FELIPE SCASSI SALVADOR

Investigação de Mutações Adaptativas no vírus da Dengue em diferentes sistemas de cultivo

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Dra. Camila Malta Romano

São Paulo

2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Salvador, Felipe Scassi
Investigação de mutações adaptativas no vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2) em diferentes sistemas de cultivo / Felipe Scassi Salvador. – São Paulo, 2016.
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. VÍRUS DO DENGUE. 2. MUTAÇÃO. 3. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.

USP/IMTSP/BIB-06/2016.

Dedico essa dissertação a meus pais **Gervásio das Neves Salvador** e **Rosana Aparecida Scassi Müller Salvador**, que sem a dedicação, confiança, apoio e amor deles eu não seria ninguém.

Dedico a minha noiva **Gabriela Laginestra Francisco**, por todo seu carinho, amor e compreensão durante esses anos em que estive cursando o mestrado e escrevendo esta dissertação.

.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti, por me aceitar no Laboratório de Virologia e permitir que eu pudesse realizar este trabalho.

À Dra. Camila Malta Romano, pelos ensinamentos científicos e pessoais de valor incomensuráveis, pela paciência gigantesca e principalmente por sua orientação.

À Dra. Lucy Villas-Boas por seu carinho e por compartilhar seus valiosos conhecimentos em cultura celular.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza Ferreira e a Dra. Margareth Lara Capurro, pela possibilidade de ter trabalhado em conjuntos com seus respectivos grupos de pesquisa.

Ao Dr. André Luiz Costa-da-Silva e Prof. Dr. Jaime Henrique Amorim, pela parceria interlaboratorial, pelos conhecimentos obtidos e pela grande e valiosa amizade formada.

Aos meus pais Gervasio das Neves Sauvador e Rosana Aparecida Scassi Müller Salvador, por sempre acreditarem em mim incondicionalmente e serem meus pilares.

À minha noiva Gabriela Laginestra Francisco, pelo amor, carinho e companheirismo, sendo minha luz guia.

As “panteras” Maria Cristina Fink, Laura Sumita e Cynthia Canto, pelos momentos de descontração, pelas consultas psicológicas e pelos puxões de orelha.

A meus irmãos de laboratório, Luiz “Anão” da Silva Nali, Paulo Roberto Palma Urbano, por nossas “desventuras em série” e por todo o apoio ao longo desses anos no Laboratório de Virologia

Ao amigo Toni Martins, por não ter fugido do laboratório quando abri a porta para ele e por difundir sua sabedoria conosco.

As demais companheiras e amigas do grupo, Giovanna Caleiro, Cristina de Freitas Nunes e Ana Carolina Soares pelo companheirismo, amizade, discussões científicas e bandejões.

A todo o *staff* do Laboratório de Virologia, por dispor de seu tempo para me ensinar todos os pormenores da bancada

Aos saudosos amigos que já saíram do IMT Paulo Nasser, Cristiane de Campos Centrone e Cristina Mendes de Oliveira, por todo o companheirismo dessa anos que passamos juntos

Aos amigos da protozologia Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr e Dennis Fujita, por todo o apoio e aos momentos de descontração do cafezinho

Ao meu irmão postiço Bruno Katekawa e nossa “gange”, Diego “Hao”, Daniel “Choco”, André “Andy”, Johnatan “Hantei” por compreender os “rolês” perdidos e os sumiços necessários

Aos meus irmãos de trabalho, Profa. Alessandra Barone, Prof. Archangelo Padreca e Prof. José Manoel “Zema”, por todo o companheirismo.

Ao programa de pós graduação do IMT e a FAPESP pelo auxílio ao projeto

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Salvador, FS. Investigação de mutações adaptativas no vírus da Dengue em diferentes sistemas de cultivo (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, 2016

A Dengue é uma doença viral que atinge vários países, infectando milhares de pessoas anualmente. Sua transmissão ocorre pelo repasto sanguíneo feito pelas fêmeas dos mosquitos *Aedes sp.* infectadas e seus sintomas tem um amplo espectro de variação, que vão desde quadros assintomáticos até quadros graves com hipovolemia, podendo levar a óbito. A necessidade de adaptação do vírus a sistemas tão distintos (inseto e mamífero) restringe o espectro de variabilidade que o mesmo pode adquirir, permitindo que o vírus se adapte a ambos os hospedeiros com eficiência replicativa semelhante. Estudos com outros flavivírus já mostraram que a aquisição de variabilidade ocorre de maneiras distintas no hospedeiro mamífero e no inseto vetor, permitindo ao vírus máxima adaptação nas células infectadas. Levando em consideração estes estudos, este trabalho investigou a adaptação de duas cepas do vírus da dengue, a ACS-46, não neurovirulenta para camundongos adultos e a cepa JHA, neurovirulenta para camundongos adultos. O estudo foi feito utilizando cultura de células de mosquito (C6/36), cultura de células de mamífero (HepG2) e infecção em cérebro de camundongos neonatos. Utilizando sequenciamento de nova geração, foi possível verificar as mutações adquiridas ao longo de passagens em cada sistema de cultura. Foram realizadas 20 passagens seriadas em célula C6/36 e seis passagens alternadas entre C6/36 e HepG2. Os vírus obtidos na décima sexta e vigésima passagens do modelo seriado e na quarta e sexta passagens do modelo alternado foram completamente sequenciados utilizando a plataforma de sequenciamento em larga escala *Ion Torrent*. A análise das sequências revelou duas populações virais claramente distintas, já observadas a partir de décima sexta passagem, identificadas através da deleção de dois códons no sítio de glicosilação do domínio I da proteína de Envelope. Essa deleção induziu aumento na fusão do vírus à célula de mosquito, visto que a partir dessa passagem houve aumento no efeito citopático do vírus e na carga viral produzida durante infecções em células de mosquito. Contudo, essa mutação teve um perfil deletério em células humanas, fato deduzido pelo total

desaparecimento da população com a deleção durante as passagens alternadas. Além desta deleção, foram detectadas sete mutações não sinônimas em região de proteínas não estruturais com porcentagens muito próximas, sugerindo que as mesmas fazem parte de uma mesma população. A cepa JHA teve seu caráter neurovirulento perdido após 29 passagens em C6/36, porém rapidamente recuperado após uma única passagem em cérebro de camundongo neonato. O sequenciamento dos vírus dessas passagens mostrou certa variabilidade em sítios distintos entre as variantes do vírus parental, vírus não neurovirulento e vírus neurovirulento passado em camundongo. Esse resultado indicou que aparentemente, não há sítios específicos determinantes de neurovirulência em DENV2, ao menos no nosso modelo, mas sim, um conjunto de mutações podem levar ao fenótipo neurovirulento, a depender das condições as quais o vírus é exposto.

Descritores: Vírus do Dengue, Mutação, Sequenciamento Genético

ABSTRACT

Salvador, FS. Investigation of adaptive changes in Dengue virus in different culture systems (dissertation). Sao Paulo: Institute of Tropical Medicine of São Paulo University of São Paulo, 2016

Dengue is a viral disease that affects several countries, infecting thousands of people annually. It is transmitted by blood meal of the female *Aedes* sp mosquitoes infected. Symptoms have a wide range of variation, ranging from asymptomatic to severe symptoms, including hypovolemia and death. The need for adaptation in such distinct systems (insect and mammalian) restricts the variability that the viruses can acquire, allowing them to adapt to both hosts with similar replicative efficiency. Studies performed with other flaviviruses have shown that acquisition of variability occurs differently between the mammalian host and the insect vector, allowing the virus to adaptat in both systems. Therefore, this study investigated the adaptation of two strains of dengue virus, the ACS-46, not neurovirulent for adult mice and JHA strain, which is neurovirulent for adult mice. The study was done using mosquito cells culture (C6/36), mammalian cells (HepG2) and in vivo infection in newborn mouse brain. Using next-generation sequencing, we analyzed the mutations acquired over passages in each culture system. Twenty serial passages were conducted in C6/36 cells and six alternate passages between C6/36 and HepG2. Viruses obtained in the sixteenth and twenty passages from the serial experiment and the fourth and sixth passages from alternate model were completely sequenced using the next generation sequencing platform Ion Torrent. Sequence analysis revealed two clearly distinct viral populations observed from the sixteenth passage identified by deletion of two codons in the glycosylation site in the envelope protein domain I. This deletion led to increased fusion of the virus to mosquito cell, since the cytopathic effect increased from this passage to next as well as the viral load. However, this mutation had a deleterious profile in human cells since the mutated population was vanished during the alternate passages. It was also identified seven non-synonymous mutations in the region of nonstructural proteins with very similar percentages, suggesting that they belong to the same population. JHA strain lost the neurovirulent characteristic after 29 passages in C6/36, but quickly recovered it after a single

passage in newborn mouse brain. The sequencing of the virus of these passages showed some variability in different sites among the parental virus, not neurovirulent viruses and neurovirulent virus after the single passage in mice. These data indicated that apparently there is no specific determinants of neurovirulence in DENV2, at least in our model, but rather a set of mutations can lead to neurovirulent phenotype, depending on the conditions in which the virus is exposed.

