C foram inoculadas em células C6/36 para tentativa de isolamento viral, o qual foi confirmado a partir de 39 amostras por imunofluorescência indireta e/ou RT-PCR em tempo real. Sequenciamento de parte do gene da proteína viral NS5 ou do gene da proteína E mostrou que 25 pertenciam ao DENV-1, seis ao DENV-2 e oito ao DENV-3. Para as análises filogenéticas e evolutivas, o gene da proteína E de 15 DENV-1, quatro DENV-2 e um DENV-3 foi sequenciado. Estas análises foram realizadas também utilizando toda a região codificadora de dois DENV-1, um DENV-2 e um DENV-3. As análises mostraram que todos os vírus introduzidos em Ribeirão Preto foram provenientes de vírus originados no Estado do Rio de Janeiro. Duas linhagens de DENV-1, uma de DENV-2 e uma de DENV-3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. O relacionamento filogenético dos vírus foi similar independentemente do uso da sequência do gene da proteína E ou de toda a região codificadora.

Palavras chave: Dengue, epidemiologia, filogenia, evolução, Ribeirão Preto.

ABSTRACT

SOARES, A. M. **Molecular characterization of dengue vírus isolated in Ribeirão Preto in 2010 and 2011.** 2014. 75f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Dengue is an infectious disease caused by dengue virus (DENV) and transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes. Dengue is the viral disease transmitted by arthropods of greater importance in public health, particularly affecting the tropical and subtropical countries of the world. Dengue epidemics have increased considerably in recent years throughout the world and the borders of virus circulation have been expanding constantly. Thus studies of different aspects of the disease and the virus are of great importance to improve knowledge about this threat. In this sense, it is important that some analyzes such as phylogeny and evolution be carried out to identify the circulating genotypes, their origin, their relationship with other subtypes and evolution along the time. This study aimed to analyze the phylogenetic and evolutionary relationships of DENV isolated in Ribeirão Preto between 2010 and 2011. Serum samples (n = 79) of dengue patients stored at -80°C were inoculated into C6/36 cells for virus isolation attempts, which was confirmed from 39 samples by indirect immunofluorescence and/or real-time RT-PCR. Sequencing of part of the viral NS5 gene protein or the E gene protein showed that 25 belonged to DENV-1, six to DENV-2 and eight to DENV-3. For the phylogenetic and evolutionary analyzes, the E gene protein of 15 DENV-1, four DENV-2 and one DENV-3 was sequenced. These analyzes were also carried out with the entire coding region of two DENV-1, one DENV-2 and one DENV-3. The analysis showed that all viruses were introduced in Ribeirão Preto from viruses originated in the state of Rio de Janeiro. Two lineages of DENV-1, one of DENV-2 and one of DENV-3 circulated between 2010 and 2011. The phylogenetic relationship of these viruses was similar regardless of the use of the E gene protein or the entire coding region sequences.

Keywords: Dengue, epidemiology, phylogeny, evolution, Ribeirão Preto.

RESUMEN

SOARES, A. M. **Caracterización molecular de los virus del dengue aislados en Ribeirao Preto entre 2010 y 2011.** 2014. 75f. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirao Preto – Universidad de San Pablo, Ribeirão Preto, 2014.

El dengue es una enfermedad infecciosa causada por el virus del dengue (DENV) y transmitida principalmente por la picada de mosquitos *Aedes aegypti*. El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en salud pública, afectando principalmente a países tropicales y subtropicales del mundo. Las epidemias de dengue han aumentado considerablemente en los últimos años en todo el mundo y las fronteras de circulación del virus se encuentran en constante expansión. De esta forma, estudios de diferentes aspectos de la enfermedad y del virus son de gran importancia para perfeccionar los conocimientos sobre esta amenaza. Por lo tanto, es importante que algunos análisis, como las filogenéticas e evolutivas del virus sean realizadas para identificación de los genotipos circulantes, el origen de los mismos, el relacionamiento con otros subtipos y la evolución sufrida a lo largo del tiempo. Este estudio tuvo por objetivo analizar el relacionamiento filogenético y evolutivo de los DENV aislados en Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. Muestras de suero (n=79) de pacientes con dengue almacenados a -80°C fueron inoculadas en células C6/36 para tentativa de aislamiento viral, el cual fue confirmado a partir de 39 muestras por inmunofluorescencia indirecta y/o RT-PCR en tiempo real. Secuenciación de parte del gen de la proteína viral NS5 o del gene de la proteína E mostró que 25 pertenecían al DENV-1, seis al DENV-2 e ocho al DENV-3. Para las análisis filogenéticas y evolutivas, el gen de la proteína E de 15 DENV-1, cuatro DENV-2 e un DENV-3 fue secuenciado. Estos análisis fueron realizadas también utilizando toda la región codificadora de dos DENV-1, un DENV-2 e un DENV-3. Los análisis mostraron que todos los virus introducidos en Ribeirão Preto fueron provenientes de virus originados en el Estado do Río de Janeiro. Dos linajes de DENV-1, un de DENV-2 y un de DENV-3 circularon en Ribeirao Preto entre 2010 e 2011. El relacionamiento filogenético de los virus fue similar independientemente del uso de la secuencia del gen de la proteína E o de toda la región codificadora.

Palabras clave: Dengue, epidemiología, filogenia, evolución, Ribeirão Preto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aedes aegypti</i> . Fonte: http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/9254/9254_lores.jpg	3
Figura 2. Estrutura esquemática da partícula viral. RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. Fonte: http://viralzone.expasy.org/	4
Figura 3. Genoma do vírus da dengue. Fonte: (22)	4
Figura 4. Ciclo de multiplicação viral. O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promovem mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no <i>lumen</i> do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (27).	6
Figura 5. Efeito citopático observado em células C6/36. A: monocamada de células C6/36 sem infecção. B: Efeito citopático observado na monocamada de células C6/36 pós-infecção.	17
Figura 6. Confirmação do isolamento em células C6/36 pelo método de imunofluorescência indireta. (A) Células não infectadas e (B) células infectadas com DENV de uma das amostras de soro dos pacientes.	18
Figura 7. Confirmação do isolamento das amostras por RT-PCR em tempo real. (A) Pico de melting da amostra negativa e (B) pico de melting da amostra positiva ($T_m \sim 80^\circ\text{C}$).	20
Figura 8. Exemplo de análise de identidade de uma das amostras analisadas com o software BLAST (http://www.ncbi.nlm.gov/blast).	22
Figura 9. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína NS5. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos de parte do gene da proteína NS5. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 6 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 7 se encontra o controle negativo.	31
Figura 10. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E utilizando os par de primers D1s3 e D1a17 para DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular, nas colunas 2 a 4 os produtos de amplificação dos vírus isolados das amostras 64, 65 e 66 e na coluna 5 o controle negativo.	32

Figura 11. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 10 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 11 se encontra o controle negativo.....	34
Figura 12. Alinhamento das sequências de DENV-1 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E.	34
Figura 13. Alinhamento das sequências de DENV-2 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E.	35
Figura 14. Alinhamento da sequências de DENV-3 isolada neste estudo com uma cepa isolada no Brasil de DENV-3 mostrando a posição 1 e 1479 do gene da proteína E.	35
Figura 15. Identidade entre sequências de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto.	36
Figura 16. Identidade entre as sequências de DENV-2 isoladas em Ribeirão Preto.	37
Figura 17. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma (G=1). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio. “●” isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto.....	39
Figura 18. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-2 em Ribeirão Preto (os quatro isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma (G=1). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio.	41
Figura 19. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma (G=1). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio.	43
Figura 20. Árvore filogenética dos vírus do genótipo V de DENV-1. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente.	45
Figura 21. Árvore filogenética dos vírus do genótipo IV de DENV-2. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente.	47

- Figura 22. Árvore filogenética dos vírus do genótipo III de DENV-3. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente49
- Figura 23. Representação das cinco regiões sobrepostas amplificadas para a montagem de todo o genoma viral de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, os primers utilizados para a amplificação e o tamanho dos fragmentos.51
- Figura 24. Análise da amplificação por RT-PCR do genoma completo de DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos cinco fragmentos sobrepostos do genoma completo de um dos isolados de DENV-1. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 5 os cinco fragmentos.51
- Figura 25. Identidade entre as sequências do genoma completo de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo V.52
- Figura 26. Identidade entre a sequência do genoma completo de DENV-2 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo IV.53
- Figura 27. Identidade entre a sequência do genoma completo de DENV-3 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo III.54
- Figura 28. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto (os dois isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio55
- Figura 29. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-2 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio.57
- Figura 30. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio.58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de soro dos pacientes com infecção pelo DENV.	15
Tabela 2. Primers que foram utilizados para a RT-PCR e sequenciamento do genoma dos vírus. Os primers sense estão indicados com a letra “S” no nome, e os primers antisense com a letra “A” ou com a letra “C” no nome.	21
Tabela 3. Quantidade de DNA necessária para sequenciamento de acordo com o tamanho do amplicon.	22
Tabela 4. Primers que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-1 e -2. Os primers sense estão indicados com a letra “s” no nome, e os primers antisense com a letra “a” no nome.....	24
Tabela 5. Primers que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-3. Os primers sense estão indicados com a letra “F” no nome, e os primers antisense com a letra “R” no nome (87).....	26
Tabela 6. Resultado da tentativa de isolamento viral das 79 amostras de soro inoculadas em células C6/36.	29
Tabela 7. Sorotipo dos 39 vírus isolados neste estudo.	33
Tabela 8. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo V de DENV-1	46
Tabela 9. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dentro dos cepas do genótipo IV de DENV-2.....	48
Tabela 10. Taxa de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo III de DENV-3.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMR	Ancestral comum mais recente
ADE	do inglês <i>Antibody-dependent enhancement</i>
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
RNA	Ácido Ribonucleico
col.	Colaboradores
DENV	Vírus da dengue
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DC	Células dendríticas
d.C.	Depois de Cristo
EUA	Estados Unidos da América
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FITC	do inglês Fluorescein Isotiocianate
hLRT	do inglês <i>hierarchical likelihood ratio test</i>
IFA	Imunofluorescência indireta
L-15	Meio de cultivo Leibovitz
M	Molar
μL	Microlitros
mM	Milimolar
ND	Não determinado
NJ	Do inglês <i>Neighbor-joining</i>
NS1	Proteína não estrutural 1
NS5	Proteína não estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	do inglês <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PCR	do inglês <i>Polimerase chain reaction</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNC	Região não codificadora
RT-PCR	del inglés <i>Reverse transcriptase polimerase chain reaction</i>
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
PFU	Unidades formadoras de placas
UTRs	Do inglês <i>Untranslated regions</i>
WHO	do inglês World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dengue.....	1
1.2 Breve histórico da doença.....	1
1.3 Vetor e ciclo de transmissão	2
1.4 Vírus da dengue – Características da partícula viral	4
1.5 Ciclo de replicação viral	5
1.6 Vírus da dengue – Sorotipos e Genótipos	6
1.7 Manifestações clínicas.....	8
1.8 Diagnóstico laboratorial da dengue	9
1.9 Prevenção e controle da doença	9
1.10 Epidemiologia da dengue	10
1.10.1 Situação da dengue no Brasil.....	10
1.10.2 Situação da dengue em Ribeirão Preto	12
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Soro de pacientes	15
4.2 Isolamento viral	17
4.3 Confirmação do isolamento viral	18
4.3.1 Imunofluorescência indireta (IFA)	18
4.3.2 RT-PCR em Tempo Real.....	18

4.3.2.1 Extração do RNA viral	18
4.3.2.2 RT-PCR em Tempo Real.....	19
4.4 Caracterização molecular	20
4.4.1 Síntese de cDNA	20
4.4.2 Identificação do sorotipo viral.....	20
4.4.3 Sequenciamento do gene da proteína E.....	23
4.4.4 Sequenciamento do genoma completo	23
4.5 Análises filogenéticas e evolutivas.....	27
4.5.1 Base de dados de sequências do <i>GenBank</i>	27
4.5.2 Análises filogenéticas	27
4.5.3 Análise de distância ou divergência evolutiva e de identidade	27
4.5.4 Taxa evolutiva e tempo de divergência	28
5 RESULTADOS	29
5.1 Isolamento viral a partir das amostras de soro	29
5.2 Caracterização dos vírus isolados.....	31
5.2.1 Identificação do sorotipo viral.....	31
5.2.2 Sequenciamento do gene da proteína E.....	34
5.2.3 Análise de identidade, filogenia e evolução dos vírus isolados baseados na sequência do gene da proteína E	35
5.2.3.1 Análise de identidade entre as sequências	35
5.2.3.2 Análises filogenéticas	38
5.2.3.3 Taxa evolutiva e tempo de divergência	44
5.2.4 Sequenciamento de toda região codificadora do genoma viral	50
5.2.5 Análises de identidade e filogenia baseadas na região codificadora do genoma viral	52
5.2.5.1 Análise de identidade	52
5.2.5.2 Análise filogenética	54
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES.....	64
8 REFERÊNCIAS	65
ANEXO.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV): DENV-1, -2, -3 e -4. Trata-se de uma entidade nosológica de notificação compulsória caracterizada por epidemias sazonais que em condições ambientais favoráveis pode apresentar comportamento endêmico com aumento sazonal como ocorre atualmente no Brasil. A infecção com o DENV pode ser assintomática ou levar a quadros clínicos que variam desde uma febre indeterminada e autolimitada, passando pela febre clássica da dengue (FD) até quadros graves da doença denominados febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). Em 2009, a Organização Mundial da Saúde propôs uma nova classificação dos casos de dengue, a qual agora é dividida em: dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave (1). Cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, sendo que aproximadamente 550.000 casos requerem hospitalização, com cerca de 3,64% de óbitos (1). Nas áreas tropicais das Américas houve uma dramática reemergência de epidemias de dengue, e a partir da década de 80 surgiram relatos das formas mais graves da doença. O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos, principalmente *Aedes aegypti*, porém, outros mosquitos como *A. albopictus* e *A. Africanus* têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente. O número de nações e pessoas afetadas tem aumentado progressivamente e hoje a dengue é considerada a arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo.

1.2 Breve histórico da doença

Os relatos mais antigos de uma doença possivelmente causada pelo vírus da dengue encontram-se em enciclopédias chinesas da dinastia Chin (265 a 420 d.C.) onde a doença é descrita como “veneno da água” e associada a insetos voadores, da dinastia Tang (610 d.C) época em que os escritos foram formalmente editados e da dinastia *Northern Sung* no ano 992 d.C (2). O vírus da dengue também pode ter sido o causador de surtos de doença febril aguda que ocorreram no século XVII em ilhas a oeste do oceano Pacífico e no Panamá, bem como das epidemias registradas em Jacarta, Indonésia e Egito no século XVIII, época em que a doença já apresentava uma distribuição global (3).

O DENV foi isolado pela primeira vez em 1943 por Susumo Hotta durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão (4), sendo a doença reconhecida como entidade clínica a partir de 1779 (5). A dengue é conhecida nas Américas desde o século XVIII, sendo que a primeira descrição de epidemia foi feita por BENJAMIM RUSH em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América (EUA). Pouco se sabia sobre a etiologia e transmissão da doença até o século XX. Um dos primeiros estudos realizados neste sentido foi conduzido por ASHBURN & CRAIG, oficiais das forças armadas dos EUA, em 1906 (6). Estes pesquisadores mostraram conclusivamente que a FD era causada por um agente filtrável, mostrando que protozoários e bactérias não estavam envolvidos. Alguns indivíduos imunes não se infectavam e a doença não era contagiosa. O marco da reemergência da dengue nas Américas foi a introdução do DENV-1 em 1977 e, já na década de 1980, países como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru, que não tinham experimentado a dengue ou estavam livres da doença durante várias décadas, foram afetados pela explosão de epidemias causadas pelo DENV-1. Cuba, em 1981, registrou a primeira maior epidemia de FHD nas Américas com um total de 344.203 casos notificados dos quais 10.312 foram classificados como graves. Houve 116.143 hospitalizações, 158 óbitos e custos que excederam a cifra dos US\$ 103 milhões (7). Esta epidemia de FHD cubana foi associada à introdução de um novo genótipo de DENV-2 mais virulento (REFERENCIA). O controle da epidemia foi alcançada pela erradicação do *A. aegypti* da ilha que se tornou livre da dengue até 1997, quando nova epidemia afetou a província de Santiago, onde foram notificados 2.946 casos dos quais 205 eram FHD com 12 mortes. A FHD em Cuba foi o evento histórico mais importante da dengue nas Américas. Entre os fatores que contribuíram para a emergência da FD/FHD, podem ser incluídos o rápido crescimento populacional e urbanização da América Latina e Caribe, o aumento do número de pessoas se deslocando geograficamente, facilitando a disseminação da virose, a circulação dos quatro sorotipos nas Américas, gerando um estado de hiperendemicidade aumentando o risco de FHD e a pouca eficiência dos programas de controle do vetor.

1.3 Vetor e ciclo de transmissão

Os mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes africanus*) desempenham um papel importante na transmissão do vírus da dengue. Embora o principal vetor seja o *A. aegypti* (Figura 1), o *A. albopictus* e *A. polynesiensis* também podem atuar como vetores, dependendo da localização geográfica (8-10).

Figura 1. *Aedes aegypti*. Fonte: http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/9254/9254_lores.jpg.

Os mosquitos transmissores podem ser encontrados em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. São encontrados no ambiente urbano e, principalmente, dentro das casas. Isso maximiza o contato homem-vetor e minimiza o contato com inseticidas pulverizados fora das casas, o que dificulta o controle deste vetor (11).

O mosquito se reproduz na água parada de pequenos reservatórios como pneus, vasos de plantas ou qualquer local onde acumule água. Os ovos podem sobreviver por longos períodos de tempo, uma vez que são capazes de resistir à dessecação. A disposição inadequada do lixo ou drenagem inadequada das águas residuais, consequências da urbanização não planejada, pode ser responsável por altas densidades do mosquito em áreas endêmicas (9).