Keywords: Dengue Virus, Mutation, Genetic Sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Áreas de risco de transmissão de dengue, 2015..... 1

Figura 2 - Posicionamento da poliproteína no Reticulo Endoplasmático e locais de clivagem com formação das proteínas virais..... 7

Figura 3 - Esquema mostrando os lobos da glândula salivar do Aedes aegypti. As setas pretas mostram o fluxo replicativo que os arbovírus seguem no interior de mosquitos do gênero *Aedes*. (1) e (2) repasto sanguíneo pelo mosquito fêmea com sangue infectado, passando pelo aparelho bucal, intestino anterior, chegando ao intestino médio (3) onde ocorrerá a replicação viral (4), levando a passagem pela lâmina basal, indo para hemocele e aumentando sua carga viral em órgãos adjacentes (5), chegando até a glândula salivar (6), onde em um próximo repasto sanguíneo a saliva contendo partículas virais será inoculada (7)..... 10

Figura 4 - Esquema da reação de qPCR mostrando como a fluorescência é liberada pela ação de exonuclease da *Taq* DNA polimerase. 24

Figura 5 - Preparo da Biblioteca para IonTorrent. Obtido de: *Use Guide: Ion Xpress™ Plus and Ion Plus Library Preparation for the AB Library Builder™ System*..... 27

Figura 6 -Seleção de fragmentos do tamanho adequado para a reação de sequenciamento utilizando *E-Gel*®. Poços 1, 2, 6 e 7 contendo amostras, 4º poço contendo peso molecular. A amostra com o peso molecular correto é arrastado pela trama do gel e fica acessível nos poços em região central do gel. O peso das amostras são identificados pelo peso molecular que corre junto as amostras..... 30

Figura 7 -Seleção de fragmentos utilizando *E-Gel*. O primeiro quadro mostra a aplicação das amostras no *E-Gel*® dentro da cuba de eletroforese própria, o segundo quadro mostra a corrida de eletroforese sendo iniciada e o terceiro quadro mostra a recuperação das amostras do tamanho específico utilizando o transiluminador que fica na cuba abaixo do gel..... 30

Figura 8 - Modelo de *chip* utilizado para sequenciamento na plataforma Ion Torrent 31

Figura 9 -Esquema representando a forma de detecção da alteração de pH realizada pela inserção de um nucleotídeo durante o processo de sequenciamento. 32

Figura 10 - Método utilizado para a montagem do consenso intrapopulacional utilizando a sequencia obtida do sequenciamento da passagem em célula como referência do mapeamento..... 34

Figura 11 - Fotomicrografia da diferença entre os efeitos citopáticos do vírus parental (A) e vírus na 16ª passagem (B) após 5 dias de infecção. 39

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose do material proveniente da reação *One Step RT-PCR* realizada em duplicata com primers A1, A2 e A3 do sobrenadante da 20ª passagem. Legenda: PM – Peso Molecular, A1 – Produto obtido com o primeiro par de primers, que abrange as regiões 28 à 4120, A2 - Produto obtido com o segundo par de primers, que abrange as regiões 3661 à 7749, A3 - Produto obtido com o terceiro par de primers, que abrange as regiões 6668 à 10644 41

Figura 13 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos obtidas através das montagens no programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*, com ênfase na região da perda dos nucleotídeos. Em vermelho destaca-se a região da perda de seis nucleotídeos (dois códons) na 16ª passagem 42

Figura 14 - Parte do alinhamento das sequências obtidas de cada população viral. A figura retrata a região onde houve reversão da deleção no sítio de glicosilação do envelope. 46

Figura 15 - Esquema representando as mutações em mais de 50% da população de uma passagem durante as passagens em cultura celular no genoma do vírus Dengue tipo 2 cepa ACS46. 49

Figura 16 - Resultado da qPCR feita em amostras obtidas de sobrenadante do experimento de *fitness* viral. Curvas padrão de 10e2 cópias/ml (F), 10e3 cópias/ml (E), 10e4 cópias/ml (D), 10e5 cópias/ml (C), amostra não mutada (B) e amostra mutada (A). 50

Figura 17 - Aumento no número e tamanho dos sincícios. Comparação entre infecção com cepa padrão ACS-46 (A) e infecção com cepa JHA (B) 52

Figura 18 - Alinhamento representando somente das regiões contendo mutações nas populações de baixa neurovirulência JHA_23, não neurovirulenta JHA_P29 (G780A, C1304T, C1833T, T2044C, A3025G, A4827G, G6165A , A7500G, G7931A e C8174T) e neurovirulenta JHA_29_IC (T7067C) de JHA tendo como referência a sequência do vírus JHA_parental. 55

Figura 19 - Arvore de máxima credibilidade (MCC) reconstruída pelo método bayesiano com sequencias do gene do envelope dos genótipos presentes dentro do sorotipo 2 do vírus da Dengue. As cores dos ramos representam os diferentes genótipos – vide legenda a esquerda. Os valores numéricos nos principais nós correspondem ao suporte dos ramos 59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxa de mutação da cepa ACS-46 obtida de células de mosquito (C6/36), células de humano (HepG2), mosquitos vivos e plasma de humano 51

Gráfico 2 - **Gráfico de sobrevivência.** O gráfico indica o percentual de sobreviventes após a inoculação das cepas JHA parental (JHA1) e 23ª passagem da cepa JHA em C6/36 (JHA1 p23). Os grupos de roedores Parental JHA1 e JHA1 p23 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU)..... 53

Gráfico 3 - **Gráfico de sobrevivência.** Percentual de sobreviventes após a inoculação das cepas JHA parental (JHA1) e JHA atenuado em C6/36 (C6/36 p29). Os grupos de roedores Parental JHA1 e C6/36 p29 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU)..... 53

Gráfico 4 - **Gráfico de sobrevivência.** Percentual de sobrevivência de roedores comparando as cepas JHA1 parental, JHA C6/36 p.29 e JHA p.1 em cérebro de roedor neonato. Os grupos de roedores Parental JHA1, C6/36 p29 e Cérebro p1 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU)..... 54

Gráfico 5 - Distância genética entre as sequências da Região de Envelope do JHA e outros genótipos de Dengue 2. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela - 1 - *Primers* e Sonda utilizados nas reações de qPCR descritos por Huhtamo[85] 25

Tabela - 2 - *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR *onestep* e Sequenciamento para Dengue 2. 26

Tabela - 3 - Principais variantes intrapopulacionais em porcentagem presentes na décima sexta e vigésima passagens 45

Tabela - 4 - Principais variantes intrapopulacionais em porcentagem presentes na décima sexta e vigésima passagens 48

Tabela - 5 - Populações detectadas em porcentagem nas passagens realizadas com a cepa JHA em células C6/36 e cérebro de camundongo neonato pelo método probabilístico de detecção de variantes 56

Tabela - 6 - Populações detectadas em porcentagem nas passagens realizadas com a cepa JHA em células C6/36 e cérebro de camundongo neonato pelo método detecção de variantes por qualidade. 57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Projetos Paralelos..... 81

Anexo 2 – Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA).. 84

Anexo 3– Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 16 em C6/36..... 85

Anexo 4– Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 16 em C6/36..... 86

Anexo 5 - Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 20 em C6/36..... 88

Anexo 6 - Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 20 em C6/36..... 89

Anexo 7- Tabelas de variantes obtidas pelo método probabilístico e de qualidade da passagem 4 em HepG2..... 91

Anexo 8– Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 6 em HepG2 92

Anexo 9- Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 6 em HepG2 93

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

SINAN – Sistema de Informação de Agravos e Notificação

IAL/SP – Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

DSSA – Dengue Sem Sinais de Alerta

DCSA – Dengue Com Sinais de Alerta

FD – Febre Clássica da Dengue

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

CSD – Síndrome de Choque por Dengue

C – Capsídeo

E – Envelope

prM – Proteína Precursora de Membrana

NS – Proteínas Não Estruturais

DI – Domínio I do Envelope

DII – Domínio II do Envelope

DIII – Domínio III do Envelope

M – Proteína de Membrana

UTR – Região não Traduzida do Genoma Viral

RNA – Ácido Ribonucleico

RE – Retículo Endoplasmático

INF α/β – Intérferon α e β

RDRP – RNApolimerase dependente de RNA

pH – Concentração Hidrogeniônica

CG – Complexo de Golgi

ADE – Incremento Dependente de Anticorpo

INF γ – Intérferon γ

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

VSV – Vírus da Estomatite Vesicular

SLEV – Vírus da Encefalite de St. Louis

WNV – Vírus do Oeste do Nilo

EEV – Vírus da Encefalite Equina

DENV2 – Vírus da Dengue Sorotipo 2

HepG2 – Linhagem Celular de Hepatocarcinoma Humano

C6/36 – Linhagem Celular de larva de mosquito *Aedes albopictus*

L-15 – Meio de Cultura Leibovitz

DEMEM – Meio de Cultura Eagle Modificado por Dulbecco

SFB – Soro Fetal Bovino

ATV – Tripsina e Versame Associados

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Reversa

MOI – *multiplicity of infection*

IgG – Imunoglobulina gama

HRP – *Horseredsh peroxidase*

PBS – Tampão fosfato-salino

DENV – Vírus da Dengue

UFP – Unidade Formadora de Placa

cDNA – DNA complementar

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirrubonucleotídeos fosfatados

ECP – Efeito Citopático

MCC – Máxima Credibilidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1
1.1. Histórico.....1
1.2. Epidemiologia.....2
1.2.1. Estado de São Paulo.....1
1.3. A Doença.....3
1.4. Patógeno.....4
1.5. Replicação viral.....6
1.6. Patogênese.....7
1.7. Vetores e Modo de Transmissão.....9
1.8. Adaptação DENV x Hospedeiro.....11
2. JUSTIFICATIVA.....15
3. OBJETIVOS.....16
3.1. Objetivo principal.....16
3.2. Objetivos específicos.....16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....17
4.1. Cepas virais.....17
4.2. Cultura celular.....17
4.3. Infecções.....18
4.3.1. Célula de Mosquito.....18
4.3.2. Célula de Mamífero.....18
4.3.3. Mamífero x Mosquito.....19
4.3.4. Infecção Alternada.....21
4.4. Atenuação e Readaptação à Neurovirulência.....21
4.5. cDNA e qPCR.....23
4.6. RT-PCR.....25
4.7. Sequenciamento.....26
4.8. Montagem das sequencias e Análise.....32
4.8.1. *Trimagem* dos *reads*.....33
4.8.2. ACS-46.....33

4.9. Teste de *fitness* viral.....35
4.10. JHA1.....36
4.10.1. Reconstrução Filogenética e Distância Partenogenética JHA.....36
5. RESULTADOS.....38
5.1. Cultura Celular ACS-46.....28
5.1.1. C6/36.....38
5.1.2. HepG2.....39
5.2. RT-PCR.....40
5.2.1. ACS-46 em C6/36.....40
5.2.2. ACS-46 em HepG2 – C6/36.....41
5.3. Análise do Sequenciamento.....42
5.3.1. C6/36.....42
5.3.1.1. Análises Interpopulacionais.....42
5.3.1.2. Análises Intrapopulacionais.....43
5.3.2. HepG2.....46
5.3.2.1. Análises Interpopulacionais.....46
5.3.2.2. Análises Intrapopulacionais.....47
5.3.3. Teste de *fitness* viral.....49
5.3.4. Taxa de Mutação.....50
5.4. Adaptação da cepa JHA1.....52
5.4.1. Atenuação – Passagens em C6/36.....52
5.4.2. Readaptação – Passagem em Roedor.....54
5.4.3. Sequenciamento cepa JHA1.....55
5.4.4. Reconstrução Filogenética.....58
6. DISCUSSÃO.....61
7. CONCLUSÃO.....70
REFERÊNCIAS.....72
ANEXOS.....81

1. INTRODUÇÃO

Das doenças virais de transmissão por artrópodes em humanos a dengue é a mais comum, atingindo mais de 100 países de regiões Tropicais e Subtropicais (Figura 1), que ao todo possuem cerca de 2,5 bilhões de habitantes, se tornando assim um dos maiores problemas em Saúde Pública. [1]

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 50 milhões de pessoas sejam infectadas pelo Vírus da Dengue anualmente nos países onde o vírus é endêmico e nas áreas de possível infecção. Destes casos, cerca de 500.000 são formas graves da dengue e 22.000 vão a óbito. [2]

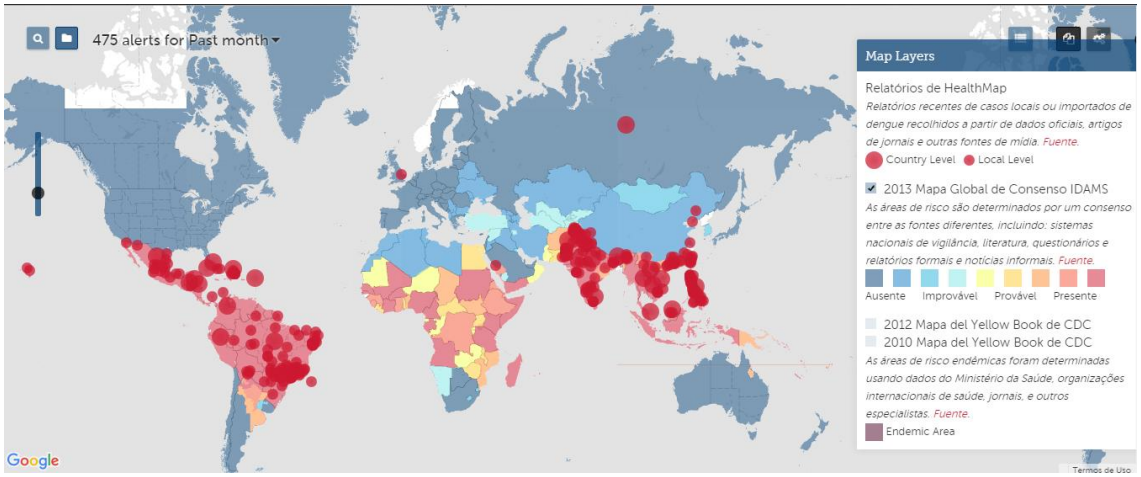

Figura 1 - Áreas de risco de transmissão de dengue, 2015. fonte: DengueMap: http://www.healthmap.org/dengue/pt/

1.1. Histórico

A primeira descrição de um provável surto de Dengue ocorreu na primeira metade do século 17, no ano de 1635 nas Ilhas Caribenhas, onde foi descrita uma doença muito parecida com dengue clássica, com os mesmos sinais e sintomas, sendo denominada como "coup de barre" que em português significa "queda súbita"[3]. Após este surto foram descritas epidemias no século 18 em Batávia (Jacarta), Cairo e Filadélfia que podem ser relacionadas à Dengue. [4,5]

Após vários surtos, epidemias e pandemias, o vírus da dengue foi isolado no ano de 1943 por Kimura e Schlesinger e dez anos depois, em 1953, o vírus foi isolado pela primeira vez nas américas, em Trinidad. A primeira grande epidemia de

Dengue Grave ocorreu em Cuba em 1981. A entrada do sorotipo 2 do vírus nesse país ocasionou 24 mil casos com sintomas hemorrágicos e 10 mil casos com evolução para choque hipovolêmico, levando 158 pessoas a óbito. [4–6]

No Brasil, por volta do século dezenove, há citações de surtos de uma doença que foi denominada polka, pois os enfermos apresentavam mialgia e artralgia, o que lembrava o estado de indivíduos que dançavam a polka. Este surto pode ter sido o primeiro no país, ocorrido no Rio de Janeiro no ano de 1846. Ainda no século 19 outros prováveis surtos foram descritos em regiões opostas do Brasil, o Sul e o Nordeste. Já no início do século 20 foram descrito surtos e epidemias caracterizados como sendo de dengue pela sintomatologia observada nos pacientes. [7]

1.2. Epidemiologia

No Brasil, mesmo sendo uma doença de notificação compulsória, tem-se um número de casos notificados muito abaixo da realidade nacional quando os dados provenientes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde são tabulados. Muito provavelmente isso se deve a uma forte negligência e descrença na gravidade desta doença. [8]

Com a análise dos dados epidemiológicos da dengue, podemos perceber que mesmo com a Implantação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação em 1998 em todo o país [9], aparentemente o funcionamento pleno deste sistema começou entre 2007 e 2008. Provavelmente durante os oito primeiros anos da implantação deste sistema, a Dengue era ainda subnotificada.

1.2.1. Estado de São Paulo

Em 1986, devido ao Programa de Vigilância Epidemiológica para Dengue, iniciado pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, a dengue tornou-se uma doença de notificação compulsória neste Estado. [10]

No mesmo ano da criação do programa de vigilância, os casos de dengue começaram a ser notificados, constatando-se no Estado a ocorrência de casos alóctones. Apenas em 1987 foi confirmada a transmissão autóctone do vírus [10,11], na

cidade de Vale do Ribeira, quando foi isolado e identificado no IAL/SP o sorotipo DENV-1. [12]

Nos anos de 1988 e 89 não foram notificados casos de dengue no Estado. No verão de 1990 e 91, em Ribeirão Preto, houve notificação e desde então o Estado de São Paulo tem registrado epidemias desta doença. [10]

1.3. A Doença

O quadro clínico de Dengue pode variar de assintomático a quadros hemorrágicos seguidos por choque hipovolêmico, podendo levar o paciente a óbito. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica clinicamente os casos de dengue em Dengue sem sinais de alerta (DSSA), Dengue com sinais de alerta (DCSA) e Dengue grave (DG). Essa classificação é facilmente aplicada para a clínica e fins epidemiológicos, contudo ainda há debates sobre uma nova classificação mais detalhada da patologia. [13–16]

No Brasil é utilizada a seguinte classificação clínica: Febre Clássica da Dengue (FD) para casos brandos, Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) / Síndrome do Choque por Dengue (SCD) para os casos graves caracterizados com extravasamento de plasma ou hemorragia severa e Dengue com Complicações para os demais casos onde os achados não se enquadram nos critérios da OMS de FHD e quando a classificação de dengue clássica é insatisfatória.[16]

No quadro de FD, o paciente apresentará sintomas comuns a infecções virais sistêmicas como cefaléia, dor retro orbital, mialgia/ artralgia, podendo apresentar exantema (maculopapular). Esse quadro sintomatológico aparecerá de 2 a 7 dias após a inoculação do vírus pela picada do mosquito. [17]