Aumentos significativos nas populações de larvas do mosquito são vistos durante a estação chuvosa. Esta pode ser uma razão pela qual as epidemias de dengue tendem a coincidir com a época das chuvas (12).

Durante o repasto sanguíneo em um humano infectado, a fêmea adulta do mosquito ingere o sangue contaminado com vírus da dengue. Primeiro, o vírus replica-se no intestino médio, atinge a hemocele e a hemolinfa, e, em seguida, obtém acesso aos diferentes tecidos do inseto. Após a replicação viral nas glândulas salivares, o mosquito infectado pode transmitir o vírus para outro ser humano.

A transmissão sem envolvimento de vetor foi descrita em indivíduos de equipes de saúde que se acidentaram com materiais perfuro cortantes contaminados com sangue de pacientes doentes e em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (13). Também há relatos de transmissão da dengue em pacientes que receberam transfusão de sangue e hemoderivados contaminados com o vírus (14). A transmissão vertical do DENV em humanos tem sido relatado por vários grupos de estudo, inclusive no Brasil (15);(16);(17);(18).

1.4 Vírus da dengue – Características da partícula viral

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. São partículas virais esféricas, de 50 a 60 nm de diâmetro, constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica, no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície viral, E e M (Figura 2) (19).

Figura 2. Estrutura esquemática da partícula viral. RNA viral circundado por um nucleocapsídeo icosaédrico formado pela proteína C. O vírus apresenta um envelope derivado das células hospedeiras, no qual encontram-se ancoradas as proteínas E em dímeros e a proteína M. Fonte: <http://viralzone.expasy.org/>.

O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases (Figura 3). Este RNA possui a estrutura cap (m⁷G5'ppp5' A) no extremo 5', mas não contém cauda de poli A no extremo 3'. O RNA viral possui uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), flanqueada por regiões não codificadoras 5' e 3' (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (20, 21).

Figura 3. Genoma do vírus da dengue. Fonte: (22)

1.5 Ciclo de replicação viral

Devido a diferenças no meio intracelular e pela natureza não-lítica do ciclo dos *Flavivirus*, a entrada, a replicação e o envelopamento desses vírus pode diferir nas células de mosquitos em comparação às células de vertebrados (23-27). Poucos receptores que medeiam a interação dos flavivírus com a célula hospedeira têm sido descritos. Entretanto várias moléculas de superfície já foram propostas para a interação vírus-célula. Recentemente foi mostrado que DC-SIGN (lectina específica de manose), amplamente distribuídas na superfície de células dendríticas (DC), interage com os açúcares da proteína E. Esta interação seria o primeiro contato vírus-célula, a qual facilitaria a ligação da proteína E com o receptor celular ainda desconhecido (25, 26, 28, 29). Sabe-se também que resíduos da proteína E carregados positivamente poderiam interagir com o heparansulfato, que está amplamente distribuído em muitas linhagens celulares e consequentemente facilitaria a infecção da célula (30, 31).

O DENV penetra na célula hospedeira via endocitose mediada por receptores (Figura 4). O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E a receptores específicos presentes na membrana celular. Após a endocitose, os endossomos fundem-se com lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico, o que potencializa mudanças conformacionais na proteína E, aproximando o envelope viral à membrana do endossomo, resultando na fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e consequentemente, a dissociação do nucleocapsídeo e liberação do genoma no citoplasma (24, 25, 27). O RNA viral livre no citoplasma é reconhecido pela maquinaria de tradução celular, resultando na síntese de uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esse polipeptídeo sofre processamento co- e pós-transducional através de clivagens realizadas por proteases virais e do hospedeiro originando três proteínas virais estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas prM, E e NS1 são direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER), em cuja membrana permanecem ancoradas, enquanto que a proteína C e as outras proteínas não estruturais incluindo a NS1 são liberadas no citoplasma da célula (25). A replicase viral é montada a partir das proteínas NS3 e NS5, as quais atuam sobre o RNA viral provavelmente auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. O genoma viral é replicado por meio de um intermediário de uma cadeia negativa do RNA (ssRNA⁻), o qual serve como molde para a síntese de várias cópias de RNAs de fitas simples de cadeia positiva (ssRNA⁺). A montagem do *vírião* acontece em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A proteína C junto com o RNA formam o nucleocapsídeo, o

qual se liga à porção citoplasmática dos heterodímeros das glicoproteínas prM e E ancoradas na membrana bilipídica do retículo endoplasmático, resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do *lúmen* do retículo endoplasmático. Nesta fase as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas. Esses vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o Complexo de Golgi; onde, no ambiente de baixo pH da face trans do complexo, ocorre a clivagem por furinas da proteína prM em M (proteína de membrana) levando a maturação da partícula viral. A maturação promove um rearranjo no envelope viral com a liberação do peptídeo “pr” (86 aminoácidos), que é secretado no meio extracelular. Posteriormente, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela via exocítica.

Figura 4. Ciclo de multiplicação viral. O ciclo inicia com a adsorção do vírus à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular (A). Após entrada por endocitose (B), a acidificação das vesículas endossomais promovem mudanças conformacionais na proteína E o que contribui para o desnudamento da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (6.0). Em seguida o ssRNA(+) é transcrito em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e celulares (C) e ocorre a replicação do RNA viral (D). A montagem da progênie viral ocorre no *lumen* do RER (E), através do arranjo entre proteínas estruturais e fitas de RNA recém-sintetizadas. Os virions imaturos formados são transportados até o Complexo de Golgi (6.7) e são processados pela enzima furina da célula hospedeira (F), gerando partículas infecciosas maduras (5.7), as quais são liberadas por exocitose (G) (27).

1.6 Vírus da dengue – Sorotipos e Genótipos

Com base em testes sorológicos cruzados, os DENV foram classificados em quatro sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (32, 33). Estudos na década de 70 mostraram a existência de variação antigênica dentro dos DENV-3, onde as cepas de Porto Rico se mostraram antigenicamente diferentes às cepas da Ásia (34). Mais tarde, o método de “*RNA fingerprinting*” foi usado para identificação do sorotipo viral e para análises moleculares das variantes genéticas dentro de cada sorotipo (35, 36). Vários trabalhos como análises antigênicas, hibridação de cDNA-RNA e digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR, mostraram a existência de variantes genéticas dentro de cada sorotipo (37-39). Com o desenvolvimento da metodologia de sequenciamento dos ácidos nucleicos e os estudos de diversidade genética foi possível introduzir a classificação em grupos genômicos ou genótipos. Atualmente, são conhecidos diversos genótipos dentro de cada sorotipo viral. DENV-1 está constituído por cinco genótipos; o genótipo I está representado por vírus do Sudeste Asiático, China e Oriente Médio. O genótipo II inclui algumas cepas da Tailândia; o genótipo III está representado por cepas da Malásia; o genótipo IV inclui cepas do sudeste da Ásia, sul do Pacífico, Austrália e México; o genótipo V está representado por vírus das Américas, África e Ásia (40, 41). DENV-2 foi inicialmente classificado em cinco genótipos, mas estudos recentes indicaram a existência de um novo genótipo; assim os seis genótipos são denominados: Genótipo Asiático I (I), que é representado por cepas da Tailândia, Malásia, Camboja, Myanmar, Vietnam e Austrália; genótipo Asiático II (II), que inclui cepas da China, Indonésia, Filipinas, Taiwan, Sri Lanka, Índia, Honduras e México; genótipo Americano (III), representado por cepas da América Central e do Sul, do Caribe e de ilhas do pacífico; o genótipo Americano/Asiático (IV) representado por cepas do sudeste asiático, das Américas do sul e central e do Caribe, e o genótipo Cosmopolita (V) e Selvagens (VI), representado por cepas humanas, de mosquitos e de primatas não humanos do oeste da África e sudeste da Ásia (42) (40, 43, 44). DENV-3 foi classificado por Lanciotti (1994) em 4 subtipos ou genótipos (45). O genótipo I está representado por isolados de Indonésia, Malásia, Filipinas e algumas ilhas do Pacífico Sul; o genótipo II compreende vírus da Tailândia; o genótipo III está representado por isolados da Ásia, África e América; e o genótipo IV inclui vírus de Porto Rico e Tahiti. WITTKÉ et al (2002) sugeriram a existência de um quinto genótipo dentro do DENV-3 que inclui vírus das Filipinas e da China. Entretanto, estudo realizado por nosso grupo analisando o gene da proteína E mostrou que esse grupo de vírus, na realidade, pertence a uma linhagem diferente dentro do genótipo I (46). Um estudo recente realizado por Chen e colaboradores demonstrou que o DENV-4 inclui quatro genótipos (47, 48); o genótipo I está representado por

isolados das Filipinas, Tailândia, Sri Lanka, Vietnã, Myanmar, Malásia, Índia, Japão, China e algumas cepas isoladas no Brasil; o genótipo II inclui vírus da Indonésia, Malásia, Singapura, China, ilhas do oeste do oceano Pacífico, Austrália, as ilhas do Caribe (Porto Rico e República Dominicana), os países da América Central e América do Sul; genótipo III, representado por vírus isolados na Tailândia entre 1997 e 2001 e o genótipo IV que inclui cepas isoladas de macacos na Malásia durante a década de 70, sendo chamado de genótipo selvagem.

No Brasil, estudos filogenéticos de dengue têm demonstrado a presença de novos grupos de cepas (subtipos) dentro dos genótipos específicos de cada sorotipo (49) (50). Nos países endêmicos para a dengue em todo o mundo, tem ocorrido a substituição da prevalência de um sorotipo ou genótipo circulante. Estas substituições podem estar relacionadas ao surgimento de casos mais graves da doença (51-53).

Apesar da patogênese dos casos mais graves ser pouco compreendida, estudos de filogenia, evolução e virulência têm analisado a relação entre alguns genótipos específicos e a gravidade da doença (54). Além disso, também foi descrito que isolados de diferentes epidemias leves ou graves formaram grupos geneticamente distintos, sugerindo que a genética viral tem papel importante no desenvolvimento dos casos graves da dengue (51).

1.7 Manifestações clínicas

Na forma clássica da doença, os sintomas se iniciam 2 a 8 dias após a picada, quando surge febre alta que dura de 2 a 7 dias, calafrios, cefaléia intensa, dor retro-orbitária e astenia importante, além de dor musculoesquelética e abdominal intensas, fato que levou a doença a ser inicialmente conhecida como “febre quebra ossos”. Anorexia, náuseas e vômitos também são frequentes. Exantema generalizado, de caráter transitório e exibindo padrão macular ou mosqueado pode aparecer no primeiro ou segundo dia de evolução. Não se tem demonstrado que este exantema seja um fator de melhor ou pior prognóstico (7). A FHD/SCD caracteriza-se por aumento da permeabilidade capilar, alterações no número e função dos leucócitos, aumento do hematócrito, trombocitopenia e classifica-se em quatro graus de gravidade (I-IV). Os fenômenos de extravasamento do plasma, provocados por alterações na permeabilidade vascular, para as cavidades serosas do corpo podem resultar em choque hipovolêmico. Coincidindo com a defervescência entre o terceiro e o quinto dia ou logo após, pode aparecer exantema máculopapular ou morbiliforme difuso que se inicia no tronco. As demais manifestações clínicas são idênticas às da FD até o primeiro momento de defervescência, quando se podem notar sinais clínicos de hipoperfusão tecidual e trombocitopenia importante

acompanhada de petéquias disseminadas, equimoses espontâneas e sangramento das mucosas e dos sítios de punção venosa.

1.8 Diagnóstico laboratorial da dengue

O diagnóstico específico de infecções por DENV pode ser feito por isolamento viral a partir do sangue de pacientes até cinco dias após o início da febre. Linhagens celulares contínuas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284), *Aedes albopictus* (C6/36), e *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) são frequentemente utilizadas para isolamento do vírus (55). Após isolamento, os vírus devem ser identificados e sorotipados, comumente por imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos.

Para o diagnóstico rápido de infecções por dengue, tem sido utilizado a RT-PCR convencional ou em tempo real; (56); (57); (58); (59).

Recentemente, durante a fase aguda da doença, tem sido demonstrado que em amostras de soro pode ser detectada a proteína NS1. Esta glicoproteína não estrutural do vírus é altamente conservada e, durante a fase aguda da infecção, passa a ser expressa na superfície das células infectadas e também é secretada para a circulação sanguínea podendo ser detectada no sangue (60, 61). O diagnóstico sorológico é comumente feito por detecção de IgM específico por teste imunoenzimático de captura (Mac-ELISA). A IgM aparece logo depois de terminar a febre e começa a diminuir depois de 1 a 2 meses. Os métodos sorológicos clássicos podem, também, ser utilizados e dependem da demonstração do aumento em quatro ou mais vezes do título de anticorpos detectados por inibição da hemaglutinação (HAI), fixação de complemento (CF), ou neutralização (NT). Geralmente é difícil estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga. Devido à associação entre a infecção sequencial com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária. HAI é o método mais utilizado para distinguir entre infecção primária e secundária. Na infecção primária, os títulos séricos para DENV não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença. Na infecção secundária, os títulos séricos devem ser maiores ou iguais a 2500 (62).

1.9 Prevenção e controle da doença

A prevenção e o controle da dengue dependem de ações de combate do vetor, o *Aedes aegypti*, utilizando inseticidas e estratégias de conscientização comunitária para eliminação de

potenciais criadouros das larvas dos mosquitos. A monitorização do vetor é um papel decisivo no controle de epidemias, em que é possível identificar os aumentos da presença do vetor e os potenciais locais de reprodução, permitindo uma ação rápida para evitar ou reduzir a transmissão da doença. No entanto, até agora, o principal problema é a sustentabilidade, recomenda-se que a aplicação de estratégias integradas de controle, incluindo ferramentas para reduzir os índices larvários e o número de mosquitos adultos é complementado pela participação setorial e pela comunidade (63-66).

Atualmente, não existem medicamentos antivirais disponíveis contra o vírus, tampouco um tratamento específico para a doença. O desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o vírus é uma das prioridades de saúde pública de acordo com a Organização Mundial da Saúde. O desenvolvimento de uma vacina contra a dengue tem sido dificultado pela necessidade de desenvolver uma vacina contra os quatro sorotipos, a fim de evitar o fenómeno de ADE, pela falta de compreensão dos mecanismos de imunidade protetora contra o vírus, pela falta de um modelo animal para a avaliação de vacinas, etc. No entanto, um progresso significativo tem sido observado nos últimos anos na procura por uma vacina eficaz (67, 68).

Em 2010, o desenvolvimento da vacina contra a dengue alcançou um grande avanço com o primeiro ensaio clínico da fase III para investigar uma vacina tetravalente contra dengue, a CYD TD (Sanofi Pasteur), que é composta de quatro vacinas recombinantes de vírus vivo atenuado (CYD 1-4) com base na organização genômica da cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela. Por meio de manipulações genéticas, foram substituídos os genes prM e E do genoma do vírus da febre amarela pelos genes prM e E de cada um dos quatro sorotipos do DENV. Em 2011, foi relatado que ela foi administrada a mais de seis mil crianças e adultos de 15 países endêmicos e não endêmicos de dengue e não havia relatado problemas sobre sua segurança (Guy et al., 2011)

1.10 Epidemiologia da dengue

1.10.1 Situação da dengue no Brasil

A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente no Brasil ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4 (69) que ficou restrita a essa região. Em Março de 1986 o DENV-1 foi introduzido numa cidade vizinha ao Rio de Janeiro; no mesmo ano, o vírus chegou ao Rio de Janeiro, e foi o começo de uma epidemia explosiva com 95.000 casos notificados e aproximadamente 3 milhões de infectados (70, 71). Esta

epidemia chegou aos estados do nordeste e do centro-oeste do Brasil entre 1986 e 1987 (72, 73). Entre 1990 e 2002, foram notificados casos de DENV-1, praticamente, em todas as regiões do Brasil (73).

Em Abril de 1990, foi dado início à primeira epidemia de DENV-2 na cidade do Rio de Janeiro (74). Nesta epidemia foram notificados 17.000 casos com 2% destes apresentando DHF/SCD. Epidemias de DENV-2 têm sido notificadas em praticamente todas as regiões do Brasil (72).

A primeira epidemia de DENV-3 em Janeiro de 2001 ocorreu no Rio de Janeiro (75, 76). Este primeiro surto foi seguido de uma grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro, com 81327 casos de FD e 958 casos de DHF/SCD e 54 óbitos entre 1 de janeiro de 2001 a 22 de junho de 2002 (77). PASSOS et al (2004) analisando 362 casos de dengue no Rio de Janeiro durante a epidemia de 2001/2002, com isolamento viral confirmado laboratorialmente, observaram que a maioria (238 casos) pertencia ao sorotipo 3, sendo que os sorotipos 1 e 2 foram observados em 62 casos de cada. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que indivíduos infectados com o DENV-3 apresentaram sintomatologia mais grave, sugerindo maior virulência deste sorotipo. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade (78). Após a epidemia de 2001/2002 o DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (72). No período entre 2007 e 2009, ocorreu uma alteração no sorotipo predominante, com a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Essa alteração levou a ocorrência de epidemias em diversas unidades federadas do país, com um deslocamento de casos graves para menores de 15 anos. Em 2008 foi novamente re-introduzido o sorotipo DENV-1, passando a ser o sorotipo predominante nos estados de Roraima, Mato Grosso do Sul e Piauí (79). Já em 2010 foi possível observar uma co-circulação dos três sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (80). Em 2008, o DENV-4 foi isolado de três pacientes na cidade de Manaus, Amazonas, sugerindo que este vírus estaria circulando no país (81). A confirmação da circulação deste sorotipo ocorreu no mês de agosto de 2010, quando o Ministério da Saúde detectou este vírus em Roraima; nove casos em Boa Vista e um no Município de Cantá (80).

Na epidemia de 2013, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação dos quatro sorotipos sendo que o DENV-4 foi o de maior prevalência correspondendo a 52,6% das amostras analisadas até fevereiro de 2013. O boletim do governo apontou 204.650 casos, contra 70.489 do mesmo período do ano passado sendo que oito estados - Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Espírito Santo - concentram

173.072 notificações, que equivalem a 84,6% do total. Mesmo com expansão da notificação total da doença há tendência de queda no número de casos graves. Este menor número de casos graves e óbitos é resultado das medidas adotadas pelo Ministério da Saúde em conjunto com estados e municípios, como a organização da rede pública de atendimento, a melhoria da atenção básica, a capacitação dos profissionais e o reforço à vigilância em saúde.

1.10.2 Situação da dengue em Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, localizada na região Nordeste do Estado de São Paulo sofreu, de novembro de 1990 a março de 1991, uma epidemia de DENV-1 com aproximadamente 2.305 casos confirmados, o que representou uma incidência de 546,9 casos por 100.000 habitantes (82). Desde então, a incidência continuou se mantendo em índices baixos. Em 2001, o município viveu uma nova epidemia com 3190 notificações de casos com prevalência dos sorotipos 1 e 2. Após introdução do DENV-3 no Rio de Janeiro, este vírus se espalhou por diversas cidades do Brasil chegando inclusive em Ribeirão Preto e sendo o sorotipo que prevaleceu na epidemia de 2006, quando 5997 casos foram notificados sendo 15 com dengue hemorrágica e um óbito. Entre 2007 e 2009 observou-se uma diminuição no número de casos, porém uma nova epidemia ocorreu na cidade em 2010, com 29.949 casos notificados e 9 mortes, sendo assim considerada a maior epidemia observada na cidade. Nesta última epidemia foi detectado com maior prevalência o DENV-1, mas os DENV-2 e -3 também foram detectados (80, 83). Em 2011, foram notificados 23.384 casos, com circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (83).

Em 2012, o número de casos diminuiu consideravelmente, com notificação de 310 e circulação predominante de DENV-1 (84). Já em 2013, como era esperado, ocorreu a introdução do DENV-4. De Janeiro de 2013 até Novembro de 2013 foram notificados 13.390 casos, sendo o DENV-4 o sorotipo circulante predominante em Ribeirão Preto (84).

2 JUSTIFICATIVA

As epidemias de dengue têm aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo e as fronteiras de circulação do vírus vem se expandido constantemente. Assim, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre a enfermidade. Neste sentido, é importante que algumas análises, como as filogenéticas e evolutivas dos vírus sejam realizadas para identificação dos genótipos circulantes, a origem dos mesmos, o relacionamento com outros subtipos e a evolução sofrida ao longo do tempo. Considerando que Ribeirão Preto se tornou uma cidade endêmica para esta doença, é de grande importância o monitoramento dos vírus circulantes, permitindo assim a identificação de novos sorotipos predominantes ou de novos subtipos que poderiam estar relacionados com os casos mais graves da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente os vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011.

3.2 Objetivos específicos

- Sequenciar o gene da proteína E dos genomas virais;
- Realizar as análises filogenéticas e evolutivas com base no gene da proteína E;
- Caracterizar todo o genoma de vírus representativos de diferentes grupos filogenéticos por sequenciamento nucleotídico;
- Realizar as análises filogenéticas com base na região codificadora do genoma viral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Soro de pacientes

Neste estudo, 79 amostras de soro de pacientes com infecção pelo DENV confirmada por RT-PCR em tempo real, obtidas entre 2010 e 2011 (Tabela 1) que se encontravam estocadas a -80° C, foram incluídas.

Tabela 1. Amostras de soro dos pacientes com infecção pelo DENV.

Amostra de soro	Data da Coleta	Sorotipo
1	01/03/2010	ND
2	11/03/2010	ND
3	16/03/2010	ND
4	30/03/2010	DENV-2
5	30/03/2010	DENV-3
6	31/03/2010	ND
7	07/04/2010	ND
8	13/04/2010	ND
9	14/04/2010	ND
10	15/04/2010	DENV-2
11	16/04/2010	ND
12	21/04/2010	ND
13	26/04/2010	ND
14	26/04/2010	DENV-3
15	27/04/2010	DENV-1
16	29/04/2010	DENV-3
17	30/04/2010	DENV-3
18	30/04/2010	DENV-1
19	02/05/2010	ND
20	05/05/2010	ND
21	05/05/2010	ND
22	06/05/2010	DENV-3
23	07/05/2010	DENV-3
24	09/05/2010	ND
25	10/05/2010	ND
26	10/05/2010	ND
27	11/05/2010	DENV-2
28	14/05/2010	DENV-1
29	14/05/2010	DENV-3
30	14/05/2010	DENV-3
31	18/05/2010	ND
32	19/05/2010	ND

Amostra de soro	Data da Coleta	Sorotipo
33	20/05/2010	ND
34	21/05/2010	ND
35	17/01/2011	DENV-1
36	03/02/2011	DENV-1
37	04/02/2011	DENV-1
38	08/02/2011	DENV-1
39	08/02/2011	DENV-3
40	08/02/2011	ND
41	09/02/2011	DENV-1
42	11/02/2011	DENV-1
43	11/02/2011	DENV-1
44	17/02/2011	ND
45	22/02/2011	DENV-1
46	26/02/2011	DENV-1
47	26/02/2011	DENV-1
48	26/02/2011	DENV-1
49	26/02/2011	DENV-1
50	10/03/2011	DENV-1
51	10/03/2011	DENV-1
52	10/03/2011	DENV-1
53	10/03/2011	DENV-1
54	17/03/2011	ND
55	17/03/2011	ND
56	17/03/2011	ND
57	17/03/2011	ND
58	21/03/2011	DENV-1
59	25/03/2011	ND
60	28/03/2011	ND
61	04/04/2011	ND
62	04/04/2011	ND
63	04/04/2011	DENV-1
64	05/04/2011	ND
65	12/04/2011	ND
66	12/04/2011	ND
67	13/04/2011	ND
68	14/04/2011	ND
69	15/04/2011	ND
70	18/04/2011	ND
71	18/04/2011	ND
72	19/04/2011	ND
73	18/04/2011	DENV-3
74	23/05/2011	ND
75	26/05/2011	DENV-2
76	27/05/2011	ND

Amostra de soro	Data da Coleta	Sorotipo
77	27/05/2011	ND
78	01/06/2011	DENV-2
79	29/08/2011	ND

ND: Não determinado

4.2 Isolamento viral

Células de *Aedes albopictus* clone C6/36 foram utilizadas para realizar o isolamento viral. Estas células foram crescidas em um frasco de 12,5 cm² contendo meio L15 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Para isso, foram incubadas a 28°C por 24 horas para formação da monocamada celular, a qual foi inoculada com 10 µl de soro de pacientes. As células foram incubadas novamente a 28°C durante uma hora, com agitação moderada de 15 em 15 minutos. Posteriormente, 2,5 ml de meio L15 (Cultilab, Brasil) suplementado com 2% SFB foram adicionados e as células foram mantidas em estufa por sete dias. O sobrenadante foi colhido, aliquoteado e estocado a -80°C. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizado para realização de uma reinoculação das células, ou seja, o vírus foi passado pela segunda vez em cultura celular. Finalmente, após terceira passagem, as células foram incubadas até aparecimento do efeito citopático ou por até sete dias (Figura 5).

Figura 5. Efeito citopático observado em células C6/36. A: monocamada de células C6/36 sem infecção. B: Efeito citopático observado na monocamada de células C6/36 pós- infecção.

Alguns vírus foram passados até quatro vezes para aumentar a carga viral. Posteriormente, o fluido da cultura celular foi transferido para um tubo de 15 ml e centrifugado a 850g por 5 minutos; o sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -80°C com 20% de soro fetal bovino (SFB).

4.3 Confirmação do isolamento viral

4.3.1 Imunofluorescência indireta (IFA)

Para realização do teste de IFA, células inoculadas com soro de pacientes e células controles, infectadas e não infectadas, após o sétimo dia da infecção foram fixadas sobre lâminas utilizando acetona gelada 100%, por 15 minutos, seguidamente as células fixadas, foram incubadas com 20µl de anticorpos primários (diluição de 1/1000) por 30 minutos a 37°C e posteriormente foram lavadas 3 vezes com PBS 1x. O anticorpo primário utilizado é um anticorpo monoclonal anti-proteína E do vírus (Genway, EUA). As células foram incubadas com 20µl do anticorpo secundário (anti - IgG de camundongo produzidos em coelho, diluição 1/256), conjugado com FITC (Sigma, EUA) por 1 hora a 37°C, e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS 1x. O anticorpo primário foi diluído em uma solução contendo um tampão de bloqueio (3% de SFB diluídas em PBS 1x) e o anticorpo secundário foi diluído numa solução contendo Azul de Evans (1/20.000, diluídos em tampão de bloqueio). Finalmente, as lâminas foram cobertas com glicerina tamponada e lamínula para serem visualizadas ao microscópio de imunofluorescência (Figura 6).

Figura 6. Confirmação do isolamento em células C6/36 pelo método de imunofluorescência indireta. (A) Células não infectadas e (B) células infectadas com DENV de uma das amostras de soro dos pacientes.

4.3.2 RT-PCR em Tempo Real

4.3.2.1 Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 200 µl do sobrenadante da cultura de C6/36 utilizando o kit Axyprep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep (Axygen, EUA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA viral foi suspenso em 60 µl do tampão de eluição.

4.3.2.2 RT-PCR em Tempo Real

A confirmação do isolamento utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real foi realizada como descrito anteriormente (58). Foram utilizados *primers* que amplificam a região não codificante do genoma 5'UTR, que é altamente conservada nos quatro sorotipos da dengue, descritos por Aquino e colaboradores (85). A reação foi realizada com o Kit Super Script III (Invitrogen), cuja mistura foi constituída de: 12,5µl 2X SYBR green, 0,5µl SuperScript™ III RT/Platinum *Taq* Mix, 11µl de RNA, 0,5µL dos *primers* RNC5-S (5'-AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA-3') e RNC5-C (5'-CGCGTTTCAGCATATTGAAAG-3') para um volume final de 25µl. A amplificação foi realizada utilizando o aparelho *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 50°C por 20 minutos, seguida de uma incubação a 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 30 segundos. Finalmente, uma curva de dissociação foi construída incubando os produtos amplificados de 60 a 95 ° C com um aumento de 0.2 ° C / segundo para determinar a especificidade da reação. As temperaturas de dissociação (*melting*, *T_m*) para os produtos de amplificação específicos para os controles virais dos quatro sorotipos de DENV foram encontradas na gama de 78,9 - 80,8 ° C, enquanto o valor de *T_m* para os dímeros de *primers* foi mais baixo, estando no intervalo de 72,2 - 73,9 ° C. (Figura 7). Para a quantificação viral, foi construída uma curva padrão a partir das diluições do RNA obtido do sobrenadante da cultura de células C6/36 infectadas com a cepa controle DEN-2 NGC contendo 5,75 x10⁶ PFU / ml. A curva foi obtida de acordo com o gráfico que apresentou os valores de *C_t*, do inglês "*threshold cycle*", no eixo horizontal e o logaritmo da concentração (PFU / mL) no eixo das ordenadas. O valor do *C_t* é definido como o número de ciclos de PCR necessários para o genoma viral ser detectado por fluorescência correspondente à uma amostra com intensidade suficiente para atingir o limite pré-determinado referido como "*threshold*". O valor *C_t* é inversamente proporcional à concentração ou quantidade de cópias iniciais na amostra.

Figura 7. Confirmação do isolamento das amostras por RT-PCR em tempo real. (A) Pico de melting da amostra negativa e (B) pico de melting da amostra positiva ($T_m \sim 80^\circ\text{C}$).

4.4 Caracterização molecular

4.4.1 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, primeiramente o RNA viral é extraído do sobrenadante da cultura celular infectada. Posteriormente, é realizada a reação contendo, num volume total de 40 μl , 23 μl de RNA purificado, 200 ng de *random primers*, 0,25 mM de dNTP e 200 U da transcriptase reversa M-MLV (USA). A mistura foi incubada a 25 $^\circ\text{C}$ por 10 min, seguida de uma incubação a 37 $^\circ\text{C}$, por 4 horas, para ter uma quantidade suficiente de cDNA. O RNA foi degradado usando 40 U de RNaseOUT (Invitrogen).

4.4.2 Identificação do sorotipo viral

Neste trabalho, das 79 amostras positivas, 15 apresentavam o sorotipo desconhecido. Estas amostras já haviam sido utilizadas em outros projetos do nosso laboratório e, em um destes projetos, em algumas delas o sorotipo já havia sido identificado. O sorotipo de 15 dos vírus isolados que ainda não haviam sido identificados no soro do paciente (Pacientes ND da Tabela 1), foram determinados por amplificação por RT-PCR convencional e posterior

sequenciamento de aproximadamente 950 pb de parte do gene da proteína NS5, uma região conservada no genoma viral aos quatro sorotipos da dengue e, o sorotipo de outros três vírus isolados cuja reação de amplificação de parte do gene da proteína NS5 não foi bem sucedida, foram determinados por sequenciamento do gene da proteína E, que apresenta o tamanho de aproximadamente 1485 pb. A reação de amplificação por RT-PCR foi realizada num volume de 50 µl contendo 4 µl de cDNA; 200 µM de dNTP; 0,3 µM de diversas combinações dos *primers sense* e *antisense* indicados na Tabela 2; 2,5 U de Taq Plantinum HIFI DNA polimerase juntamente com 5 µl do seu tampão 10X (Eppendorf, EUA). A amplificação foi realizada em um termociclador (Bio-rad, EUA), como segue: 45 ciclos a 94°C, 30 segundos; 53°C (temperatura de anelamento para o par de primers sFG1 e cFG2 e ES(D3) e EC(D3)) ou 55°C (temperatura de anelamento para o par de primers D1s3 e D1A17 e EC(D2)B e ES(D2)B; 45 segundos e 68°C, 5 min, seguida de uma extensão final a 68°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,8% e visualizados à luz UV após coloração com *GelRed* (Biotium, EUA).

Tabela 2. Primers que foram utilizados para a RT-PCR e sequenciamento do genoma dos vírus. Os primers sense estão indicados com a letra “S” no nome, e os primers antisense com a letra “A” ou com a letra “C” no nome.

Região amplificada	Primers	5' - 3'	Sorotipo	Amplicon
NS5	sFG1*	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	Todos	950 pb
	cFG2*	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	Todos	
Proteína E	D1s3**	AAACGTTCCGTSGCACTGGC	DENV-1	1855 pb
	D1a18**	AAAGGTGGYTCYGYTCAAT	DENV-1	
	D1a17**	CCAATGGCYGCTGAYAGTCT	DENV-1	
	ES(D2)B	GGCATAACCATAGGAACGAC	DENV-2	1750 pb
	EC(D2)B	AGGGGATTCTGGT TGGAACCTT	DENV-2	
	D2a19**	GGCGRCTAAGACATRTCTTTT	DENV-2	
	ES(D3)***	CCGCACACTCCATTCTCCCAA	DENV-3	1735 pb
	EC(D3)***	CCGCACACTCCATTCTCCCAA	DENV-3	

*(56), **(86), *** (87).

Os produtos de amplificação das amostras foram purificados do gel de agarose a 1,8% e quantificados utilizando uma plataforma de eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, EUA). A tabela 3 demonstra a quantidade de DNA viral necessária para a realização do sequenciamento nucleotídico de acordo com o tamanho do *amplicon*.

Tabela 3. Quantidade de DNA necessária para sequenciamento de acordo com o tamanho do *amplicon*.

Tamanho do <i>amplicon</i>	Quantidade de DNA
100-200 pb	1-3 ng
200-500 pb	3-10 ng
500-1000 pb	5-20 ng
1000-2000 pb	10-40 ng
>2000 pb	20-50 ng

Os produtos das quinze amostras foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico. A reação de sequenciamento foi realizada com o ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, EUA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Essa reação foi resolvida no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer® 8-capillary (Applied Biosystems) no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As sequências foram analisadas e editadas utilizando os programas Bioedit e Mega 5.05 e posteriormente foram analisadas no programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>) para identificação da similaridade das sequencias analisadas com sequências disponíveis no GenBank (Figura 8).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2490/2008, complete genome	1555	1555	100%	0.0	99%	GU131863.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2395/2006, complete genome	1550	1550	100%	0.0	99%	FJ850087.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2381/2002, complete genome	1539	1539	100%	0.0	99%	FJ850075.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/NG/01-V2937/1985, complete genome	1533	1533	100%	0.0	99%	GQ868601.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2375/2000, complete genome	1533	1533	100%	0.0	99%	FJ850071.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2374/2000, complete genome	1533	1533	100%	0.0	99%	FJ850070.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2389/2004, complete genome	1522	1522	100%	0.0	99%	FJ850081.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2384/2003, complete genome	1522	1522	100%	0.0	99%	FJ850077.1
Dengue virus 1 isolate DENV-1/BR/01-V2388/2007, complete genome	1506	1506	100%	0.0	98%	FJ850090.1

Figura 8. Exemplo de análise de identidade de uma das amostras analisadas com o software *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>).

4.4.3 Sequenciamento do gene da proteína E

A proteína E é o principal componente da superfície viral. Acredita-se que esta proteína tem papel importante na indução de anticorpos neutralizantes específicos. Como a região do gene da proteína E apresenta grande variabilidade nucleotídica, primeiramente as análises filogenéticas e evolutivas foram realizadas com base nas sequências deste gene e, em seguida, algumas destas sequências foram selecionadas para sequenciamento do genoma completo. As sequências do gene da proteína E de alguns dos vírus com sorotipo identificado foram submetidas a sequenciamento nucleotídico (Pacientes da tabela 1). Para tal, este gene foi amplificado por RT-PCR utilizando o par de *primers* D1s3 e D1a17 (Tabela 2) para as amostras de DENV-1, o par de *primers* ES(D2)B e EC(D2)B (Tabela 2) para as amostras de DENV-2 e o par de *primers* ES(D3) e EC(D3) (Tabela 2) para a amostra de DENV-3 para amplificação de fragmentos de 1855 pb, 1800 pb e 1735 pb respectivamente. A reação foi realizada num volume de 50 µl contendo 4 µl de cDNA; 200 µM de dNTP; 0,3 µM de diversas combinações dos *primers sense* e *antisense* indicados na Tabela 3; 2,5 U de Taq Plantinum HIFI DNA polimerase juntamente com 5 µl do seu tampão 10X (Eppendorf, EUA). A amplificação foi realizada em um termociclador (Bio-rad, EUA), como segue: 45 ciclos a 94°C, 30 segundos; 53 ou 55 °C, 45 segundos e 68°C, 5 min, seguida de uma extensão final a 68°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,8% e visualizados à luz UV após coloração com GelRed (Biotium, EUA). Os produtos de amplificação foram analisados e quantificados utilizando a plataforma de eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer. Agilent Technologies, EUA).