Os quadros de FHD/SCD tem início com uma febre alta repentina, que permanece por 2 a 7 dias, além de outros sintomas idênticos aos do dengue clássico. Há alteração significativa no número de plaquetas (≤ 100.000 plaquetas por μL), levando a uma tendência hemorrágica que se manifesta de diferentes formas como petéquias, equimoses ou púrpura; hemorragia das mucosas e hematêmese ou melena. [17]

Os quadros hemorrágicos por Dengue (FHD/SCD) podem ser classificados de acordo com a sua gravidade. Na FHD de grau I a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva, já na FHD de grau II estão presentes hemorragias espontâneas leves (sangramento de pele, epistaxe, gengivorragia e outros) além das manifestações presentes na de grau I. Os casos de SCD são classificados como grau III e IV onde há colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação, choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível respectivamente. [16]

O quadro de Dengue com Complicações reúne casos clínicos que apresentem alterações graves do sistema nervoso; disfunção cardiorrespiratória; insuficiência hepática; hemorragia digestiva; derrames cavitários; caso suspeito de dengue com evolução para óbito, mas sem todos os critérios de encerramento por FHD.[16,17]

A ocorrência de encefalite verdadeira devido à invasão direta do cérebro é rara e normalmente está associada a choque prolongado com acidose metabólica, distúrbios metabólicos, desequilíbrio eletrolítico, anóxia cerebral, edema cerebral, hemorragia intracraniana, e oclusão vascular. Suas causas não estão bem elucidadas, porém acredita-se que pode ser causada por insuficiência hepática aguda ou síndrome de Reye e edema cerebral.[17,18]

Os casos de lesão hepática estão relacionados diretamente com a replicação viral no órgão e devido aos sinais neurológicos, bem como a recuperação rápida do paciente, acredita-se que há manifestação de síndrome de Reye e não hepatite viral. [17]

1.4. Patógeno

O vírus da Dengue faz parte da família *Flavividae*, gênero *Flavivirus*. Possui 40 a 50 nm de diâmetro, com fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 10.700 pares de base, sendo recoberto por um envelope lipídico derivado principalmente da membrana celular hospedeira. É dividido imunologicamente em cinco sorotipos: DENV-1; DENV-2; DENV-3, DENV-4 e mais recentemente, DENV-5. [19,20]

Seu genoma codifica três proteínas estruturais, sendo estas: Capsídeo (C), Envelope (E) e Proteína Precursora de Membrana (prM). Também são codificadas sete proteínas não estruturais (NS) essenciais para a replicação viral: NS-1, NS-2A, NS-2B, NS-3, NS-4A, NS-4B e NS-5. [21]

A proteína E possui três domínios (DI, DII e DIII) que auxiliam na fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A função da proteína prM é proteger a proteína E de uma fusão acidental durante a passagem pelo Complexo de Golgi, onde é realizado o processo de maturação viral. Durante este processo a proteína precursora prM é transformada em Proteína de Membrana (M), rearranjando as proteínas do envelope, e permitindo assim a ligação da proteína E com a membrana da célula hospedeira. [6,22]

As proteínas não estruturais são de suma importância para a replicação viral, entretanto, as funcionalidades melhor conhecidas são das proteínas NS-2B, NS-3 e NS-5.

A funcionalidade da NS-1 na replicação ainda não é completamente conhecida, porém, Allonso e colaboradores, em estudo de microscopia eletrônica mostram a associação desta com partículas de RNA fita dupla, indicando importância nas fases iniciais da replicação. [23]

Ainda em outros estudos observou-se a interação da NS-1 com algumas proteínas ribossomais, aparentemente estimulando a transcrição e a ligação Ribossomo-Retículo Endoplasmático. [23,24] Além da importância na replicação, a proteína NS-1 parece estar relacionada com determinados processos fisiopatológicos que geram hemorragias e choque hipovolêmico nos pacientes com Dengue Grave e Dengue com Sinais de Alerta, possivelmente através de mimetismo molecular. [25]

A proteína NS2-A auxilia na montagem do virion e gera uma resposta antiviral inibindo a ação dos Interferon-α e Interferon-β, bem como é responsável pela ligação com a região 3’ UTR auxiliando na replicação viral [26–28]. Já a NS2-B, além de cofator para a região de protease da NS3, regula sua ação catalítica. [29]

A NS-3 funciona como uma serina protease (parecida com a tripsina), RNA helicase e RTPase/NTPase. Sua função de serina protease só é ativa quando ligado ao seu cofator, a proteína NS-2B, quebrando a as junções entre NS-2A/NS-2B, NS-2B/NS-3, da NS-3/NS-4A, NS-4B/NS-5 e também a junção C/prM. [25,29] Já a

função pertinente à replicação está ligada a sua função de RNA helicase/NTPase e RTPase, separando as fitas do RNA fita dupla formado durante a replicação e preparando o RNA viral para ser traduzido, bem como para montagem da partícula viral, onde a função de RTPase aparentemente é estimulada pela NS-5. [29–31]

A NS4-A altera a membrana do Retículo Endoplasmático (RE), facilitando a formação do complexo de replicação viral, além disso, liga-se a proteínas do citoesqueleto celular (vimentina) que formam complexos com o RNA fita dupla, formado durante a replicação viral. Além disso, ela serve como sinalizador para o posicionamento da NS4-B no RE. [32–34]

Após ser clivada da NS4-A por protease do hospedeiro, a NS4-B atuará no complexo de replicação juntamente com a NS3, aumentando sua atividade de helicase e reduzindo sua afinidade por RNA de fita simples. Contudo esta não é a única função da NS4-B, que possui ainda atividade supressora de Resposta Imunológica antiviral, inibindo a sinalização por INF-α/β e a ação de RNA de interferência. [35–37]

A proteína NS-5 é composta pelos domínios metiltransferase N-terminal e RNA polimerase dependente de RNA (*RdRp*) C-terminal. [38] O domínio RdRp realiza a síntese *de novo* de RNA, gerando um RNA de polaridade negativa a partir do molde de RNA viral de cadeia positiva. A fita negativa serve então como molde para a síntese de mais fitas de RNA de polaridade positiva, que serão utilizadas para a síntese de novas proteínas virais ou serão utilizados no empacotamento para formar novas partículas virais. [39]

1.5. Replicação viral em Humano

A partícula viral se adere e penetra na membrana das células alvo do hospedeiro através de receptores de endocitose mediada por clatrina. Deste grupo de receptores, o principal utilizado é o heparam sulfato. Após o processo de endocitose, a proteína E sofre trimerização, resultado do pH ácido do endossomo, levando a fusão entre envelope e membrana endossomal. [6,21,40] A fusão faz com que o nucleocapsídeo seja liberado no citoplasma, resultando na dissociação da proteína C e o RNA.

Uma vez liberado, o genoma é traduzido diretamente pelos ribossomos celulares, dando origem a uma poliproteína. Esta é direcionada para o Reticulo Endoplasmático (RE), onde é clivada por proteases do hospedeiro e por proteases formadas a partir da poliproteína viral após a clivagem feita pela célula hospedeira (Figura 2). [21,23]

Após a clivagem do polipeptídio, a proteína NS-5, uma RNA polimerase dependente do RNA viral, faz cópias do genoma viral (de sentido negativo), que servirão de molde para a síntese de novos RNA fita positiva, polimerizados pela mesma NS-5. [41,42]

A replicação viral ocorre ancorada a membrana do Reticulo Endoplasmático da célula hospedeira, na região onde está presente a poliproteína. Após a formação de novo RNA fita positiva, corre a ligação dele com as proteínas de capsídeo e o fechamento de uma vesícula na membrana do RE, formando a partícula viral imatura, que segue para o Complexo de Golgi (CG). No CG a proteína prM é transformada em M, sendo agora uma partícula viral madura, que é liberada para o meio extra celular. [42]

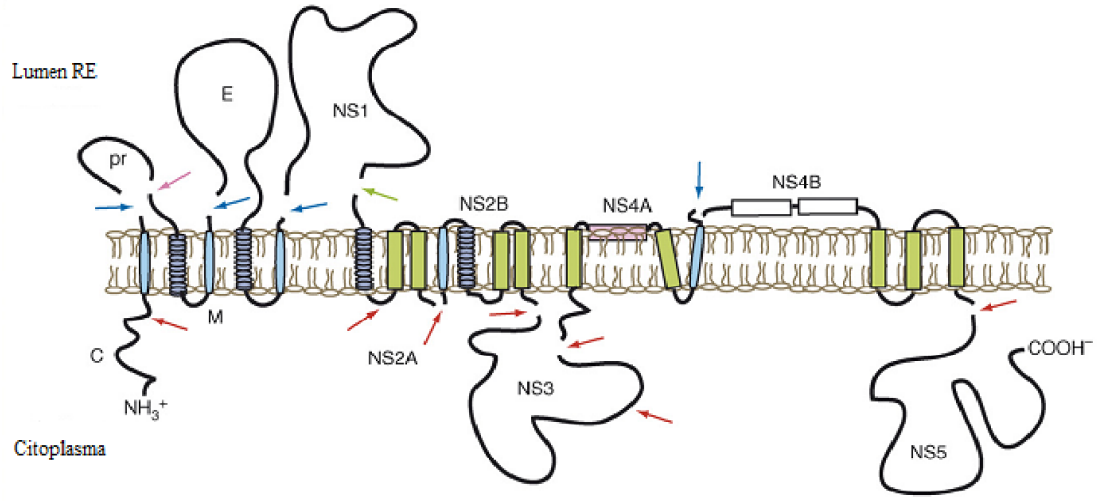

Figura 2 - Posicionamento da poliproteína no Reticulo Endoplasmático e locais de clivagem com formação das proteínas virais.
Imagem adaptada de Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. Curr Opin Microbiol. 2008 ;11(4):369-77.

1.6. Patogênese

Normalmente em primo-infecções o processo fisiopatológico está ligado a uma disseminação rápida e replicação das partículas virais em células e tecidos

permissivos, como monócitos e tecido linfoide, gerando uma infecção sistêmica, tendo como consequência uma inflamação generalizada.[43]

A interação das células fagocíticas infectadas com linfócitos T gera uma produção em grande quantidade de citocinas, levando a febres e queda no nível de plaquetas.[44]

Outras células como hepatócitos, células endoteliais, neurônios, linfócitos e células hematopoiéticas podem ser infectadas pelo vírus. Isso pode, evidentemente, levar a diferentes quadros patogênicos, como por exemplo, a encefalite por dengue.[18,45–47]

As formas mais graves da doença não estão temporalmente ligadas com o pico de viremia, mas paradoxalmente ligada a fase de convalescência, quando o sistema imune do hospedeiro está atuando contra o patógeno.[48]

Acredita-se que as formas hemorrágicas (FHD/SCD) ocorram principalmente em segundas e terceiras infecções, causadas por sorotipo diferente da primeira, o que leva a um processo denominado Incremento Dependente de Anticorpos (*Antibody Dependent Enhancement* - ADE), onde anticorpos produzidos contra o sorotipo causador da primeira infecção ligam-se ao sorotipo causador da infecção seguinte.[48]

Essa reação cruzada entre sorotipos caba aumentando a infectividade viral, pois os anticorpos não possuem ação neutralizante entre sorotipos diferentes, permitindo um aumento na velocidade e na quantidade de partículas endocitadas/fagocitadas pelas células mononucleares.[48–50] Esse aumento repentino na infecção de células monocíticas, culmina em um processo denominado Tempestade de Citocinas (*cytokine storm*), gerando uma liberação exacerbada de fatores pró-inflamatórios, principalmente Interferon γ (IFN-γ), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF-α), levando a um aumento da permeabilidade vascular.[48,50]

Além da resposta imune cruzada ou exacerbada do hospedeiro, fatores virais também podem estar relacionados ao nível de gravidade da doença. Certos genótipos ou linhagens dos sorotipos 2 e 3 de origem asiática parecem estar mais associados com FHD/SCD do que outros genótipos. Além da maior virulência, algumas cepas virais também podem apresentar uma infectividade maior no vetor *A. aegypti*.[51]

Mutações que permitam a glicosilação de proteínas virais também aumentam a sua capacidade de infecção em células dendríticas e macrófagos, bem como sua capacidade de replicação. Estas modificações ocorrem principalmente nas proteínas E, M e NS-1. Esta característica não é exclusiva do DENV, estando presente em grande parte dos arbovírus. Contudo, existem sítios proteicos diferentes no DENV.[51–53]

1.7. Vetores e Modo de Transmissão

A transmissão do vírus da dengue é vetorial, sendo feita por artrópodes fêmeas da família *Culicidae*, gênero *Aedes*, as fêmeas desses culicídeos necessitam fazer repastos sanguíneos para maturação de seus ovos, sendo esta a fonte de infecção dos artrópodes pelo vírus da dengue caso se alimentem de um hospedeiro com viremia.[54,55]

Após o repasto é necessário que o vírus infecte as células do intestino médio do inseto entre 4 a 8 horas, pois após esse período será secretada por essas células epiteliais uma estrutura de quitina que revestirá o intestino com fins de proteção contra patógenos e toxinas. [56]

Após essa primeira etapa de replicação, os vírus necessita atravessar a lâmina basal que envolve o intestino médio do mosquito para em seguida propagar-se pelo sistema circulatório do vetor através da hemolinfa. Essa passagem ainda não está muito bem elucidada, porém sabe-se que a infecção das células do intestino do mosquito *Culiseta melanura* pelo Vírus da Encefalite Equina do Leste em faz com que a integridade da membrana basal seja alterada permitindo que o vírus atinja a hemocele. [54–57]

Além do intestino, os arbovírus precisam se replicar em outros tecidos do artrópode para assegurar uma carga viral considerável para infecção das glândulas salivares, replicando no tecido adiposo, hematócitos e sistema nervoso dos artrópodes. [56,57] Assim, após a replicação principalmente na hemolinfa, as partículas virais infectam as glândulas salivares, que são órgãos lobulados, contendo três lobos (figura 3) e dispostos aos pares na região torácica do mosquito. Aparentemente nem todos os arbovírus infectam todos os lobos de cada glândula. O vírus da Dengue é

capaz de infectar a glândula por inteiro, iniciando a infecção pelos lobos laterais distais, que estão relacionados com a produção de substâncias que auxiliam no repasto sanguíneo [56], terminando o ciclo replicativo dentro do vetor (figura 3) e tornando essa fêmea um transmissor do vírus.

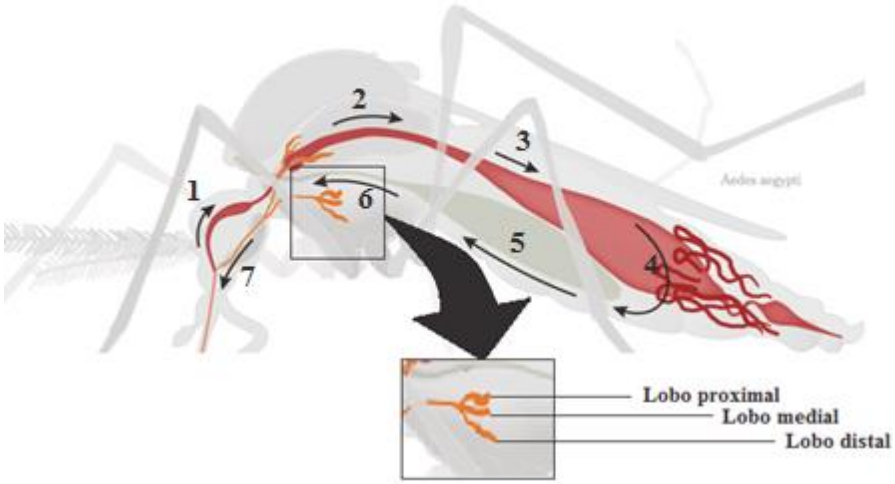

Figura 3 - Esquema mostrando os lobos da glândula salivar do Aedes aegypti. As setas pretas mostram o fluxo replicativo que os arbovírus seguem no interior de mosquitos do gênero *Aedes*. (1) e (2) repasto sanguíneo pelo mosquito fêmea com sangue infectado, passando pelo aparelho bucal, intestino anterior, chegando ao intestino médio (3) onde ocorrerá a replicação viral (4), levando a passagem pela lâmina basal, indo para hemocele e aumentando sua carga viral em órgãos adjacentes (5), chegando até a glândula salivar (6), onde em um próximo repasto sanguíneo a saliva contendo partículas virais será inoculada (7).
Modificado de http://www.nytimes.com/interactive/2016/health/what-is-zika-virus.html?_r=0

Existem três espécies de *Aedes* conhecidamente vetores da dengue: *A. aegipty, A. albopictus e A. polynesiensis*. Dentre as três espécies de vetores, duas estão presentes no Brasil: *A. aegypti e A. albopictus*. [58,59]

O principal vetor nas Américas é, sem dúvida, o *A. Aegypti*. Isso se deve a realização de seus repastos durante o dia, nos períodos da manhã e final da tarde e ser encontrado em áreas tropicais e subtropicais, com um habitat que varia desde áreas silvestres até áreas urbanas. Em áreas urbanas, consegue alojar-se nas casas, utilizando como criadouros recipientes artificiais com acúmulo de água limpa como, por exemplo, vasos de flores, pneus expostos à chuva e caixas d'água destampadas, contudo já foram encontradas larvas em água poluída. [58–61]

A. albopictus possui origem Asiática e foi introduzido nas Américas em 1980. Habita áreas de transição de regiões silvestres com propriedades rurais, não sendo até o momento considerado como um vetor urbano no Brasil. Contudo, em países onde não há ocorrência de *A. aegypti* como Japão e China, o *A. albopictus* desempenha o papel de vetor da Dengue. [7,58]

1.8. Adaptação DENV x Hospedeiros

Os vírus de RNA possuem um processo evolutivo extremamente rápido devido principalmente a altas taxas de mutação, que são de suma importância para a sua sobrevivência pois pode levar ao aparecimento de características benéficas como melhoria no processo replicativo, resistência a antivirais e até mesmo cruzando a barreira entre espécies . [62–65]

É descrito na literatura que as taxas mutacionais dos vírus em geral, podem variar de 10e-8 (vírus de DNA) até 10e-3 (retrovírus), onde os vírus com genoma composto por RNA (não retrovírus) possuem taxas que variam entre 10e-6 a 10e-3.[64,66]

Essas altas taxas observadas nos vírus de RNA proporcionam uma grande plasticidade adaptativa, pois os vírus possuem capacidade de gerar uma população muito grande em um curto espaço de tempo. Assim devido as taxas mutacionais mais elevadas, essas novas populações podem apresentar uma alta variabilidade.[65]