4.4.4 Sequenciamento do genoma completo

Em nosso laboratório, já possuímos todos os *primers* necessários para a amplificação e sequenciamento do genoma completo de DENV-3. Para amplificação e sequenciamento de todo o genoma de DENV-1 e DENV-2, foram desenhados *primers*, na sua maioria, degenerados. Para a seleção dos *primers*, todas as sequências disponíveis destes dois sorotipos foram obtidas do GenBank e alinhadas utilizando o programa CLC Main Workbench 6.6. Os *primers* foram desenhados manualmente baseados no alinhamento destas sequências.

Após realizadas as análises filogenéticas e evolutivas dos vírus baseadas na sequência do gene da proteína E, foram selecionados vírus representativos de diferentes grupos filogenéticos para sequenciar completamente o genoma viral. Para tal, o genoma completo

desses vírus foi amplificado por RT-PCR. A reação foi realizada num volume de 50 µl contendo 4 µl de cDNA; 200 µM de dNTP; 0,3 µM de diversas combinações dos *primers sense* e *antisense* (Tabelas 4 e 5); 2,5 U da enzima DNA polimerase de alta fidelidade Taq Plantinum juntamente com 5 µl do seu tampão 10X (Eppendorf, EUA). A amplificação foi realizada em cicladador térmico (Bio-rad, EUA), como segue: 45 ciclos a 94°C, 30 segundos; 58 °C, 45 segundos e 68°C, 5 minutos, seguida de uma extensão final a 68°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,8% e visualizados à luz UV após coloração com GelRed (Biotium, EUA). Os produtos de amplificação foram analisados e quantificados utilizando a plataforma de eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer. Agilent Technologies, EUA).

Tabela 4. *Primers* que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-1 e -2. Os *primers sense* estão indicados com a letra “s” no nome, e os *primers antisense* com a letra “a” no nome.

Primers	Sequência 5´- 3´	Sorotipo
D1/568-588-S	GGG AGA GTT DTG TGA GGA CAC	DENV-1
D1/1694-1674-A	CTA CTT CCT GYT TCT TTG CAT	DENV-1
D1/1609-1629-S	RGG RGC TTC AAC ATC HCA RGA	DENV-1
D1/2709-2689-A	CRT CTC CTA CRA CCA CTG TGA	DENV-1
D1/2622-2642-S	GAG AAY ATC ATG TGG AAG CAA	DENV-1
D1/3742-3721-A	GGT CTC RTT TTG AAA GTD GCC A	DENV-1
D1/3621-3640-S	ATG GGR CAA HTG ACA TGG AA	DENV-1
D1/4730-4711-A	CTC TTC CCT TGR TAC ATD AG	DENV-1
D1/4632-4652-S	GGG TAG GTC CCA RGT RGG RGT	DENV-1
D1/5686-5666-A	CCC GYT TYC CRT TCT TTC TTA	DENV-1
D1/5560-5582-S	CCT GAR AGA TCA TGG AAC TCA GG	DENV-1
D1/6651-6632-A	GCC VAT RGA TGT TTT CCC TA	DENV-1
D1/6492-6512-S	GCA YAA BTC CGA ACA AGG AGG	DENV-1
D1/7559-7539-A	GCC AGA CCT GCT CCT GCT ARA	DENV-1
D1/7466-7486-S	GGG AGG GAT CTC CAG GAA AAT	DENV-1
D1/8509-8489-A	GGC CCA TGT TTT RTA TGG ATT	DENV-1
D1/8390-8411-S	GTG GCA GTG GAA CCD GAG RTA G	DENV-1

Primers	Sequência 5' - 3'	Sorotipo
D1/9478-9459-A	CCY TCA GAY TCC ATY TGT CT	DENV-1
D1/9357-9377-S	GGA ACC GTG ATG GAT GTY ATA	DENV-1
D1/10411-10391-A	CGG GGC TCA CAG GCA GCA TAG	DENV-1
D1/10283-10303-S	AHC CYG AAG GGD CAC TCT GGT	DENV-1
D2/385-404-S	CTG TDC AAC AGY TGA CAA AG	DENV-2
D2/1487-1467-A	GCC TCC YTT TCC AAA YAR TCC	DENV-2
D2/1372-1392-S	GCC CAA CAC AAG GDG AAC CCA	DENV-2
D2/2491-2472-A	GCA GCN CCR TAG ATT GCT CC	DENV-2
D2/2387-2407-S	GGC CAT YTT RGG YGA CAC AGC	DENV-2
D2/3442-3423-A	TGC CAD GGT CCT GCY RTT TG	DENV-2
D2/3304-3324-S	GCC ACT GGC CAA AGT CAC ACA	DENV-2
D2/4455-4434-A	GYC CTC CAG CCA CTA RTG GDC C	DENV-2
D2/4290-4309-S	GGY CTY AAC CCA ACA GCY AT	DENV-2
D2/5353-5334-A	GCY GGR AGG TAT TTY TTY GT	DENV-2
D2/5206-5226-S	GGA GTG GAR CAT AYG TRA GTG	DENV-2
D2/6307-6287-A	CGA TAT TCV CCR TCD ATG GCA	DENV-2
D2/6180-6200-S	GAT GAA GAC TGT GCN CAY TGG	DENV-2
D2/7304-7283-A	GTC CAT YTT TGA CAA TGG CCA T	DENV-2
D2/7186-7206-S	CAC CAA TGY TGA GAC AYA GCA	DENV-2
D2/8277-8257-A	GRA CTC TVA GTG TYC GTC CNG	DENV-2
D2/8100-8120-S	GGA GGA CCA GGA CAY GAA GAA	DENV-2
D2/9222-9202-A	GCC ACA TGT ACC ATA TGG CTC	DENV-2
D2/9082-9102-S	GGG RGC TGR TTG ACA RGG AAA	DENV-2
D2/10163-10183-A	GCG TGT ATR GAC CAG GTT GTY	DENV-2
D2/10049-10069-S	GGG RAA GTC HTA CGC CCA AAT	DENV-2

Tabela 5. Primers que foram utilizados para a PCR e sequenciamento de genoma dos vírus DENV-3. Os primers sense estão indicados com a letra “F” no nome, e os primers antisense com a letra “R” no nome (87).

Nome da Sequência	Sequência 5' - 3'	Sorotipo
RNC5'-S/F	AGTT GTT AGT CTA CGT GGA CCG A	DENV-3
ECD3/R	CCG CAC ACT CCA TTC TCC CAA	DENV-3
NS1S/F	GGG GTG TGT CAT AAA CTG GAA A	DENV-3
NS1CD3/R	ACG CCC ATC CCC ATT CTG TC	DENV-3
D3_3385S/F	GGG AGA AGA CGG TTG CTG GTA TGG C	DENV-3
D3_5880C/R	GCC AAC TCT CCC TCT CCT TTG CG	DENV-3
D3_5730S/F	GGG ACT TCG TGG TGA CAA CTG ACA T	DENV-3
D3_6734C/R	GGG GGG TTC TCT GCT TTT CTG GTT C	DENV-3
D3_6591S/F	CAG GTA AAG GGA TTG GAA AGA CT	DENV-3
D3_8198C/R	CAG TAC ATT TCG TGC GTG GAG TT	DENV-3
D3_8150S/F	CTA CAA AGG AAA CAT GGA GGA AT	DENV-3
RNC3-C/R	AGA ACC TGT TGA TTC AAC AGC ACC	DENV-3
D3_430-452/F	ACT TGC TTT CCA CTT GAC TTC AC	DENV-3
ESD3/F	CCG CAC ACT CCA TTC TCC CAA	DENV-3
ESD3P1/F	GAG GAG CAG GAC CAG AAC TAC G	DENV-3
ECD3P1/R	ACA CCA CCC ACT GAT CCA AA	DENV-3
D3_3864-3888/R	GGC TCT TAA ACT GAT AAC ACA AT	DENV-3
D3_4772-4496/R	CTC CTC CCC CTT TTG CCA TTG TGC	DENV-3
D3_4535-4558/F	CCC AGC CCC CCA GAG ACA CAG AAA	DENV-3
D3_5308/F	GGG ACT TCG TGG TGA CAA CTG ACA T	DENV-3
D3_5378-5400/R	GCT ATA CTG GCT GGG TCT GTG AA	DENV-3
D3_7551-7574/F	GAA CAG GAA AAA GAG GAA CAG GC	DENV-3
D3_6781-6804/F	CGT GAT AGG CAT ACT TAC ATT GG	DENV-3
D3_7672-7696/R	CCC TTT TGG CTT CTG TTC TAT CC	DENV-3
D3_9518-9540/R	CCA TTC TTT TTA ACC TCT CCA C	DENV-3
D3_8304-8327/F	GAA GAC CCA CCA TTG AGA AAG AT	DENV-3
D3_8889 -8914/F	CTG GGC AAG TGT GGA AGC TGT GT	DENV-3
D3_9795-9818/F	CGG GAT GGA GCC TTA GAG AAA CC	DENV-3
RNC3D3P1/R	GCC TGA CTT CTT CTT TA	DENV-3

4.5 Análises filogenéticas e evolutivas

4.5.1 Base de dados de sequências do *GenBank*

Para realizar as análises filogenéticas, foi criada uma base de dados contendo sequências do gene da proteína E e do genoma completo de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 correspondentes a isolados de diferentes países, as quais foram baixadas da página da internet *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* que possui a base de dados de sequências, o *GenBank*. As sequências idênticas, mutantes, clones e vetores foram excluídas. O banco de dados contém as seguintes informações: código de acesso ao *GenBank*, nome da cepa, país e ano de isolamento. Para cada cepa isolada neste trabalho, foi criado um código contendo o sorotipo, país, cidade e ano de isolamento.

4.5.2 Análises filogenéticas

Para construir as árvores filogenéticas foram utilizados dois métodos: o método de distancias Neighbor-Joining (NJ) e o método de inferências Bayesianas (IB). Para a realização do método de Neighbor-Joining (NJ), primeiramente as sequências foram analisadas usando o programa JModeltest 3.7. macX, para identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos (88). Uma vez selecionado o modelo de substituição, as análises filogenéticas foram realizadas usando o método de NJ disponível no programa PAUP* 4.0 b10 – MEGA (89). Todas as análises filogenéticas foram estatisticamente sustentadas pelo método de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas. Para a realização do método de IB, primeiramente as sequências foram analisadas usando o programa MrModeltest2.3 para a versão Mac OS X 10.4.11 para identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos (90). As inferências bayesianas foram realizadas utilizando o programa MrBayes 3.1.2, baseadas no critério AIC e foram realizadas cinco corridas de 4 cadeias cada uma, gerando um total de 1.5×10^6 gerações, (excluindo primeiras 275 mil árvores de cada corrida) (91). Todas as análises filogenéticas foram estatisticamente sustentadas calculando a probabilidade a posteriori ou valores de credibilidade dos clados expressos em porcentagem.

4.5.3 Análise de distância ou divergência evolutiva e de identidade

Para determinar as distâncias genéticas entre populações, primeiramente foram construídas árvores filogenéticas com base na sequência do gene da proteína E e de todo o

genoma para identificação dos diferentes grupos genéticos. Posteriormente, a sequência dos vírus de cada genótipo foi analisada no programa DAMBE 5.2.6 para excluir as idênticas (92). Seguidamente, o número de substituições de nucleotídeos entre as sequências dos grupos foi calculado usando como modelo de substituição aquele descrito por TAMURA & NEI (1993) com correção gamma ($G=1.2$). Todas as análises de distância foram estatisticamente sustentadas pelo método de *bootstrap* usando 1000 réplicas usando o programa MEGA 5 (93).

4.5.4 Taxa evolutiva e tempo de divergência

A taxa de mudanças evolutivas (substituição de nucleotídeos) e o tempo de divergência (estimativa da idade do ancestral comum mais recente, ACMR) foram estimados utilizando o algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), o qual utiliza inferências bayesianas, utilizando os programas implementados no BEAST v1.8.1 (94). Para estes cálculos, os genótipos de cada sorotipo onde os isolados deste estudo se agruparam foram analisados. Ou seja, foram escolhidos o genótipo V de DENV-1, o genótipo IV (Americano/Asiático) de DENV-2 e o genótipo III de DENV-3. Para todos os conjuntos de dados foram utilizados os modelos de relógio molecular relaxado (que assume as taxas de substituições entre os ramos diferentes) (95, 96).

5 RESULTADOS

Neste estudo foram utilizadas 79 amostras de soro de pacientes infectados com dengue. Para caracterização dos vírus, foi realizada uma tentativa de isolamento viral em cultivo celular a partir de todas as amostras de soro.

5.1 Isolamento viral a partir das amostras de soro

Das 79 amostras, somente a partir de 39 delas foi confirmado o isolamento viral por imunofluorescência indireta das células ou por RT-PCR em tempo real do sobrenadante do cultivo celular (Tabela 6). O genoma viral foi então amplificado por RT-PCR convencional e as amostras que atingiram a quantidade suficiente de material genético foram sequenciadas e caracterizadas.

Tabela 6. Resultado da tentativa de isolamento viral das 79 amostras de soro inoculadas em células C6/36.

Amostra de soro	IFA	RT- PCR em Tempo Real --- Carga Viral (PFU/mL)			Sorotipo	Data da coleta
		Passagem 2	Passagem 3	Passagem 4		
1	(-)	0,32	0,49	0,51	ND	01/03/2010
2	(+)	2,3x10 ⁶	NR	NR	ND	11/03/2010
3	(-)	(-)	NR	NR	ND	16/03/2010
4	(+)	1,7x10 ⁵	3,0x10 ⁶	NR	DENV-2	30/03/2010
5	(-)	0,3	(-)	NR	DENV-3	30/03/2010
6	(+)	0,32	0,4	NR	ND	31/03/2010
7	(+)	6,1x10 ²	NR	NR	ND	07/04/2010
8	(+)	3,0x10 ⁶	NR	NR	ND	13/04/2010
9	(-)	(-)	NR	NR	ND	14/04/2010
10	(+)	1,1x10 ⁵	2,3x10 ⁷	NR	DENV-2	15/04/2010
11	(-)	(-)	NR	NR	ND	16/04/2010
12	(-)	(-)	NR	NR	ND	21/04/2010
13	(-)	(-)	NR	NR	ND	26/04/2010
14	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	26/04/2010
15	(-)	0,3	0,3	NR	DENV-1	27/04/2010
16	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	29/04/2010
17	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	30/04/2010
18	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	30/04/2010
19	(+)	2,0x10 ⁶	NR	NR	ND	02/05/2010
20	(+)	1,6x10 ²	2,0x10 ⁴	NR	ND	05/05/2010
21	(-)	(-)	NR	NR	ND	05/05/2010
22	(-)	15	0,55	0,5	DENV-3	06/05/2010
23	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	07/05/2010
24	(-)	(-)	NR	NR	ND	09/05/2010
25	(-)	(-)	NR	NR	ND	10/05/2010

Amostra de soro	IFA	RT- PCR em Tempo Real --- Carga Viral (PFU/mL)			Sorotipo	Data da coleta
		Passagem 2	Passagem 3	Passagem 4		
26	(-)	(-)	NR	NR	ND	10/05/2010
27	(-)	(-)	NR	NR	DENV-2	11/05/2010
28	(+)	2,1x10 ³	0,9	0,3	DENV-1	14/05/2010
29	(-)	0,4	0,4	0,3	DENV-3	14/05/2010
30	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	14/05/2010
31	(-)	0,46	1,71	32,81	ND	18/05/2010
32	(-)	(-)	NR	NR	ND	19/05/2010
33	(-)	(-)	NR	NR	ND	20/05/2010
34	(-)	(-)	NR	NR	ND	21/05/2010
35	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	17/01/2011
36	(+)	10	75	40	DENV-1	03/02/2011
37	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	04/02/2011
38	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	08/02/2011
39	(-)	(-)	NR	NR	DENV-3	08/02/2011
40	(-)	(-)	NR	NR	ND	08/02/2011
41	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	09/02/2011
42	(-)	0,22	0,2	0,19	DENV-1	11/02/2011
43	(+)	3,93	3	3	DENV-1	11/02/2011
44	(-)	(-)	NR	NR	ND	17/02/2011
45	(+)	0,22	0,4	0,18	DENV-1	22/02/2011
46	(+)	9,0x10 ⁻²	34	20	DENV-1	26/02/2011
47	(+)	1,4x10 ⁴	2,8x10 ⁸	NR	DENV-1	26/02/2011
48	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	26/02/2011
49	(-)	(-)	NR	NR	DENV-1	26/02/2011
50	(+)	1,7x10 ⁴	1,2x10 ⁸	NR	DENV-1	10/03/2011
51	(+)	4,6x10 ⁶	NR	NR	DENV-1	10/03/2011
52	(+)	3,0x10 ⁷	NR	NR	DENV-1	10/03/2011
53	(+)	1,52	3,12	0,4	DENV-1	10/03/2011
54	(+)	1,6x10 ⁷	NR	NR	ND	17/03/2011
55	(-)	(-)	NR	NR	ND	17/03/2011
56	(-)	(-)	NR	NR	ND	17/03/2011
57	(-)	(-)	NR	NR	ND	17/03/2011
58	(-)	1,15	4,3	2,2	DENV-1	21/03/2011
59	(+)	34,2	57,1	18	ND	25/03/2011
60	(+)	3,0x10 ⁷	NR	NR	ND	28/03/2011
61	(-)	(-)	NR	NR	ND	04/04/2011
62	(-)	(-)	NR	NR	ND	04/04/2011
63	(+)	0,68	0,3	0,4	DENV-1	04/04/2011
64	(+)	2,8x10 ⁵	NR	NR	ND	05/04/2011
65	(+)	9,6x10 ⁴	NR	NR	ND	12/04/2011
66	(+)	4,3x10 ⁴	NR	NR	ND	12/04/2011

Amostra de soro	IFA	RT- PCR em Tempo Real --- Carga Viral (PFU/mL)			Sorotipo	Data da coleta
		Passagem 2	Passagem 3	Passagem 4		
67	(-)	(-)	NR	NR	ND	13/04/2011
68	(-)	(-)	NR	NR	ND	14/04/2011
69	(+)	$6,5 \times 10^6$	NR	NR	ND	15/04/2011
70	(+)	$1,0 \times 10^8$	NR	NR	ND	18/04/2011
71	(+)	$5,6 \times 10^7$	NR	NR	ND	18/04/2011
72	(+)	$2,8 \times 10^7$	NR	NR	ND	19/04/2011
73	(-)	1,52	8,59	$1,9 \times 10^1$	DENV-3	18/04/2011
74	(-)	(-)	NR	NR	ND	23/05/2011
75	(-)	(-)	NR	NR	DENV-2	26/05/2011
76	(-)	(-)	NR	NR	ND	27/05/2011
77	(-)	(-)	NR	NR	ND	27/05/2011
78	(-)	32,3	Negativo	NR	DENV-2	01/06/2011
79	(-)	(-)	NR	NR	ND	29/08/2011

5.2 Caracterização dos vírus isolados

5.2.1 Identificação do sorotipo viral

O sorotipo infectante já havia sido identificado previamente em 24 amostras das 39 amostras analisadas, portanto para identificação do sorotipo viral nas 15 amostras restantes (2, 7, 8, 19, 20, 54, 59, 60, 64, 65, 66, 69, 70, 71 e 72 da Tabela 1), parte do gene da proteína NS5 ou o gene da proteína E foram sequenciados. Inicialmente, o par de *primers* sFG1 e cFG2 (Tabela 2) foi utilizado numa RT-PCR para amplificação de parte do gene da proteína NS5 de aproximadamente 950 pb (Figura 9). A amplificação deste gene foi bem sucedida em 12 das 15 amostras.

Figura 9. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína NS5. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos de parte do gene da proteína NS5. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 6 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 7 se encontra o controle negativo.

Os vírus (amostras 64, 65 e 66 da tabela 1) que não foram amplificados com os *primers* para o gene da proteína NS5 foram submetidos a três RT-PCRs utilizando *primers* específicos para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (Tabela 2). Um produto de amplificação de 1855 pb foi observado para as três amostras quando utilizado os *primers* específicos para DENV-1 (Figura 10).

Figura 10. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E utilizando os par de *primers* D1s3 e D1a17 para DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular, nas colunas 2 a 4 os produtos de amplificação dos vírus isolados das amostras 64, 65 e 66 e na coluna 5 o controle negativo.

Os produtos da amplificação dos genes das proteínas NS5 e E foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank utilizando o programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>), o qual mostrou que 13 dos vírus sequenciados apresentaram alta identidade com DENV-1, um com DENV-2 e outro com DENV-3. Portanto, dos 39 vírus isolados, 25 são DENV-1, 6 DENV-2 e 8 DENV-3 (Tabela 7).

Tabela 7. Sorotipo dos 39 vírus isolados neste estudo.

Amostra de soro	Sorotipo
1	DENV-3
2	DENV-2
4	DENV-2
6	DENV-3
7	DENV-1
8	DENV-1
10	DENV-2
15	DENV-1
16	DENV-3
19	DENV-2
20	DENV-3
22	DENV-3
28	DENV-1
29	DENV-3
31	DENV-3
36	DENV-1
42	DENV-1
43	DENV-1
45	DENV-1
46	DENV-1
47	DENV-1
50	DENV-1
51	DENV-1
52	DENV-1
53	DENV-1
54	DENV-1
58	DENV-1
59	DENV-2
60	DENV-1
63	DENV-1
64	DENV-1
65	DENV-1
66	DENV-1
69	DENV-1
70	DENV-1
71	DENV-1
72	DENV-1
73	DENV-3
78	DENV-2
TOTAL	39

5.2.2 Sequenciamento do gene da proteína E

O gene da proteína E foi escolhido para a realização das análises filogenéticas e evolutivas dos vírus isolados. Todos os vírus foram submetidos a uma RT-PCR para amplificação do gene da proteína E (Figura 11).

Figura 11. Análise da amplificação por RT-PCR do gene da proteína E. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos fragmentos do gene da proteína E. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 10 exemplos de produtos de amplificação dos vírus isolados de pacientes. Na coluna 11 se encontra o controle negativo.

Quantidades suficientes de produto amplificado para sequenciamento nucleotídico foram obtidas para 20 vírus (Tabela 3), dos quais 15 correspondiam a DENV-1, 4 a DENV-2 e 1 a DENV-3. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com sequências de referências, mostrando que o gene da proteína E apresentava um tamanho de 1485 pb para DENV-1 (Figura 12) e DENV-2 (Figura 13), e 1479 para DENV-3 (Figura 14).

Figura 12. Alinhamento das sequências de DENV-1 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E.

Figura 13. Alinhamento das sequências de DENV-2 isoladas neste estudo mostrando a posição 1 e 1485 do gene da proteína E.

Figura 14. Alinhamento da sequências de DENV-3 isolada neste estudo com uma cepa isolada no Brasil de DENV-3 mostrando a posição 1 e 1479 do gene da proteína E.

Analisando o conteúdo C+G de cada sequência, os DENV-1 variaram esta composição entre 46,2% e 47,7%, os DENV-2 variaram entre 45,3% e 45,4% e o DENV-3 apresentou 46,2% de C+G.

5.2.3 Análise de identidade, filogenia e evolução dos vírus isolados baseados na sequência do gene da proteína E

As sequências do gene da proteína E dos vírus isolados foram alinhadas e comparadas com outras correspondentes a vírus isolados em diversos países, inclusive no Brasil, em diferentes épocas, incluindo sequencias representativas de todos os genótipos existentes para cada sorotipo.

5.2.3.1 Análise de identidade entre as sequências

DENV-1

Comparando as sequências de DENV-1 incluídas neste estudo foi possível observar que a máxima identidade entre as mesmas foi de 100% e a mínima de 95,29% (Figura 15).

		% de Identidade														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
D1BR_RP4_2011_GV	1		99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	100,00	99,87	95,62	95,62	95,62	95,56	95,35	95,56	95,56
D1BR_RP12_2011_GV	2	1		100,00	100,00	100,00	99,87	99,93	99,93	95,69	95,69	95,69	95,62	95,42	95,62	95,62
D1BR_RP5_2011_GV	3	1	0		100,00	100,00	99,87	99,93	99,93	95,69	95,69	95,69	95,62	95,42	95,62	95,62
D1BR_RP8_2011_GV	4	1	0	0		100,00	99,87	99,93	99,93	95,69	95,69	95,69	95,62	95,42	95,62	95,62
D1BR_RP11_2011_GV	5	1	0	0	0		99,87	99,93	99,93	95,69	95,69	95,69	95,62	95,42	95,62	95,62
D1BR_RP3_2011_GV	6	1	2	2	2	2		99,93	99,80	95,56	95,56	95,56	95,49	95,29	95,49	95,49
D1BR_RP6_2011_GV	7	0	1	1	1	1	1		99,87	95,62	95,62	95,62	95,56	95,35	95,56	95,56
D1BR_RP13_2011_GV	8	2	1	1	1	1	3	2		95,69	95,69	95,69	95,62	95,42	95,62	95,62
D1BR_RP1_2011_GV	9	65	64	64	64	64	66	65	64		100,00	100,00	99,93	99,73	99,53	99,53
D1BR_RP2_2011_GV	10	65	64	64	64	64	66	65	64	0		100,00	99,93	99,73	99,53	99,53
D1BR_RP9_2011_GV	11	65	64	64	64	64	66	65	64	0	0		99,93	99,73	99,53	99,53
D1BR_RP14_2011_GV	12	66	65	65	65	65	67	66	65	1	1	1		99,66	99,46	99,46
D1BR_RP7_2011_GV	13	69	68	68	68	68	70	69	68	4	4	4	5		99,26	99,26
D1BR_RP15_2011_GV	14	66	65	65	65	65	67	66	65	7	7	7	8	11		100,00
D1BR_RP10_2010_GV	15	66	65	65	65	65	67	66	65	7	7	7	8	11	0	
		Diferença de nucleotídeo														

Figura 15. Identidade entre sequências de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto.

Dois grupos de DENV-1 são observados claramente, um constituído pelos isolados D1BR/RP3/2011, D1BR/RP4/2011, D1BR/RP5/2011, D1BR/RP6/2011, D1BR/RP8/2011, D1BR/RP11/2011, D1BR/RP12/2011, D1BR/RP13/2011 com identidade de 100% a 99,80% e o outro pelos isolados D1BR/RP1/2011, D1BR/RP2/2011, D1BR/RP7/2011, D1BR/RP9/2011, D1BR/RP10/2010, D1BR/RP14/2011 e D1BR/RP15/2011 com identidade de 100% a 99,26%; a identidade dos vírus entre ambos os grupos variou de 95,29% a 95,69%. O primeiro grupo apresentou maior similaridade com as cepas BR/JX669463/2010 (99,66% - 99,73%), BR/JX669466/2010 (99,53% - 99,66%) isoladas em Pernambuco e BR/JN122281/2011 isolada no Rio de Janeiro (99,39% - 99,36%) do que com o segundo grupo de vírus isolados neste estudo. Além de alta similaridade com outros isolados brasileiros, o primeiro grupo apresentou maior identidade com cepas da América do Sul, como a cepa venezuelana VE/GU056031/1998 (99,39% - 99,53%), e com uma cepa do Caribe, a cepa haitiana HA/JF969281/2010 (98,79% - 98,92%). Já os isolados do segundo grupo apresentaram maior porcentagem de identidade com as cepas BR/HM450096/2003 (99,46% - 99,93) isolada no estado do Maranhão, BR/HQ026762/2010 (99,33% - 99,66%) isolada no Rio de Janeiro, BR/FJ850087/2006 (99,39% - 99,80%), BR/FJ850084/2005 (98,65% - 99,6%), BR/FJ850075/2002 (99,12% - 99,80%), BR/FJ850081/2004 (98,72% - 99,53%) e BR/HM450099/2005 (98,65% - 99,6%) isoladas na região Norte do Brasil. Em relação a outros países, o segundo grupo apresentou identidade entre

96,77% e 97,10% com a cepa RE/DQ285554/2004 isolada na Ilha de Reunião no Oceano Índico e entre 96,63% e 96,97% com a cepa SG/M87512/1990 isolada na Singapura.

DENV-2

A máxima identidade entre as sequências de DENV-2 isoladas em Ribeirão Preto foi de 99,8% e a mínima de 99,39% (Figura 16). Os isolados mais similares encontrados foram os D2BR/RP17/2010 e D2BR/RP19/2010 (identidade de 99,8%).

		% de Identidade			
		1	2	3	4
D2BR_RP19_2010_GIV	1		99,73	99,53	99,80
D2BR_RP16_2010_GIV	2	4		99,39	99,66
D2BR_RP18_2010_GIV	3	7	9		99,46
D2BR_RP17_2010_GIV	4	3	5	8	
		Diferença de nucleotídeos			

Figura 16. Identidade entre as sequências de DENV-2 isoladas em Ribeirão Preto.

Quando comparada com outras sequências de vírus isolados no Brasil, os vírus isolados em Ribeirão Preto apresentaram maior similaridade (99,87% - 99,60%) com a cepa BR/HQ012530/2009 isolada no estado do Espírito Santo e com a cepa BR/JX669478/2010 isolada em Pernambuco. Também, apresentou entre 99,93% e 99,46% de identidade com a cepa BR/GQ368169/2008 isolada no Rio de Janeiro. Comparando os isolados deste estudo com cepas isoladas em outros países, uma maior identidade com vírus isolados no Peru e no Paraguai foi encontrada (99,87% - 99,53%).

DENV-3

Neste estudo, apenas um DENV-3 (D3BR/RP20/2010) foi isolado. Comparando com outras sequências de vírus isolados no Brasil, esta apresentou maior similaridade (99,59% - 99,53%) com vírus isolados na própria cidade de Ribeirão Preto entre 2006 e 2009. Uma menor identidade foi observada quando comparada com uma cepa isolada em Ribeirão Preto em 2003 (98,65%). Quando comparado com vírus isolados em outros países, a maior similaridade foi observada com vírus isolados na Bolívia em 2003, no Paraguai em 2003 e em Santa Lucia no Caribe em 2001 (99,39% - 99,05%).

5.2.3.2 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas dos vírus isolados neste estudo foram realizadas com base nos alinhamentos das sequências do gene da proteína E indicados acima. As análises foram realizadas utilizando os métodos de inferência Bayesiana e de distância (Neighbor Joining), gerando árvores filogenéticas com topologias similares para os três sorotipos virais. Nas árvores filogenéticas, as cepas estão indicadas pela inicial do país/número de acesso no *Genbank* /ano de isolamento/genótipo ao qual pertencem.

DENV-1

A Figura 17 mostra a árvore filogenética obtida pelo método de Neighbor Joining, agrupando os vírus deste sorotipo em cinco clados ou genótipos distintos. Os vírus isolados neste estudo (D1BR/RP1/2011, D1BR/RP2/2011, D1BR/RP3/2011, D1BR/RP4/2011, D1BR/RP5/2011, D1BR/RP6/2011, D1BR/RP7/2011, D1BR/RP8/2011, D1BR/RP9/2011, D1BR/RP10/2010, D1BR/RP11/2011, D1BR/RP12/2011, D1BR/RP13/2011, D1BR/RP14/2011 e D1BR/RP15/2011) se agruparam com outros vírus isolados no Brasil e nas Américas dentro do genótipo V. Os isolados brasileiros se encontram em dois clados ou grupos diferentes dentro deste genótipo.

Figura 17. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto (os quatro isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio.

Os isolados D1BR/RP3/2011, D1BR/RP4/2011, D1BR/RP5/2011, D1BR/RP6/2011, D1BR/RP8/2011, D1BR/RP11/2011, D1BR/RP12/2011, D1BR/RP13/2011 se encontram estreitamente relacionados a outras cepas isoladas no Rio de Janeiro e Pernambuco entre 2010 e 2011 e, também, a cepas isoladas no Haiti em 2010, na Venezuela em 1995-1998 e na Colômbia em 2008. Por outro lado, os isolados D1BR/RP1/2011, D1BR/RP2/2011, D1BR/RP7/2011, D1BR/RP9/2011, D1BR/RP10/2010, D1BR/RP14/2011 e D1BR/RP15/2011 estão agrupados com cepas brasileiras isoladas no Rio de Janeiro e no Norte do país entre 2002 e 2010 e, também, a uma cepa isolada em 2004 na Ilha Reunião, localizada no Oceano Índico e outras duas cepas isoladas em Cingapura em 1990 e 2005. Esses dados sugerem que duas introduções diferentes de DENV-1 ocorreram em Ribeirão Preto, com vírus originários do Caribe e do Sul da Ásia.

DENV-2

Os vírus deste sorotipo se apresentaram em seis genótipos similares a aqueles descritos previamente na literatura (40, 42-44). Os vírus isolados neste estudo pertencem ao genótipo Americano/Asiático (genótipo IV) agrupados juntamente com outros vírus isolados no Brasil e nas Américas (Figura 18).

Figura 18. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-2 em Ribeirão Preto (os quatro isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma (G=1). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio.

Os DENV-2 isolados neste estudo estão filogeneticamente mais relacionados a outras cepas isoladas no país entre 2008 e 2010, incluindo uma cepa de Ribeirão Preto isolada em nosso laboratório em 2009 (97) e, também, a uma cepa isolada no Rio de Janeiro em 2008, sugerindo assim que os vírus deste estudo foram introduzidos em Ribeirão Preto pelo estado do Rio de Janeiro. Em relação a cepas isoladas em outros países, também apresentou relacionamento filogenético com cepas isoladas no Peru em 2009 e 2011, na Bolívia e no Paraguai em 2010. Os vírus circulantes em Ribeirão Preto se encontram em um clado, cujas cepas basais correspondem a vírus isolados no Caribe, sugerindo que os vírus introduzidos no Brasil são originários dessa região.

DENV-3

A análise filogenética dos DENV-3 mostrou o agrupamento destes vírus em quatro genótipos já descritos na literatura (45). O vírus isolado neste estudo pertence ao genótipo III, e se encontram agrupados juntamente com outros vírus isoladas no Brasil e nas Américas (Figura 19).

Figura 19. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E de isolados de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene da proteína E do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento/Genótipo. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma (G=1). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio.

O DENV-3 isolado nesse estudo (D3BR/RP20/2010) está estreitamente relacionado com a cepa BR/GQ330473/2009 isolada também em Ribeirão Preto em 2009, sugerindo que se trata da mesma linhagem que já estava circulando na cidade. Também, está relacionado com outras cepas brasileiras isoladas entre 2006 e 2009, inclusive cepas isoladas em Ribeirão Preto, com cepas isoladas no Rio de Janeiro entre 2004 e 2005 e com cepas isoladas do Paraguai em 2002 e 2003 e uma cepa isolada em 2003 na Bolívia. Também apresentou alta relação filogenética com uma cepa da Ilha Santa Lúcia, no Caribe. Com estes dados, pode-se sugerir então que este isolado em Ribeirão Preto pode ter sido introduzido no Brasil ou pela América do Sul ou pelo Caribe. Dentro do genótipo III outras cepas brasileiras isoladas em 1986, 2005 e 2006 se relacionam filogeneticamente com uma cepa isolada no Paraguai em 2006 e outra isolada na Argentina em 2007. E também, outra cepa brasileira, a BR/FJ850079/2003 se agrupou com cepas isoladas na Venezuela em 2001 e 2003 e na Colômbia em 2005.