Contudo, o acúmulo de mutações observadas nos arbovírus não possui a mesma velocidade que nos demais vírus de RNA, como por exemplo, o vírus da hepatite C, HIV e poliovírus, que possuem taxas entre 10e-4 a 10e-5 mutações por nucleotídeo por cópia genômica.[67–72]

Dados obtidos através de pirosequenciamento do genoma completo da cepa de DENV-2 presente na epidemia que acometeu a cidade de Santos em 2010 comprovam essa baixa frequência de mutações da população viral intra-hospedeiro, revelando uma grande estabilidade genômica da população viral amostrada no plasma de indivíduos infectados. [69] Muito provavelmente a alternância entre hospedeiros taxonomicamente distintos, aliada a uma possível maior fidelidade da RNA polimerase viral são as causas da estabilidade genética observada nos

arbovírus, incluindo o Dengue. [68,72–74] Além da interação com o hospedeiro vertebrado o arbovírus precisa se adaptar ao organismo do hospedeiro artrópode, tanto para escape de seu sistema imune inato, quanto para adaptação para entrada e multiplicação eficiente nas células de mosquito. [67,75]

Contudo, a adaptação parece ser mais crítica nas células de vertebrados, pois mutações no sítio de glicosilação do domínio I do envelope acabam impedindo a entrada do vírus em células de mamífero, mas não alteram ou até mesmo aumentam a capacidade de fusão do vírus a célula de artrópode. Essas diferenças podem ser explicadas pela diferença entre os receptores de membrana utilizados pelo vírus para entrada em células de mamífero e de artrópode.[40,67,72,76]

A capacidade de replicação de um arbovírus deve ser igualmente eficiente em ambos os ambientes (vertebrado e invertebrado), o que em ultima análise, limita a adaptação a apenas um tipo de hospedeiro. A alternância de hospedeiros acarreta em ausência de adaptação a um hospedeiro específico, o que leva a geração de vírus "generalistas" (*trade-off hypothesis*). [70]

Provavelmente esta característica é proveniente das substituições que beneficiam a manutenção do vírus em ambos os hospedeiros ou que sejam neutras, evitando assim a especificidade do vírus a um único hospedeiro.[70] Assim, as variantes geradas durante a replicação viral devem tais que não prejudiquem a replicação em um dos ambientes (vertebrado/invertebrado), caso contrario, o ciclo de transmissão não será completado.

Diversos estudos sobre evolução experimental em arbovírus sugerem fortemente que, enquanto sua evolução é primariamente dirigida pela alternância de hospedeiros, a pressão adaptativa é imensamente maior no hospedeiro vertebrado, onde por sua vez o vírus pode sofrer maior expansão e adquirir maior diversidade. [67,77,78]

Em estudo realizado com o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV) a taxa de mutação obtida é maior em células de mamífero do que em células de mosquito. [62] Já em estudo com Vírus da Dengue foram observadas taxas de mutação semelhantes entre hospedeiro e vetor. Contudo as metodologias utilizadas para a avaliação das mutações nesses estudos são diferentes. No primeiro foi observada a perda de mutação de resistência a anticorpos após uma única passagem em diversos tipos

celulares, enquanto o segundo avaliou passagens consecutivas em células, dez passagens em mosquitos, dez passagens em mamífero e dez passagens alternado entre mosquito e mamífero (totalizando 20 passagens) observando o aparecimento de mutações. [62,71]

Já em estudo in vivo com o Vírus da Encefalite de St. Loius (SLEV), foram realizadas passagens consecutivas (20x) em *Culex pipiens* e em galinhas, visando a melhora do *fitness* viral por mutações adaptativas. Este estudo demonstrou uma melhora no *fitness* viral durante as passagens feitas nas aves, onde uma população apresentou maior viremia em aves e outra cepa apresentou aumento no tamanho da placa formada durante a titulação. Além disso, a população que causava maior viremia nas aves, também tinha o *fitness* aumentado para mosquitos, aumentando a carga viral gerada durante a infecção em *Cx pipiens*.[67]

Em estudo realizado com Vírus do Nilo Ocidental (WNV), após realizar passagens consecutivas em pintinhos e em mosquitos e passagens seriadas entre mosquitos e pintinhos foi analisado o fitness viral através de titulação em placa. Foi observado um aumento no *fitness* dos vírus que sofreram passagens seriadas em pintinhos, tanto em aves quanto em mosquitos, já nas passagens seriadas em mosquito, houve um decréscimo no *fitness* quando inoculado novamente em aves. [79]

Estes estudos reforçam as hipóteses sobre uma menor taxa de mutação de arbovírus, forte seleção pela alternância de hospedeiro e maior pressão adaptativa em células dos hospedeiros vertebrados. Contudo, quando são feitas muitas passagens em células de mosquito, por mais permissivas que sejam, o vírus também tende a acumular mutações que aumentam sua afinidade por essas células. [67,68,70,79]

Juntamente com as características já citadas que influenciam na baixa taxa de mutação e adaptação dos arbovírus, o efeito gargalo (*bottlenecks*) contribui para a eliminação de variantes dentro de uma epidemia, levando a uma homogeneidade genética. [70,80] No efeito gargalo, uma pequena quantidade de partículas virais são inoculadas pelo artrópode no mamífero ou uma pequena quantidade de partículas virais são carregadas durante a alimentação do vetor no mamífero infectado, aumentando as chances de que tais partículas reflitam as majoritárias no vetor ou no hospedeiro. [81]

Juntamente com o efeito gargalo na transmissão, há o efeito gargalo intra vetor, pois a disseminação pelos órgãos e hemolinfa depende da passagem por lâminas basais, limitando a entrada viral, vide item 1.7 da Introdução para detalhes. [81]

Além da adaptação que pode ocorrer entre hospedeiros taxonomicamente distintos, podem ocorrer mutações adaptativas em hospedeiros de mesmo gênero, como ocorrido recentemente com o vírus Chikungunya. Foi observado que o vírus não só migrou do hospedeiro *A. aegypti* para o *A. albopictus*, mas ao fazê-lo, aumentou seu *fitness* para esse segundo vetor com alteração apenas em um aminoácido no gene env. [82,83]

Outro caso de mutação adaptativa relacionada com hospedeiros artrópodes foi relatado em epidemias do vírus da Encefalite Equina Venezuelana (EEV), ocorridas em equinos no México, nos anos de 1993 e 1996. Estas epidemias foram provocadas por um subtipo selvagem da EEV que acometia apenas roedores e passou a acometer os equinos, saindo do seu ciclo selvagem. Esta entrada no ciclo zoonótico/epizoótico urbano foi provocada por uma mutação que levou a adaptação deste subtipo aos vetores urbanos, passando do *Culex* spp. (vetor silvático) para o *Ochlerotatus taeniorhynchus* (vetor “urbano”) aumentando a chance de transmissão aos equinos e uma preocupante probabilidade de transmissão aos humanos. [84]

2. JUSTIFICATIVA

Assim como o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e diversos outros arbovírus, o Dengue experimenta alternância de hospedeiros taxonomicamente distintos, o que invariavelmente deve impactar no seu *fitness* geral. Essa troca de hospedeiros em um curto espaço de tempo, como no caso de uma epidemia, onde ha abundância de hospedeiros infectados e de vetores disponíveis permite que o vírus seja transmitido após relativamente pouco tempo de replicação no hospedeiro e, portanto, o ganho de variabilidade deve ser ainda mais restrito. Além disso, os constantes gargalos populacionais sofridos a cada evento de transmissão (dois para cada hospedeiro humano infectado) contribui para essa diminuição de variabilidade.[69] Entretanto, pouco se sabe a respeito do ganho/perda desse *fitness* se o vírus puder ser submetido a um período de replicação mais longo em um determinado hospedeiro.

Estudos no campo da imunologia têm apontado novos e intrigantes mecanismos de defesa que ainda não estão adequadamente decifrados, e que podem por sua vez, ser decisivos na progressão para DG. Por outro lado, os vírus possuem estratégias que podem interferir com essas defesas, escapando eficientemente ou produzindo cepas com maior virulência e capacidade replicativa.

Assim, uma maior compreensão das regiões e/ou sítios mais propensos a adquirir substituições de caráter adaptativo frente a condições distintas é crucial para um melhor entendimento da biologia do dengue e dos arbovírus em geral.

Os dados gerados nesse estudo podem ajudar na avaliação do impacto da alternância de hospedeiros na dinâmica e na variabilidade viral através do estudo do genoma da poliproteína viral (genes estruturais e não estruturais) após sucessivas passagens em células de vertebrado e invertebrado, Os resultados gerados aqui contribuirão para o discernimento entre o que é resultado da pressão seletiva diferencial de cada hospedeiro, qual a importância das substituições adquiridas e quanto é simplesmente fruto da falta de fidelidade da RNA polimerase.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Estudar a evolução do vírus da dengue sorotipo 2 em diferentes sistemas de cultivo.