5.2.3.3 Taxa evolutiva e tempo de divergência

A taxa de mudanças evolutivas (substituição de nucleotídeos) e o tempo de divergência (estimativa da idade do ancestral comum mais recente, ACMR) dos genótipos V de DENV-1, IV de DENV-2 e III de DENV-3, onde estão agrupados os vírus deste estudo foram analisados. Alguns grupos dentro de cada genótipo onde se agruparam isolados brasileiros foram escolhidos para as análises, com o objetivo de entendermos como foi a evolução e migração dos vírus isolados neste estudo.

DENV-1 genótipo V

Com base na topologia da árvore filogenética, os vírus do genótipo V de DENV-1 foram divididos em cinco clados ou grupos monofiléticos (Grupos A, A1, A2, A2-1 e B, Figura 20). Os vírus deste estudo se encontram nos grupos A2-1 e B. A taxa de mudanças evolutivas e ACMR destes grupos foram calculados.

Figura 20. Árvore filogenética dos vírus do genótipo V de DENV-1. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente. Os números indicados nos nós representa o valor de *bootstrap*.

A Tabela 8 mostra que os vírus do genótipo V de DENV-1 apresentaram uma taxa de evolução de $1,1 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos/sítio/ano, sendo que o ACMR teria surgido em 1962. Os grupos internos apresentaram uma taxa de evolução de $9,9 \times 10^{-4}$ a $4,4 \times 10^{-3}$. O ACMR do grupo A teria surgido em 1986, coincidindo com o ACMR do grupo A1 como era de esperar já que este último inclui os vírus basais do grupo A. Os vírus do grupo A2 representam uma evolução dos vírus do grupo A1 e ACMR teria surgido em 1995, já o ACMR do grupo A2.1 que inclui alguns dos vírus deste estudo teria surgido em 2010, coincidentemente com uma epidemia ocorrida em Ribeirão Preto nesse mesmo ano e cujo sorotipo circulante predominante foi o DENV-1. O ACMR do grupo B, onde se encontram os outros vírus isolados neste estudo, teria surgido em 2002, quando os sorotipos predominantes que circulavam em Ribeirão Preto eram DENV-1 e DENV-2.

Tabela 8. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo V de DENV-1

Sorotipo	Genótipo	Grupos	Substituições/sítio/ano	ACMR
DENV-1	V		$1,1 \times 10^{-3}$ ($8,7 \times 10^{-4}$ - $1,2 \times 10^{-3}$)	1962
		A	$1,0 \times 10^{-3}$ ($8,5 \times 10^{-4}$ - $1,3 \times 10^{-3}$)	1986
		A1	$1,5 \times 10^{-3}$ ($9,7 \times 10^{-4}$ - $2,0 \times 10^{-3}$)	1986
		A2	$9,9 \times 10^{-4}$ ($7,5 \times 10^{-4}$ - $1,2 \times 10^{-3}$)	1995
		A2-1	$4,4 \times 10^{-3}$ ($1,3 \times 10^{-3}$ - $8,7 \times 10^{-3}$)	2010
		B	$5,5 \times 10^{-4}$ ($3,0 \times 10^{-4}$ - $8,0 \times 10^{-4}$)	2002

DENV-2 genótipo IV (Americano/Asiático)

Para analisar os DENV-2 isolados neste estudo, o genótipo IV foi dividido em três grupos ou clados (A, A1 e A2) (Figura 21).

Figura 21. Árvore filogenética dos vírus do genótipo IV de DENV-2. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente. Os números indicados nos nós representa o valor de *bootstrap*.

Os vírus deste estudo se encontram no grupo A2 que representa um clado dentro do grupo A. A taxa de mudanças evolutivas e ACMR destes grupos foram calculados (Tabela 9).

Tabela 9. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dentro dos cepas do genótipo IV de DENV-2.

Genótipo	Grupos	Substituições/sítio/ano	ACMR
IV		$1,0 \times 10^{-3}$ ($8,6 \times 10^{-4}$ - $1,2 \times 10^{-3}$)	1987
	A	$1,6 \times 10^{-3}$ ($1,2 \times 10^{-3}$ - $2,0 \times 10^{-3}$)	1997
	A1	$1,7 \times 10^{-3}$ ($1,0 \times 10^{-3}$ - $2,5 \times 10^{-3}$)	1997
	A2	$1,5 \times 10^{-3}$ ($5,6 \times 10^{-4}$ - $2,5 \times 10^{-3}$)	2007

Os vírus deste genótipo apresentaram uma taxa de evolução de $1,0 \times 10^{-3}$ substituições de nucleotídeos/sítio/ano e o ano de surgimento do ancestral comum mais recente foi 1987. Os vírus isolados neste estudo se encontram no grupo A2, juntamente com outras cepas isoladas no Brasil entre 2008 a 2010, inclusive uma cepa de Ribeirão Preto isolada em 2009. O ACMR do grupo A2 teria surgido em 2007, ano em que ocorreu uma epidemia causada por DENV-2 no Rio de Janeiro (50). Sugere-se então que os vírus deste estudo se originaram a partir de vírus circulantes no Rio de Janeiro.

O ACMR do grupo A teria surgido em 1997, coincidindo com a data de surgimento do ACMR do clado basal, o grupo A1. Pela topologia da árvore filogenética podemos observar que as cepas mais antigas do grupo A se agrupam no grupo A1. Pode-se sugerir então que as cepas do grupo A1, que foram isoladas no Caribe, deram origem aos isolados deste estudo e ao restante dos vírus do grupo A, ou seja, do grupo A2.

DENV-3 genótipo III

O genótipo III de DENV-3 foi dividido em quatro clados (A, A1, A2 e A3) (Figura 22).

Figura 22. Árvore filogenética dos vírus do genótipo III de DENV-3. Grupos selecionados para o cálculo da taxa de substituição de nucleotídeos e surgimento do ancestral comum mais recente. Os números indicados nos nós representa o valor de *bootstrap*.

Este genótipo apresentou ano de surgimento do ancestral comum mais recente em 1981, e o número de substituições de nucleotídeos/sítio/ano foi de $7,8 \times 10^{-4}$ (Tabela 9).

Tabela 10. Taxa de substituição de nucleotídeos por sítio e ano dos vírus do genótipo III de DENV-3.

Sorotipo	Genótipo	Grupos	Substituições/sítio/ano	ACMR
DENV-3	III		$7,8 \times 10^{-4}$ ($4,7 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$)	1981
		A	$1,1 \times 10^{-3}$ ($9,1 \times 10^{-4}$ - $1,4 \times 10^{-3}$)	1994
		A1	$9,2 \times 10^{-4}$ ($5,7 \times 10^{-4}$ - $1,3 \times 10^{-3}$)	1999
		A2	$9,0 \times 10^{-4}$ ($5,5 \times 10^{-4}$ - $1,3 \times 10^{-3}$)	1999
		A3	$1,2 \times 10^{-3}$ ($6,6 \times 10^{-4}$ - $1,7 \times 10^{-3}$)	2002

O vírus isolado neste estudo se agrupou no grupo A3, juntamente com outras cepas brasileiras isoladas de 2002 a 2009 e cepas isoladas no Paraguai e Bolívia em 2003. Este grupo teria surgido em 2002, época em que ocorreu o primeiro surto de DENV-3 no Rio de Janeiro. Sugerindo-se então que este vírus foi introduzido na região de Ribeirão Preto vindo do Rio de Janeiro.

Os grupos A1 e A2 apresentaram o mesmo ACMR, em 1999. Estes grupos incluem cepas da América do Sul, América Central e Caribe que são os vírus basais e que provavelmente deram origem ao vírus isolado neste estudo.

5.2.4 Sequenciamento de toda região codificadora do genoma viral

Com base nas análises filogenéticas e evolutivas descritas acima, quatro vírus foram selecionados para o sequenciamento de toda região codificadora do genoma viral. Como os isolados de DENV-1 formaram dois grupos diferentes, um vírus de cada grupo foi selecionado para as análises (D1BR/RP1/2011, D1BR/RP6/2011). Os isolados de DENV-2 formaram um único grupo, então a escolha foi aleatória (D2BR/RP17/2010). Por último, foi incluído o único vírus isolado de DENV-3 (D3BR/RP20/2010). As sequências completas foram obtidas por amplificação e sequenciamento de cinco fragmentos com regiões sobrepostas para DENV-1 e DENV-2 e seis fragmentos com regiões sobrepostas para DENV-3 (Figura 23).

Figura 23. Representação das cinco regiões sobrepostas amplificadas para a montagem de todo o genoma viral de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, os primers utilizados para a amplificação e o tamanho dos fragmentos.

Estas amostras foram amplificadas por RT-PCR e sequenciadas utilizando os *primers* das Tabelas 4 e 5 e os produtos de amplificação das amostras foram purificados do gel de agarose a 1,8% e quantificados (Figura 24). O sequenciamento de todo o genoma mostrou que o DENV-1, DENV-2 e DENV-3 tem 10637, 10595 e 10605, respectivamente.

Figura 24. Análise da amplificação por RT-PCR do genoma completo de DENV-1. Representação virtual da corrida eletroforética capilar dos cinco fragmentos sobrepostos do genoma completo de um dos isolados de DENV-1. Na coluna L se encontra o marcador de tamanho molecular e nas colunas 1 a 5 os cinco fragmentos.

5.2.5 Análises de identidade e filogenia baseadas na região codificadora do genoma viral

5.2.5.1 Análise de identidade

DENV-1

Os isolados D1BR/RP1/2011 e D1BR/RP6/2011 apresentaram 96,63% de identidade entre si, com a divergência de 355 nucleotídeos entre suas sequências. Dentre as cepas brasileiras presentes no genótipo V, a cepa D1BR/RP1/2011 apresentou maior porcentagem de identidade (99,43%) e divergência de 60 nucleotídeos com a cepa BR/GU131863/2008 isolada em São José do Rio Preto - SP e menor porcentagem de identidade (95,51%) com a cepa BR/JX669466/2010, isolada no estado de Pernambuco, divergindo da mesma em 472 nucleotídeos. Já em relação às cepas de outros países, essa cepa apresentou maior porcentagem de identidade (96,21%) com a cepa venezuelana VE/FJ639741/1998 e divergência de 398 nucleotídeos entre suas sequências. Já a cepa D1BR/RP6/2011 apresentou a porcentagem máxima de identidade de 97,89% com a cepa brasileira BR/JX669466/2010 isolada em Pernambuco, e menor porcentagem de identidade (96,31%) com a cepa BR/FJ850090/2007, isolada na região norte do Brasil. Em relação aos outros países, essa cepa apresentou porcentagem máxima de identidade de 97,49% (diferença de 264 nucleotídeos) com a cepa venezuelana VE/GU05603/1998 (Figura 25). Estes dados são similares a aqueles observados quando analisado o gene da proteína E.

% de Identidade																										
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			
VE/FJ639741/1998	3		98,18	98,05	97,99	98,63	98,29	98,36	98,10	97,91	97,72	97,90	98,08	98,25	97,00	96,89	97,01	96,97	96,77	96,69	96,62	96,21	96,26	96,32		
VE/FJ882579/2007	4	191		99,35	98,72	98,19	97,84	97,80	97,57	98,48	98,25	98,50	97,53	97,82	97,16	96,59	96,63	96,65	96,29	96,20	96,12	95,74	95,77	95,85		
BR/FJ850093/2008	5	205	68		98,63	98,09	97,76	97,68	97,43	98,36	98,15	98,37	97,41	97,74	97,07	96,49	96,52	96,54	96,21	96,13	96,04	95,67	95,72	95,72		
CO/GQ868570/2008	6	211	134	144		97,99	97,70	97,64	97,35	98,32	98,12	98,33	97,45	97,70	96,99	96,42	96,49	96,51	96,19	96,09	96,03	95,61	95,71	95,70		
BR/AF226685/1990	7	144	190	201	211		98,25	98,81	98,56	98,00	97,83	97,99	98,56	98,24	97,06	97,39	97,45	97,45	97,03	96,91	96,86	96,47	96,53	96,53		
NI/FJ547088/2008	8	180	227	235	241	184		97,87	97,59	97,69	97,47	97,66	97,62	99,09	96,67	96,62	96,70	96,71	96,41	96,31	96,21	95,78	95,91	95,89		
BR/AF111956/1997	9	172	231	244	248	125	224		99,06	97,60	97,39	97,59	99,02	97,89	96,71	96,91	97,05	97,01	96,67	96,57	96,50	96,10	96,11	96,18		
BR/AF151110/2001	10	199	255	270	278	151	253	99		97,44	97,20	97,41	98,88	97,65	96,57	96,72	96,82	96,80	96,53	96,48	96,36	95,97	95,95	96,06		
BR/JX669463/2010	11	219	160	172	176	210	243	252	269		99,14	99,86	97,35	97,72	97,86	96,33	96,41	96,39	96,11	96,02	95,92	95,54	95,61	95,63		
VE/GU056031/1998	12	239	184	194	197	228	266	274	294	90		99,13	97,12	97,48	97,49	96,14	96,21	96,20	95,90	95,81	95,76	95,35	95,46	95,52		
BR/JX669466/2010	13	220	157	171	175	211	246	253	272	15	91		97,32	97,68	97,89	96,32	96,40	96,36	96,07	95,99	95,90	95,51	95,59	95,60		
AR/AY277665/2008	14	202	259	272	268	151	250	103	118	278	302	281		97,70	96,65	96,88	96,97	96,97	96,75	96,68	96,58	96,17	96,21	96,27		
MX/GQ868530/2008	15	184	229	237	241	185	96	222	247	239	265	244	242		96,71	96,70	96,75	96,80	96,39	96,28	96,18	95,82	95,84	95,88		
D1BR/RP6/2011	16	316	299	308	317	309	350	346	361	225	264	222	353	346		95,88	95,90	95,88	96,86	96,77	96,67	96,63	96,31	96,80		
PY/AF1514878/2000	17	326	358	369	376	274	355	324	344	385	405	386	328	346	434		99,52	99,66	96,27	96,16	96,11	95,73	95,80	95,82		
US/FJ390380/1998	18	314	354	365	368	268	346	310	334	377	398	378	318	341	431	50		99,35	96,30	96,20	96,16	95,76	95,80	95,87		
AR/AY277666/2000	19	318	352	363	366	268	345	314	336	379	399	382	318	336	434	36	68		96,29	96,16	96,12	95,75	95,80	95,84		
BR/FJ850075/2002	20	339	389	398	400	312	377	350	364	408	430	413	341	379	330	392	388	390		99,62	99,54	99,06	99,09	99,19		
BR/FJ850081/2004	21	347	399	406	410	324	387	360	370	418	440	421	349	391	340	403	399	403	40		99,39	98,92	98,95	99,04		
BR/FJ850071/2000	22	355	407	416	417	330	398	368	382	428	445	431	359	401	351	409	403	407	48	64		98,85	99,30	98,98		
D1BR/RP1/2011	23	398	448	455	461	371	443	410	424	469	489	472	403	439	355	449	446	447	99	113	121		98,47	99,43		
BR/FJ850090/2007	24	393	444	450	451	364	430	409	425	461	477	463	398	437	389	441	441	441	96	110	74	161		98,54		
BR/GU131863/2008	25	386	436	449	451	364	431	401	414	459	470	462	392	433	337	439	434	437	85	101	107	60	153			

Diferença de nucleotídeos

Figura 25. Identidade entre as sequências de toda a região codificadora de DENV-1 isoladas em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo V.

DENV-2

O isolado D2BR/RP17/2010 apresentou porcentagem máxima de identidade de 99,64% (divergência de 38 nucleotídeos) com as cepas BR/GU131883/2008, BR/GU131885/2008 (99,63%) e BR/GQ868549/2008 (99,62%) que foram isoladas em São José do Rio Preto-SP e menor porcentagem de identidade (96,96%) com a cepa BR/JX669487/2000 que foi isolada no estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil. Dentre as cepas de outros países pertencentes a este mesmo genótipo, uma cepa da Jamaica apresentou 99,43% de identidade, com apenas 60 nucleotídeos de divergência comparada com a cepa isolada nesse estudo (Figura 26).

% de Identidade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
BR/GU131885/2008	1	99,52	99,99	99,63	99,99	99,54	99,61	99,14	99,13	98,47	98,71	98,06	98,60	97,20	96,97	97,64	97,34	96,81	97,25	97,17
BR/JX669477/2010	2	51		99,53	99,41	99,51	99,36	99,45	98,99	98,97	98,30	98,56	97,96	98,45	97,12	96,94	97,56	97,26	96,77	97,20
BR/GU131883/2008	3	1	50		99,64	99,98	99,55	99,62	99,15	99,14	98,48	98,72	98,07	98,61	97,21	96,98	97,65	97,35	96,82	97,26
D2BR/RP17/2010	4	39	62	38		99,62	99,43	99,53	99,04	99,22	98,40	98,60	97,99	98,50	97,15	96,96	97,61	97,27	96,78	97,21
BR/GQ868549/2008	5	1	52	2	40		99,53	99,60	99,13	99,12	98,46	98,70	98,05	98,59	97,19	96,96	97,63	97,33	96,82	97,24
JM/GQ199892/2007	6	49	68	48	60	50		99,45	99,11	98,97	98,44	98,68	98,05	98,59	97,17	96,96	97,65	97,33	96,82	97,26
BR/JX669478/2010	7	41	58	40	50	42	58		99,06	99,10	98,38	98,63	97,98	98,53	97,16	96,93	97,58	97,30	96,78	97,22
DO/FJ898451/2003	8	91	107	90	102	92	94	100		98,57	98,73	98,96	98,28	98,82	97,40	97,20	97,90	97,59	97,04	97,50
BR/JX286524/2010	9	92	109	91	83	93	109	95	151		97,92	98,16	97,71	98,06	96,63	96,44	97,09	96,79	96,34	96,71
KN/FJ898460/2001	10	162	180	161	169	163	165	172	135	220		99,29	98,62	99,13	97,68	97,47	98,21	97,89	97,36	97,80
CU/AY702034/1997	11	137	153	136	148	138	140	145	110	195	75		98,84	99,61	97,85	97,60	98,39	98,07	97,51	98,00
CO/GQ868553/1999	12	206	216	205	213	207	214	182	242	146	123		98,74	97,75	97,51	98,25	97,95	97,41	97,89	97,69
MQ/AF208496/1998	13	148	164	147	159	149	149	156	125	206	92	41	133		97,72	97,47	98,25	97,93	97,39	97,87
BR/JX669480/1995	14	297	305	296	302	298	300	301	275	357	246	228	238	242		98,98	98,63	99,01	98,34	98,96
BR/JX669487/2000	15	321	324	320	322	322	322	325	297	377	268	254	264	268	108		98,39	98,67	98,09	98,62
VI/CQ868603/1987	16	250	258	249	253	251	249	256	223	308	190	171	185	185	145	171		98,85	98,25	98,78
VE/CQ868541/1991	17	282	290	281	289	283	283	286	255	340	224	205	217	219	105	141	122		99,16	99,14
CO/CQ868552/1998	18	338	342	337	341	337	341	314	388	280	264	274	276	176	202	185	89		98,49	98,29
VE/CQ868595/1991	19	291	297	290	296	292	290	295	265	349	233	212	224	226	110	146	129	91	160	98,91

Diferenças de nucleotídeos

Figura 26. Identidade entre a sequência de toda a região codificadora de DENV-2 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo IV.