3.2. Objetivos específicos

- Observar eventuais mutações em cepa padrão durante passagens seriadas em diferentes sistemas: células provenientes de larvas de *Aedes albopictus* (C6/36) e células humanas de linhagem de hepatocarcinoma (HepG2);
- Observar mutações em cepa neurovirulenta de DENV2 em passagens em diferentes sistemas: Células C6/36, Células HepG2 e camundongos Balb/c
- Avaliar o caráter adaptativo das mutações encontradas

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Cepas virais

A cepa viral utilizada no experimento em passagens consecutivas de células foi à cepa de referência de DENV-2 de genótipo Americano-Asiático do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, denominada ACS-46. Esta cepa foi obtida em um estudo realizado por nosso grupo em 2010 com amostras de uma epidemia na cidade de Santos, depositada no GenBank com o numero de acesso JX286516 (de plasma humano) e JX286517 (apos isolamento e passagem em célula C6/36).[69]

Já a cepa utilizada no experimento com passagem em camundongos foi a mesma utilizada por Amorim e colaboradores, denominada JHA1, pertencente ao genótipo Americano e proveniente de um paciente com Dengue sem sinais de alerta.[25]

4.2. Cultura celular

Para os experimentos de inoculação viral foram utilizadas as linhagens celulares:1) Células C6/36, derivadas de larva mosquito *Aedes albopictus*, mantidas em Meio Leibovitz (L-15) suplementado com 10% de soro fetal bovino; 2) Células HepG2, originárias de hepatocarcinoma humano, mantidas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As células de mosquito foram mantidas a 28ºC e a célula humana foi mantida a 37ºC com concentração de 5% de CO_2. As passagens foram realizadas utilizando $3x10^6$ células/mL para que houvesse a confluência esperada de 80% da superfície da garrafa para a infecção após 24 horas do repique.

O repique de C6/36 aplica como método de soltura das células a utilização de um auxiliador *Scrap* com 1 mL de meio L-15 à 10% de SFB. Já o método de soltura das células HepG2 utiliza 1 mL de solução de Tripsina e Versene Associadas (**ATV**)

por 15 minutos (Instituto Adolfo Lutz, associação de Tripsina à 0,2% e Versene à 0,02%).

4.3. Infecções

Os experimentos de infecção foram realizados de três maneiras: 1) Infecção seriada em células de Mosquito; 2) Infecção seriada em células de Mamífero; 3) Infecção alternada em células de Mosquito e Mamífero

4.3.1. Célula de Mosquito

Para a realização dos experimentos de infeção em C6/36, as células foram cultivadas de acordo com os padrões descritos no item 4.2. O meio de cultura foi desprezado e em seguida adicionado 200µL do estoque viral da cepa ACS-46. Em seguida a garrafa permaneceu em estufa a 28ºC por 1 hora para a adsorção das partículas virais nas células.

Após o período de adsorção viral, foi adicionado 5mL de meio L-15 com 5% de soro fetal bovino para manutenção da célula e em seguida a garrafa retornou novamente a estufa a 28ºC.

A cultura foi observada diariamente para acompanhar a formação de efeito citopático e após sete dias de infecção o sobrenadante foi coletado e congelado. Além da observação de efeito citopático, o RNA viral dos sobrenadantes foram extraídos com o auxilio do kit de extração *QiAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) e submetidos a RT-PCR *one step,* de acordo com o descrito por Romano *et al.* [69]

Após a confirmação de infecção, utilizamos o sobrenadante para realizar novas infecções seriadas.

4.3.2. Célula de Mamífero

Para os ensaios de passagens seriadas em célula de mamífero, foram testadas várias linhagens, como VERO (célula de rim de macaco verde Africano) e Huh7 (célula de hepatocarcinoma humano oriental) além da célula HepG2, utilizada nas

infecções alternadas em nosso estudo, por vários meses. Tivemos dificuldades para realização de passagens seriadas de nossa cepa ACS-46 em células de mamífero pois a carga viral obtida a cada passagem decaía a ponto de não existir mais vírus na terceira ou quarta passagem

Devido a impossibilidade de infeção seriada em células de mamífero, estes experimentos foram descontinuados.

4.3.3. Mamífero x Mosquito

Foram realizadas passagens alternadas entre células de mamífero (HepG2) e de mosquito (C6/36). Com esta metodologia, pudemos mimetizar as pressões sofridas pelo vírus pela alternância em hospedeiros taxonomicamente distintos dentro de seu ciclo biológico.

O método utilizado para a infecção em HepG2 e C6/36 foi o mesmo descrito no item 4.3.2, utilizando meio de cultura DMEM para as células de mamífero e L-15 para a de inseto. Contudo, as células HepG2 ao serem infectadas com Dengue não apresentaram efeito citopático evidente como o das infecções em C6/36. Assim, foi necessária a utilização de métodos para determinar a infecção nesta linhagem celular.

4.3.3.1. Determinação dos padrões de infecção da HepG2

Devido aos problemas durante os experimentos de infecção em células de mamíferos, decidimos utilizar o protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) descrito por Huhtamo[85] para confirmar a infecção das células HepG2 e ao mesmo tempo quantificar a carga viral obtida a cada passagem na infecção seriada.

Diferentemente da infecção por C6/36, onde utilizamos o inoculo com MOI estimado em 1,0 e nossa cepa não apresentava decréscimo de carga viral, optamos pela utilização deste protocolo de qPCR pois somente o RT-PCR não seria capaz de quantificar a carga viral para verificarmos se a infecção foi bem sucedida.

Contudo, a quantificação do material genético por RT-PCR não pode ser utilizada sozinha para estimar o número de partículas viáveis para a infecção das

células, assim comparamos os resultados obtidos por qPCR com resultados obtidos por titulação em placa em células LLC-MK2, realizados em estudos feitos pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Além desta comparação, realizamos um experimento para estabelecer a quantidade de partículas virais utilizadas para infectar a linhagem HepG2. Segundo Pattanakitsakul *et al* [86] ao utilizar MOI igual a 0.1, 0.5 e 1.0 obtêm-se infecção de 30%, 70 e 80% das células HepG2 respectivamente.

Para a estimarmos o MOI, modificamos o protocolo de captura de antígenos em célula descrito por Das, S [87] com o intuito de observar qual a melhor relação entre quantidade de cópias virais e o número de células para obtermos uma infecção viável das células.

Assim, células HepG2 foram cultivadas em uma placa para cultivo celular de 24 poços com $2x10^5$ células por poço, que equivalem a 80% de confluência. Após 24 horas foram inoculados sobrenadantes contendo vírus quantificados por qPCR com 10^7, 10^6, 10^5 e 10^4 cópias virais.

Após cinco dias de infecção o sobrenadante das células foi coletado e as células foram fixadas utilizando uma mistura de Acetona e Metanol 1:1 por 1 hora à 4ºC. Após esse processo o fixador foi retirado e a placa foi lavada 3 vezes com 1mL de PBS 1x. Em seguida, foi preparada a solução com soro hiperimune com concentração de 1:1000 de anticorpo IgG humano para dengue 2, substituindo o anticorpo monoclonal de roedor, em solução de leite em pó desnatado a 5%, substituindo o Blotto utilizado no protocolo original.

Foram adicionados 400uL dessa solução em cada poço, seguido de incubação por 1 hora à 37ºC. Após esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1x. Em seguida foi adicionado o conjugado anti-IgG humano com HRP (DAKO Cat#P0214) em solução de leite em pó desnatado a 5%, sendo incubado à 37ºC por 1 hora e lavado 3 vezes com PBS1x após a incubação.

Ao término da lavagem, foi adicionado o substrato, composto por um tablete (10mg) de DAP (SIGMA Cat# D5905) dissolvido em 20mL de PBS 1x com 8uL de peróxido de hidrogênio e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a última incubação, o substrato foi retirado, água destilada foi

adicionada para interromper a reação e por fim, o experimento foi lido em microscópio ótico invertido.

Os resultados desse experimento foram comparados com dados descritos na literatura sobre infecção de dengue em HepG2 [86], juntamente com a quantificação do vírus por qPCR e a titulação em placa. Com isso pudemos observar a diferença de dois logs entre a quantificação de número cópias de genomas virais entre os dois métodos. Finalmente, assumimos que 10^6 cópias genômicas é portanto equivalente a 10^4 partículas virais viáveis.

Desta maneira, para realizar a quantificação de partículas virais, optamos pelo método molecular (qPCR) devido à rapidez na obtenção do resultado, assumindo a diferença de 2 log para mais em relação ao numero de partículas infectantes, conseguindo calcular dessa maneira um MOI para a infecção.

4.3.3.2. Infecção Alternada

Para a inoculação em células HepG2 foi utilizado uma carga viral que equivalesse a um MOI de 1,0. Optamos na utilização de um MOI de 1,0 devido a dificuldade de gerar infeção, pois com um MOI equivalente a 0,1 não obtivemos infecção eficiente das células HepG2 que gerasse carga viral suficiente para uma próxima infecção.

Após cinco dias de infecção em HepG2, o sobrenadante foi recolhido para realizar novas reações de qPCR e passagens alternadas. O procedimento de infecção para a C6/36 foi o mesmo utilizado no 4.3.1

4.4. Atenuação e Readaptação à Neurovirulência

A cepa utilizada para esse experimento, determinada JHA-1, pertence ao sorotipo 2 do DENV e ao genótipo Americano. Esse vírus, bem como suas características *in vivo*, foram descritas por Amorim e colaboradores [88], e foi escolhida por possuir característica de neurovirulência em camundongos adultos. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados no Laboratório de

Desenvolvimento de Vacinas do Instituo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

O JHA-1 foi submetido a passagens consecutivas em C6/36, através do mesmo procedimento descrito no item 4.3.1, visando a atenuação. Devido a resultados obtidos com a cepa ACS-46 de Dengue 2, optou-se por avaliar geneticamente o vírus e em relação a atenuação da neurovirulência somente a partir da 20ª passagem.