DENV-3

O isolado D3BR/RP20/2010 apresentou maior porcentagem de identidade (99,71%) com a cepa BR/GU131878/2007 isolada no estado de São Paulo, apresentando somente a divergência de 31 nucleotídeos entre suas sequências. Também apresentou alta porcentagem de identidade (99,18%) com a cepa BR/JX669499/2004 isolada no estado de Pernambuco e com a cepa BR/AY679147/2002 (99,14%). Porém, já com a cepa BR/GU131873/2007, também isolada no estado de São Paulo, apresentou a menor porcentagem de identidade (96,74%), com 346 nucleotídeos diferentes entre essas sequências. Em relação aos outros países, uma cepa de Anguilla AI/FJ898460/2001 apresentou a maior porcentagem de identidade de 98,91% com essa cepa isolada neste estudo (Figura 27).

% de Identidade

	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
BR/AY679147/2002	9		99,57	99,62	99,38	99,44	98,76	99,47	99,42	99,05	99,68	99,11	99,70	99,42	99,38	98,34	98,49	99,32	98,82	98,65	98,73	98,74	98,92	97,92	98,59	98,29	99,30	99,14
BR/XJ669500/2005	10	46		99,51	99,28	99,33	98,62	99,40	99,32	99,01	99,62	99,02	99,60	99,32	99,28	98,28	98,38	99,25	98,65	98,51	98,56	98,59	98,82	97,85	98,51	98,17	99,21	99,05
BR/XJ669492/2005	11	40	52		99,32	99,37	98,67	99,42	99,34	99,01	99,62	99,06	99,64	99,36	99,32	98,29	98,45	99,26	98,70	98,54	98,59	98,64	98,87	97,86	98,55	98,18	99,23	99,10
EC/FJ898457/2000	12	66	76	72		99,41	98,84	99,19	99,13	98,76	99,40	99,55	99,40	99,38	99,36	98,43	98,57	99,28	98,90	98,73	98,76	98,81	99,89	97,64	99,00	98,37	98,98	
AJ/FJ898462/2001	13	59	71	67	63		98,77	99,24	99,16	98,81	99,44	99,14	99,46	99,73	99,67	98,33	98,52	99,63	98,81	98,64	98,70	98,73	99,01	97,69	98,63	98,30	99,07	98,91
CO/GQ868574/2003	14	131	146	141	123	130		98,54	98,52	98,13	98,73	98,60	98,76	98,76	98,75	99,05	98,32	98,67	98,67	99,38	99,15	99,58	98,31	97,01	98,17	99,04	98,41	98,26
BR/EF643017/2003	15	56	64	62	86	81	155		99,49	99,12	99,51	98,92	99,53	99,23	99,21	98,17	98,32	99,13	98,58	98,42	98,48	98,51	98,77	98,09	98,40	98,10	99,13	98,99
BR/XJ669508/2006	16	62	72	70	92	89	157	54		99,05	99,43	98,89	99,45	99,15	99,11	98,09	98,32	99,06	98,54	98,43	98,44	98,47	98,72	97,96	98,40	98,03	99,09	98,93
BR/GU131877/2007	17	101	105	105	131	126	198	93	101		99,09	98,56	99,10	98,80	98,78	97,78	97,90	98,71	98,21	98,03	98,11	98,10	98,33	98,00	97,97	97,66	98,73	98,57
BR/XJ669499/2004	18	34	40	40	64	59	135	52	60	97		99,17	99,74	99,43	99,40	98,32	98,47	99,34	98,78	98,61	98,67	98,70	98,94	97,95	98,60	98,26	99,34	99,18
US/FJ850056/2004	19	94	104	100	48	91	148	114	118	153	88		99,13	99,11	99,08	98,22	98,32	99,02	98,63	98,49	98,55	98,58	98,62	97,39	98,78	98,15	98,76	98,63
BR/FJ913015/2001	20	32	42	38	64	57	131	50	58	95	28	92		99,45	99,42	98,36	98,51	99,36	98,78	98,65	98,71	98,74	98,94	97,99	98,60	98,29	99,47	99,31
LC/FJ898463/2001	21	62	72	68	66	29	131	82	90	127	60	94	58		99,72	98,32	98,48	99,87	98,76	98,63	98,69	98,72	99,00	97,68	98,59	98,29	99,06	98,90
CV/FJ898464/2002	22	66	76	72	68	35	133	84	94	129	64	98	62	30		98,30	98,44	99,62	98,73	98,61	98,65	98,70	98,98	97,66	98,55	98,29	99,02	98,86
VE/GQ868587/2007	23	176	182	181	166	177	101	194	202	235	178	189	174	178	180		97,85	98,25	98,22	98,92	98,69	99,02	97,84	96,64	97,74	98,59	98,02	97,95
MZ/FJ882575/1985	24	160	172	164	152	157	178	178	178	223	162	178	158	161	165	228		98,39	98,36	98,17	98,20	98,27	98,08	96,78	97,85	97,84	98,17	98,01
LC/GQ868616/2001	25	72	80	78	76	39	141	92	100	137	70	104	68	14	40	186	171		98,67	98,54	98,59	98,62	98,91	97,59	98,49	98,20	98,96	98,82
MX/FJ898440/2003	26	125	143	138	117	126	141	151	155	190	129	145	129	131	135	189	174	141		98,55	98,59	98,64	98,31	97,10	98,13	98,20	98,46	98,30
VE/FJ639807/2005	27	143	158	155	135	144	66	167	166	209	147	160	143	145	147	115	194	155	154		99,04	99,35	98,18	96,94	98,01	98,91	98,29	98,17
US/EU529702/2003	28	135	153	149	131	138	90	161	165	200	141	154	137	139	143	139	191	149	150	102		99,10	98,24	96,97	98,02	98,70	98,44	98,30
CO/GQ868575/2004	29	134	149	144	126	135	45	158	162	201	138	151	134	136	138	104	183	146	144	69	95		98,26	96,98	98,10	98,97	98,38	98,24
BR/FJ850094/2008	30	114	125	120	118	105	179	130	136	177	112	146	112	106	108	229	204	116	179	193	187	184		97,21	98,13	97,84	98,58	98,42
BR/GU131865/2006	31	221	228	227	250	245	317	203	216	212	217	277	213	246	248	356	342	256	308	325	321	320	296		96,85	96,56	97,60	97,44
NI/JF937634/2010	32	150	158	154	106	145	194	170	170	215	148	129	148	150	154	240	228	160	198	211	210	201	198	334		97,68	98,21	98,07
CO/GQ868578/2007	33	181	194	193	173	180	102	201	209	248	185	196	181	181	181	149	229	191	191	116	138	109	229	365	246		97,93	97,81
BR/GU131878/2007	34	74	84	82	108	99	169	92	96	135	70	132	56	100	104	210	194	110	163	181	165	172	151	255	190	219		99,71
D1BR/RP20/2010	35	91	101	95	125	116	184	107	113	152	87	145	73	117	121	217	211	125	180	194	180	187	168	272	205	232	31	

Diferença de nucleotídeos

Figura 27. Identidade entre a sequência de toda a região codificadora de DENV-3 isolada em Ribeirão Preto e cepas isoladas no Brasil e em outros países dentro do genótipo III.

5.2.5.2 Análise filogenética

DENV-1

Da mesma forma que a análise filogenética baseada no gene da proteína E, os isolados D1BR/RP1/2011 e D1BR/RP6/2011 se encontram em dois grupos diferentes dentro do genótipo V de DENV-1, confirmando o resultado já apresentado (Figura 28).

Figura 28. Árvore filogenética baseada nas sequências de toda a região codificadora de DENV-1 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo de isolados de DENV-1 em Ribeirão Preto (os dois isolados estão marcadas com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio

O isolado D1BR/RP6/2011 se agrupou com cepas brasileiras isoladas no ano de 2010 no estado de Pernambuco e com uma cepa isolada na Venezuela no ano de 1998. O isolado D1BR/RP1/2011 está filogeneticamente relacionado com cepas brasileiras isoladas de 2000 a 2008, isoladas na região Norte do Brasil e também, no estado de São Paulo. Sugere-se também, como na análise do gene da proteína E, que estes isolados em Ribeirão Preto podem ter sido introduzidos no Brasil por países da América Central e Caribe.

DENV-2

A análise filogenética baseada no genoma completo mostrou que a cepa D2BR/RP17/2010 pertence ao genótipo IV (Americano/Asiático) juntamente com outros vírus isolados no Brasil (Figura 29). Este isolado está filogeneticamente mais relacionado com cepas brasileiras isoladas entre 2008 e 2010, com uma cepa da Jamaica isolada em 2007 e outra isolada na República Dominicana em 2003. Sugerindo-se assim que este isolado pode ter sido introduzido no Brasil por países da América do Sul, Central e/ou Caribe.

Figura 29. Árvore filogenética baseada nas sequências de toda a região codificadora de DENV-2 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-2 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleotídeos por sítio.

DENV-3

A análise filogenética baseada no genoma completo do isolado D3BR/RP20/2010 mostrou que este pertence ao genótipo III (Figura 30).

Figura 30. Árvore filogenética baseada nas sequências de toda a região codificadora de DENV-3 construída pelo método de Neighbor Joining. Árvore filogenética baseada nas sequências do genoma completo do isolado de DENV-3 em Ribeirão Preto (o isolado está marcado com ●) e sequências baixadas do Genbank de outros países e genótipos. O código das cepas significa: Iniciais do país de isolamento/Código de acesso no Genbank/Ano de isolamento. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi o Tamura Nei considerando uma taxa de variação com distribuição gamma ($G=1$). A confiabilidade da árvore filogenética foi apoiada pelo método de Bootstrap com 1000 réplicas. A barra de escala representa 0,05 variações de nucleótidos por sítio.

Este isolado está filogeneticamente relacionado com as cepas brasileiras BR/GU131878/2007, isolada no estado de São Paulo em 2007, BR/FJ913015/2001 isolada no Centro - Oeste brasileiro e também, com uma cepa BR/AY679147/2002 isolada no Rio de Janeiro. Além destas cepas brasileiras, se relaciona também com cepas isoladas no Brasil entre 2002 a 2008. Em relação a cepas isoladas em outros países, este isolado se relaciona filogeneticamente com cepas de Anguilla e Santa Lúcia, no Caribe. Estes dados corroboram com a análise do gene da proteína E, que sugere que esse isolado de Ribeirão Preto pode ter sido introduzido no Brasil por Ilhas do Caribe.

6 DISCUSSÃO

A dengue se tornou um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Nas últimas 3 décadas, o número de notificações de casos de dengue aumentou cerca de 4,6 vezes nas Américas (98). Assim, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre a enfermidade. Neste estudo, foi realizada a caracterização molecular dos vírus da dengue isolados entre 2010 e 2011 em Ribeirão Preto para que assim, as análises filogenéticas e evolutivas dos vírus fossem realizadas. A tentativa de isolamento viral foi realizada a partir de 79 amostras positivas para dengue que se encontravam estocadas a -80°C em nosso laboratório. Destas, 39 tiveram o isolamento confirmado por imunofluorescência indireta e/ou RT-PCR em tempo real. A falta de isolamento viral das demais amostras pode ter sido devido a um processo de degradação durante a estocagem das mesmas. Como o vírus da dengue é envelopado, a bicamada lipídica do envelope pode sofrer modificações estruturais com a variação de temperatura e pH, as glicoproteínas ancoradas na mesma ficam desarranjadas e o vírus perde a capacidade de se ligar a receptores celulares, deixando de ser infectivo. O sorotipo infectante já havia sido identificado previamente em 24 das 39 amostras com isolamento positivo, portanto para identificação do sorotipo viral nas 15 amostras restantes, parte do gene da proteína NS5 ou o gene da proteína E foram sequenciados. Dos vírus sequenciados, 13 apresentaram alta identidade com DENV-1, um com DENV-2 e outro com DENV-3. Portanto, os sorotipos 1, 2 e 3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011.

As análises filogenéticas e evolutivas foram realizadas a partir do gene da proteína E de 20 dos 39 vírus isolados: 15 de DENV-1, quatro de DENV-2 e um de DENV-3. A quantidade do produto amplificado do gene da proteína E dos 19 vírus não foi suficiente para o sequenciamento. A maioria destas amostras apresentou IFA negativa e carga viral baixa na técnica qualitativa de RT-PCR em tempo real.

Uma árvore filogenética foi construída incluindo os DENV-1 isolados neste estudo e outros isolados a nível mundial (Figura 17). Esta árvore mostrou que os DENV-1 se segregam em cinco genótipos, em concordância com os dados da literatura (40, 41). Os isolados brasileiros, incluindo os deste estudo, se agruparam com vírus do genótipo V, cujo ACMR teria surgido em 1962, entretanto a literatura sugere que o mesmo teria surgido entre 1935 e 1945 (49, 99). Esta diferença pode estar relacionada com as sequências utilizadas em nosso estudo, os quais não são exatamente iguais a aquelas utilizada na literatura. Os 15 DENV-1 isolados neste trabalho se dividiram em dois clados dentro do genótipo V: o grupo A2-1 e o grupo B

(Figura 20). Como pode ser observado na topologia da árvore filogenética, o grupo A2-1 surgiu a partir da evolução do DENV-1 que foi introduzido nas Américas em 1977 através da Jamaica (JM/AF425621/1977), provavelmente proveniente da Ásia ou da África (100-102). No Brasil, o DENV-1 foi introduzido em 1982 através da região Norte do país, tendo sido isolado pela primeira vez (BR/AF425613/1982) em Roraima (103), momento em que a campanha de erradicação do *Aedes aegypti* foi interrompida nas (100). Essa cepa isolada em 1982 encontra-se estreitamente relacionada com o vírus inicialmente introduzido nas Américas pela Jamaica. Em 1986, ocorreu uma nova epidemia de DENV-1 no Brasil, mais especificamente no Rio de Janeiro (70), representada pelos isolados BR/JN122280/1986 e BR/HQ026760/1986 na árvore filogenética, que posteriormente se espalhou para outras regiões do país e até países vizinhos como Paraguai e Argentina (Figura 20). Como pode ser observado nessa árvore, essa epidemia foi causada por uma nova linhagem de vírus (grupo A1), caracterizando uma substituição de clados com já havia sido descrito anteriormente (49, 104). O ACMR deste grupo teria surgido em 1986, confirmando que após a epidemia de 1986 no RJ, esses vírus se espalharam pelo restante do país e, inclusive, para países vizinhos como Paraguai e Argentina. Este vírus circulou no Brasil por aproximadamente 10 anos e depois ficou quase uma década sem ser detectado (49). Em 2008, houve uma reintrodução de DENV-1 no Brasil (104), representadas na árvore filogenética pelas cepas BR/FJ850093/2008 e BR/HM450104/2008 isoladas na região norte do Brasil, e constituída por uma nova linhagem de vírus estreitamente relacionadas com os vírus inicialmente introduzido nas Américas (grupo A2). Esses vírus introduzidos pelo norte do país se encontram estreitamente relacionadas com vírus isolados na Colômbia, na Venezuela e Caribe, corroborando com dados da literatura que sugerem que este grupo foi introduzido no Brasil a partir dessas regiões (49, 99, 100, 104, 105). Esses vírus foram responsáveis por epidemias em diferentes regiões do país entre 2010 e 2011 (49, 80, 100) atingindo inclusive Ribeirão Preto (grupo A21). Segundo a topologia da árvore, o DENV-1 introduzido em Ribeirão Preto em 2010 teria vindo de Rio de Janeiro e/ou de Pernambuco. O grupo B, onde se encontram os outros vírus isolados neste estudo, se relacionou estreitamente com cepas de Cingapura (SG/M87512/1990 e SG/EU081258/2005) e da ilha de Reunião no Oceano Índico (Figura 20), sugerindo serem estas as regiões de onde a nova linhagem de DENV-1 foi reintroduzida (99, 104). A diferença de outros casos, não houve substituição de clados ou de linhagens, entre 2010 e 2011 duas linhagens diferentes circularam em Ribeirão Preto. Os vírus isolados em Ribeirão Preto pertencentes ao grupo B teriam vindo do Rio de Janeiro devido ao estrito relacionamento com a cepa BR/HQ026762/2010 isolada nesse Estado. Além dos dois grupos onde se encontram os vírus isolados neste estudo, outras cepas brasileiras

foram observadas em outros clados da árvore, mostrando a substituição ou reintrodução de linhagens ao longo dos anos como descrito na literatura (49, 100).