A passagem 23, e devido aos resultados obtidos nesta, a passagem 29, foram selecionadas para a verificação do perfil de neurovirulência através da inoculação em camundongos. A capacidade de provocar lesão em sistema nervoso central foi avaliada através da inoculação intracraniana em camundongos Balb/C machos, com seis semanas de idade (n = 10 por grupo), sendo anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina.[88]

Para a inoculação do vírus nos roedores, foi necessária a quantificação de partículas virais pelo ensaio de formação de placas de lise. Após titulação, foi inoculado 40 µL de sobrenadante de cultura infectada ou de suspensão viral em L-15 após passagem em camundongo com concentrações de vírus 100 UFP para o vírus parental JHA1, 23ª passagem de JHA1 em C6/36, 29ª passagem de JHA1 em C6/36 e primeira passagem do JHA1 em cérebro de camundongo neonato.

Em paralelo, os vírus dos sobrenadantes da 23ª e 29ª passagens foram sequenciados utilizando a plataforma Ion Torrent em busca das variações genéticas em relação as cepas iniciais, neurovirulentas.

Observou-se que os vírus da passagem 29 já não eram capazes de causar danos quando inoculados em camundongos adultos, e portanto, estabeleceu-se que havia ocorrido atenuação. Portanto, vírus dessa passagem foram inoculados em camundongos neonatos para reverter o processo, buscando portanto a recuperação da característica neurovirulência.

Para a recuperação da neurovirulência foram utilizados camundongos Balb/C com dois dias de idade, e a suspensão viral foi injetada via intracraniana com 100UFP em 20 µL da vigésima nona passagem do vírus JHA1. Os animais foram acompanhados até o desenvolvimento de sintomas de encefalite, como por exemplo, prostração, perda da capacidade motora nas patas traseiras e perda de peso.

Após o aparecimento dos sintomas, os animais foram sacrificados e seus cérebros foram retirados e macerados em meio L-15 e centrifugados a 300g por 5 minutos para sedimentação do tecido nervoso, mas mantendo as partículas virais no sobrenadante.

Para testar a perda ou o ganho de neurovirulência, foram utilizados camundongos Balb/C machos com seis semanas de idade (n = 10 por grupo), sendo anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina[88] e inoculados pela via intracraniana com 40 µL de meio L-15 do sobrenadante da cultura celular (controle negativo) ou meio L-15 usado para fazer a suspensão viral após a passagem em camundongos neonatos.

4.5. cDNA e qPCR

Para a realização da reação de cDNA e de qPCR o RNA viral foi extraído utilizando o kit comercial *QiAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

A reação de qPCR utilizada foi adaptada do estudo realizado Huhtamo[85], que utilizou a metodologia de qPCR *onestep*, onde a síntese de cDNA e sua amplificação ocorrem um uma única reação. Já em nosso estudo utilizamos a metodologia *two-step*, onde o cDNA é sintetizado em reação separada da amplificação. Para a síntese de cDNA utilizamos o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* e utilizamos a plataforma 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems para a realização das reações de qPCR.

Estas reações utilizam a metodologia de *Taqman*, que consiste na detecção de fluorescência emitida pela quebra de uma sonda, marcada em uma extremidade com um fluoróforo e em outra extremidade com um captador de fluorescência, durante o processo de extensão da fita complementar do DNA (figura 4).

A quebra da sonda é dada pela *Taq* DNA polimerase, que possui ação 5’ – 3’ exonuclease, quebrando desta maneira a sonda ligada ao DNA molde e distanciando o fluoróforo do captador, fazendo com que haja emissão de fluorescência, captada por sensores presentes na plataforma onde é realizada a reação.

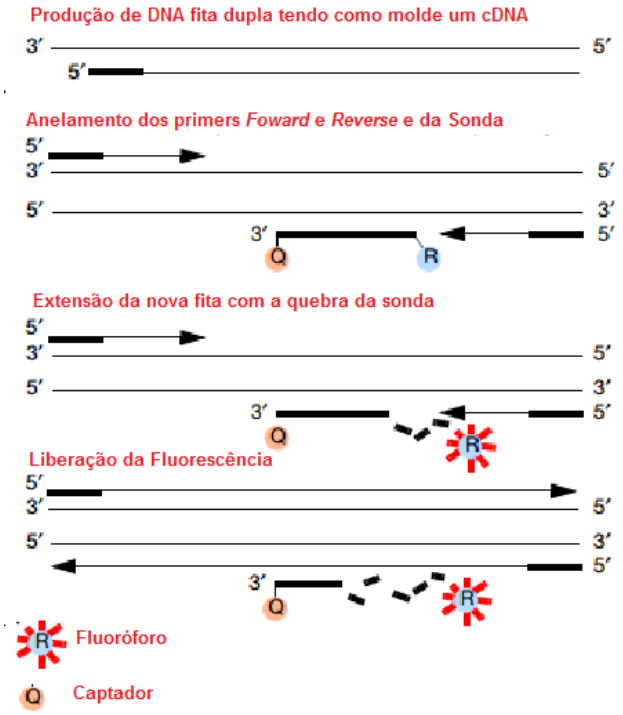

Figura 4 - Esquema da reação de qPCR mostrando como a fluorescência é liberada pela ação de exonuclease da *Taq* DNA polimerase. adaptado de http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx

Os reagentes utilizados para as reações de qPCR foram: Sonda e *Primers Forward* e *Reverse* descritos por Huhtamo [85] (Tabela 1) e *Taq PCR Master Mix kit* (Qiagen) que contem a enzima (Taq DNA polimerase), tampão e dNTPs em concentrações ideais para a realização da reação e como molde para a reação utilizamos o cDNA obtido das passagens.

Tabela - 1 - *Primers* e Sonda utilizados nas reações de qPCR descritos por Huhtamo[85]

Primers e Sonda	**Posição no Genoma Viral (3'UTR)**	**Sequência**
Primer Foward	10548	GGA CTA GAG GTT AGA GGA GAC CCC
Sonda	10619	AGC ATA TTG ACG CTG GGA
Primer Reverse	10640	ACC AGA GAT CCT GCT GTC TC

A reação foi realizada em placa de 96 poços da marca Axygen específica para qPCR. Em cada poço foram adicionados 12,5 uL de *Taq PCR Master Mix kit*, 2,25uL de *Primer Forward* a 10uM, 2,25ul de *Primer Reverse* a 10uM, 0,625uL de Sonda a 10uM, 2,375uL de água e 5uL de cDNA, tendo um volume final de 25uL.

Essa placa foi vedada por um filme autocolante específico para reações de qPCR e posta na plataforma 7300 Real-Time PCR System da Applied Biosystems, onde foi realizado ciclo de temperaturas por tempos distintos, fazendo com que as reações de denaturação da fita, anelamento dos *Primers* e Sonda e extensão da fita de DNA ocorressem, este ciclo foi repetido 45 vezes. O ciclo de temperaturas e tempos são: 50ºC por 2 minutos, 95ºC por 10 min, 95ºC por 15 segundos e 60ºC por 1 minuto.

4.6. RT-PCR

Para sequenciarmos o genoma completo de nossas cepas virais, realizamos um RT-PCR de passo único utilizando o kit comercial *SuperScript III High Fidelity One-Step RT-PCR kit* (Invitrogen, LifeTechnologies, Carlsbad, CA), que realiza a retrotranscrição de RNA para cDNA e a amplificação dos fragmentos em uma única reação.

Para esse reação utilizamos os primers da Tabela 2 obtendo quatro fragmentos longos, de aproximadamente quatro mil pares de base. Para a realização

da reação de sequenciamento, esse material foi extraído do gel de agarose e purificado com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* da marca Promega

Tabela - 2 - *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR *onestep* e Sequenciamento para Dengue 2.

Primers D-2	**Posição no Genoma Viral***	**Sequência**
A 1 F	28	GAC AGA TTC TTT GAG GGA GCT AA
A1 R	4120	TGC TGG TTC TCG AAA GAG TTG
A2 F	3661	CGC TAC CAT GAC GGA TGA C
A2 R	7749	TTT TGC TGA TCC TCG TGA CA
A3 F	6668	CAC AGA TAC AAC CAC ACT GG
A3 R	10644	GGT CTT TCC CAG CGT CAA TA

*Cooredenadas no genoma viral de acordo com o genoma referência JX286517

4.7. Sequenciamento

As passagens escolhidas para o sequenciamento foram a décima sexta e vigésima passagens em C6/36 e a quarta e sexta passagens no modelo alternado HepG2 - C6/36.

O método empregado no sequenciamento de nova geração utilizado no IonTorrent consiste em três etapas: 1) preparo da biblioteca; 2) Preparo do *Template* 3) Sequenciamento. Em todas essas etapas seguimos as instruções fornecidas pelo fabricante

O Preparo da Biblioteca (Figura 5) consiste na quebra do *amplicon* em