A árvore filogenética dos DENV-2 mostra o agrupamento dos mesmos em 6 genótipos como descrito na literatura (Figura 18) (40, 42-44). Os vírus deste estudo e todos os outros vírus isolados no Brasil pertencem ao genótipo Americano/Asiático ou IV, o qual foi introduzido nas Américas na década de 80, inicialmente introduzido em Cuba, proveniente do Vietnã. O ACMR deste genótipo teria surgido em 1987, mais ou menos uma década depois daquela descrita na literatura que sugere que teria sido em 1970 (106). Esta diferença novamente poderia estar relacionada com a matriz de sequências utilizadas em nosso estudo que difere daqueles da literatura. Dentro deste genótipo, existem três linhagens brasileiras diferentes (53, 106, 107). No Brasil, o genótipo IV de DENV-2 foi detectado pela primeira vez em 1990 no Rio de Janeiro (BR/HQ012538/1990 e BR/HQ012533/1990), proveniente, provavelmente, do Caribe, espalhando-se posteriormente pelo restante do país. Em 2000, uma nova linhagem foi introduzida a partir novamente do Caribe. Entre 2007 e 2008, outra nova introdução de DENV-2 ocorreu no Brasil, e novamente uma linhagem diferente vindo do Caribe, dando origem ao grupo A2 (Figura 21) que incluem vírus isolados no Paraguai, no Peru e na Bolívia. Neste grupo se encontram os vírus isolados neste estudo provenientes da epidemia de 2010. Este grupo teria surgido em 2007 coincidindo com a introdução do vírus no Rio de Janeiro, de onde teria vindo o vírus para Ribeirão Preto.

Na Figura 19 podemos observar que o DENV-3 se dividiu em quatro genótipos, como descrito na literatura por Lanciotti e colaboradores (1994). A maioria dos vírus brasileiros se agrupam dentro do genótipo III, cujo ACMR teria se originado em Sri Lanka em 1981 similar a aquele descrito na literatura (108). O DENV-3 foi reintroduzido nas Américas em 1994, causando epidemias em Nicaragua e no Panamá, de onde se espalhou para o Caribe entre 1998 e 1999 e para a América do Sul em 2000 (85, 109). O DENV-3 circulante no Brasil pertence ao genótipo III (76, 110). Entretanto, estudos recentes têm indicado a circulação de vírus pertencentes ao genótipo I, Asiático (81, 111, 112). As epidemias de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 sempre começaram no Rio de Janeiro; entretanto, estudo filogenético realizado por nosso grupo mostrou pela primeira vez que o DENV-3 teria sido também introduzido pela Região Norte do país (85). O DENV-3 predominou na grande maioria dos estados do Brasil entre 2002 e 2006. O relacionamento filogenético dos DENV-3 observados na Figura 19 são similares a aqueles descritos previamente por nosso grupo (87, 110, 113). O DENV-3 isolado neste estudo de uma amostra de soro de paciente em 2010 se agrupou estreitamente com outros vírus isolados na cidade entre 2006 e 2009, e mais distante de outro vírus isolado na cidade em

2003 (grupo A3 Figura 22). Estes dados sugerem que o DENV-3 introduzido na cidade em 2003 tenha permanecido circulando sem a introdução de uma nova linhagem. Por outro lado, os DENV-3 isolados em Ribeirão Preto se encontram mas proximamente relacionados com vírus isolados em São José do Rio Preto. Este vírus estão proximamente relacionados com vírus isolados no Paraguai e na Bolívia e por sua vez a vírus isolados no Caribe, sugerindo que esta tido sido a origem de vírus como mostrado anteriormente (85). Foi observada também a presença de quatro linhagens brasileiras diferentes dentro deste genótipo, sugerindo-se então que houveram quatro introduções diferentes no Brasil (110, 114).

O genoma dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 apresentaram um tamanho de 10637, 10595 e 10605 pb, respectivamente, menores a aqueles descritos na literatura devido a que em nosso estudo as extremidades não foram validadas (115-117). O relacionamento filogenético observado analisando a região codificadora foi similar ao observado analisando o gene da proteína E para os DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Estudo realizado anteriormente por nosso grupo com o DENV-3 já tinha mostrado que qualquer gene viral pode ser utilizado para analisar o relacionamento filogenético (87).

As análises filogenéticas realizadas neste estudo mostram a ampla distribuição dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no Brasil. As diferentes linhagens de vírus mostram a constante movimentação viral a qual acontece, muito provavelmente, por transporte aéreo de mosquitos e/ou indivíduos infectados (118).

7 CONCLUSÕES

- 1- DENV-1, DENV-2 e DENV-3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011.
- 2- Todos os vírus introduzidos em Ribeirão Preto foram provenientes de vírus originados no Estado do Rio de Janeiro.
- 3- Duas linhagens do genótipo V de DENV-1, uma do genótipo Americano/Asiático de DENV-2 e uma do genótipo III de DENV-3 circularam em Ribeirão preto entre 2010 e 2011.
- 4- O relacionamento filogenético dos vírus foi similar independentemente do uso da sequência do gene da proteína E ou de toda a região codificadora do genoma viral.

8 REFERÊNCIAS

1. WHO. World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. 2009;Fact Sheet No. 117. Geneva.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. 1998;11(3):480-96.
3. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? J Hist Med Allied Sci. 1971;26(3):243-62.
4. KIMURA R, HOTTA S. On the inoculation of dengue virus into mice. Nippon Igaku. 1944;3379:5.
5. Siler JF, Hall MW, AP. H. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. Philipp J Sci. 1926;29:1-304.
6. Ashburn P, Craig C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. 1907. J Infect Dis. 2004;189(9):1747-83; discussion 4-6.
7. MARTÍNEZ E. Temas de actualidad. Current topics. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health. 2006;20(1).
8. Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, et al. Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. Emerging infectious diseases. 2005;11(5):742-9.
9. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Postgraduate medical journal. 2004;80(948):588-601.
10. WHO. World Health Organization 2012 [cited 2012]. Available from: <http://www.who.int/denguecontrol/en/>.
11. Perich MJ, Davila G, Turner A, Garcia A, Nelson M. Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. Journal of medical entomology. 2000;37(4):541-6.
12. Thavara U, Tawatsin A, Chansang C, Kong-ngamsuk W, Paosriwong S, Boon-Long J, et al. Larval occurrence, oviposition behavior and biting activity of potential mosquito vectors of dengue on Samui Island, Thailand. Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology. 2001;26(2):172-80.

13. Chen LH, Wilson ME. Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(5):775.
14. Tambyah PA, Koay ES, Poon ML, Lin RV, Ong BK, Group T-TDIS. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med*. 2008;359(14):1526-7.
15. Thaithumyanon P, Thisyakorn U, Deerojnawong J, Innis BL. Dengue infection complicated by severe hemorrhage and vertical transmission in a parturient woman. *Clin Infect Dis*. 1994;18(2):248-9.
16. Boussemart T, Babe P, Sibille G, Neyret C, Berchel C. Prenatal transmission of dengue: two new cases. *J Perinatol*. 2001;21(4):255-7.
17. Fatimil LE, Mollah AH, Ahmed S, Rahman M. Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34(4):800-3.
18. Sirinavin S, Nuntnarumit P, Supapannachart S, Boonkasidecha S, Techasaensiri C, Yoksarn S. Vertical dengue infection: case reports and review. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(11):1042-7.
19. Westaway E, Brinton M, Gaidamovich SYa, Horzinek M, Igarashi A, Kääriäinen L, et al. Flaviviridae. *Intervirology*. 1985;24(4):183-92.
20. LINDENBACH BD, THIEL HJ, RICE CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE DMaH, P.M., editor. *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1102-33.
21. Mukhopadhyay S, Kuhn R, Rossmann M. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
22. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7-16.
23. Damonte EB, Pujol CA, Coto CE. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Advances in virus research*. 2004;63:239-85.
24. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):318-28.
25. Lindenbach BD, Thiel HJ, Charles M. Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Wilkins LW, editor. *Fields Virology*. II. 5th ed2007. p. 1102-52.

-
26. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22.
 27. Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research*. 2008;80(1):11-22.
 28. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(9):1179-84.
 29. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(25):23698-708.
 30. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature medicine*. 1997;3(8):866-71.
 31. Kroschewski H, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 2003;308(1):92-100.
 32. Scherer W. The complexity of Arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. *Am J Epidemiol*. 1968;88(2):145-6.
 33. SABIN A. The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol Rev*. 1950;14(3):225-32.
 34. Russell P, McCown J. Comparison of dengue-2 and dengue-3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3. *Am J Trop Med Hyg*. 1972;21(2):97-9.
 35. Repik P, Dalrymple J, Brandt W, McCown J, Russell P. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32(3):577-89.
 36. Trent D, Grant J, Rosen L, Monath T. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*. 1983;128(2):271-84.
 37. Kerschner J, Vorndam A, Monath T, Trent D. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J Gen Virol*. 1986;67 (Pt 12):2645-61.

-
38. Vorndam V, Nogueira R, Trent D. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol*. 1994;136(1-2):191-6.
 39. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methods*. 1994;48(2-3):237-44.
 40. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93.
 41. Goncalvez A, Escalante A, Pujol F, Ludert J, Tovar D, Salas R, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*. 2002;303(1):110-9.
 42. Diallo M, Ba Y, Sall A, Diop O, Ndione J, Mondo M, et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2, Senegal, 1999-2000: entomologic findings and epidemiologic considerations. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(3):362-7.
 43. Lewis J, Chang G, Lanciotti R, Kinney R, Mayer L, Trent D. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993;197(1):216-24.
 44. Twiddy S, Farrar J, Vinh Chau N, Wills B, Gould E, Gritsun T, et al. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*. 2002;298(1):63-72.
 45. Lanciotti R, Lewis J, Gubler D, Trent D. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*. 1994;75 (Pt 1):65-75.
 46. Amarilla A, de Almeida F, Jorge D, Alfonso H, de Castro-Jorge L, Nogueira N, et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. *Virol J*. 2009;6:113.
 47. Lanciotti R, Gubler D, Trent D. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*. 1997;78 (Pt 9):2279-84.
 48. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett A, Watowich S, Gubler D, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*. 2000;74(7):3227-34.
 49. dos Santos F, Nogueira F, Castro M, Nunes P, de Filippis A, Faria N, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J*. 2011.
 50. Oliveira M, Galvao Araujo J, Ferreira OJ, Ferreira D, Lima D, Santos F, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):576-8.

51. Messer W, Gubler D, Harris E, Sivananthan K, de Silva A. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(7):800-9.
52. Zhang C, Mammen MJ, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol.* 2005;79(24):15123-30.
53. Rico-Hesse R, Harrison L, Salas R, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
54. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;315-41.
55. Kuno G, Gubler D, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ.* 1985;63(2):279-86.
56. de Moraes Bronzoni R, Baleotti F, Ribeiro Nogueira R, Nunes M, Moraes Figueiredo L. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2):696-702.
57. Deubel V, Laille M, Hugnot J, Chungue E, Guesdon J, Drouet M, et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods.* 1990;30(1):41-54.
58. Dos Santos HWG, Poloni T, Souza KP, Muller VDM, Tremeschin F, Nali LC, et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology.* 2008;80(8):1426-33.
59. Poloni T, Oliveira A, Alfonso H, Galvao L, Amarilla A, Poloni D, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010;7(1):22.
60. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):376-81.
61. Libraty D, Young P, Pickering D, Endy T, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-8.

-
62. Shope R. The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. Rio de Janeiro: Anais de Microbiologia; 1963. p. 167-71.
63. Guzman M, Vazquez S, Kouri G. Dengue: where are we today? *Malays J Med Sci.* 2009;4-11.
64. Webster D, Farrar J, Rowland-Jones S. Progress towards a dengue vaccine. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(11):678-87.
65. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2011;29(42):7229-41.
66. Guzman M. Thirty years after the Cuban hemorrhagic dengue epidemic of 1981. *MEDICC Rev.* 2012:46-51.
67. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines.* 2014;2(1):3-9.
68. McArthur MA, Sztein MB, Edelman R. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(8):933-53.
69. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983;25(1):53-4.
70. Schatzmayr H, Nogueira R, Travassos da Rosa A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.
71. Figueiredo L, Cavalcante S, Simões M. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ.* 1990;24(2):217-25.
72. FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. 2002.
73. Vasconcelos P, de Menezes D, Melo L, Pessoa E, Rodrigues S, da Rosa E, et al. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(3):253-5.

-
74. Nogueira R, Miagostovich M, Lampe E, Schatzmayr H. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(2):253.
75. Nogueira R, Miagostovich M, de Filippis A, Pereira M, Schatzmayr H. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):925-6.
76. Miagostovich M, dos Santos F, de Simone T, Costa E, Filippis A, Schatzmayr H, et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(8):869-72.
77. Casali C, Pereira M, Santos L, Passos M, Fortes BP, Ortiz Valencia L, et al. [The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):296-9.
78. Passos M, Santos L, Pereira M, Casali C, Fortes BP, Ortiz Valencia L, et al. [Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(4):293-5.
79. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2009. 2009.
80. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Julho de 2010. 2010.
81. Barcelos Figueiredo L, Batista Cecílio A, Portela Ferreira G, Paiva Drumond B, Germano de Oliveira J, Bonjardim C, et al. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(2):314-6.
82. Rodrigues E, Dal-Fabbro A, Salomão R, Ferreira I, Roccoc M, Da Fonseca BAL. Epidemiologia da infecção pela dengue em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2002.
83. Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto. Técnica de combate à dengue tem reconhecimento do Ministério da Saúde. Ribeirão Preto 2011 [cited 2011 05 de Março].
84. Distribuição dos casos de dengue autóctones segundo o município provável de infecção e casos importados de outros estados segundo o município de residência no Estado de São Paulo – ano 2013. [Internet]. 2013.
85. Aquino VH, Anatriello E, Goncalves PF, da Silva EV, Vasconcelos PFC, Vieira DS, et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;75(4):710-5.

-
86. Christenbury JG, Aw PP, Ong SH, Schreiber MJ, Chow A, Gubler DJ, et al. A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. *J Virol Methods*. 2010;169(1):202-6.
87. Alfonso HL, Amarilla AA, Goncalves PF, Barros MT, de Almeida FT, Silva TR, et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virology Journal*. 2012;9.
88. Posada D. ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Web Server issue):W700-3.
89. Swofford D. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sunderland, Mass: Sinauer Associates; 1998.
90. Nylander, JAA. MrModelTest v2. In: author Pdbt, editor. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Center, University of Uppsala; 2004.
91. Ronquist F, Huelsenbeck J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-4.
92. Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*. 2001;92(4):371-3.
93. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*. 2008;9(4):299-306.
94. Lemey P, Rambaut A, Drummond A, Suchard M. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(9):e1000520.
95. Drummond A, Ho S, Phillips M, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*. 2006;4(5):e88.
96. Rodríguez F, Oliver J, Marín A, Medina J. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol*. 1990;142(4):485-501.
97. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology Journal*. 2010;7.
98. San Martín J, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano J, Bouckennooghe A, Dayan G, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):128-35.

-
99. Villabona-Arenas C, Zanotto P. Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PLoS One*. May, 2013.
100. Carneiro AR, Cruz AC, Vallinoto M, Melo DeV, Ramos RT, Medeiros DB, et al. Molecular characterisation of dengue virus type 1 reveals lineage replacement during circulation in Brazilian territory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):805-12.
101. Pinheiro FP. Dengue in the Americas. 1980-1987. *Epidemiol Bull*. 1989;10(1):1-8.
102. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q*. 1997;50(3-4):161-9.
103. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.
104. Drumond BP, Mondini A, Schmidt DJ, Bosch I, Nogueira ML. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch Virol*. 2012;157(11):2061-73.
105. Pires Neto RJ, Lima DM, de Paula SO, Lima CM, Rocco IM, Fonseca BA. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(6):843-52.
106. Romano CM, de Matos AM, Araújo ES, Villas-Boas LS, da Silva WC, Oliveira OM, et al. Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS One*. 2010;5(7):e11811.
107. Drumond B, Mondini A, Schmidt D, de Moraes Bronzoni R, Bosch I, Nogueira M. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. *PLoS One* 8(3): e59422 2013.
108. Araújo J, Nogueira R, Schatzmayr H, Zanotto P, Bello G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):716-25.
109. Alfonso HL, Amarilla AA, Gonçalves PF, Barros MT, Almeida FT, Silva TR, et al. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virol J*. 2012;9(1):124.
110. Aquino V, Anatriello E, Gonçalves P, DA Silva E, Vasconcelos P, Vieira D, et al. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(4):710-5.

111. Vilela A, Figueiredo L, dos Santos J, Eiras A, Bonjardim C, Ferreira P, et al. Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(6):989-92.
112. Aquino V, Amarilla A, Alfonso H, Batista W, Figueiredo L. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. *PLoS One*. 2009;4(10):e7299.
113. Amarilla AA, de Almeida FT, Jorge DM, Alfonso HL, de Castro-Jorge LA, Nogueira NA, et al. Genetic diversity of the E Protein of Dengue Type 3 Virus. *Virology Journal*. 2009;6.
114. de Araújo JM, Bello G, Romero H, Nogueira RM. Origin and evolution of dengue virus type 3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1784.
115. Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, da Costa EV, Tavares FN, et al. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):307-13.
116. dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoso SP, Rey F, Deubel V, et al. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res*. 2002;90(1-2):197-205.
117. dos Santos F, Miagostovich M, Nogueira R, Edgil D, Schatzmayr H, Riley L, et al. Complete nucleotide sequence analysis of a Brazilian dengue virus type 2 strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002:991-5.
118. Nunes MR, Palacios G, Faria NR, Sousa EC, Pantoja JA, Rodrigues SG, et al. Air travel is associated with intracontinental spread of dengue virus serotypes 1-3 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2769.

ANEXO

1. Autorização nº 278 do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para a utilização de amostras de soro de pacientes neste projeto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 025/2013
kms

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2013.

Aos Pesquisadores
Adriana Moreira Soares
Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 117ª reunião ordinária realizada em 06.06.2013, o projeto de pesquisa intitulado *"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS VÍRUS DA DENGUE ISOLADOS EM RIBEIRÃO PRETO DE 2009 A 2012"*, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 278

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI M. MARZOCCHI MACHADO
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP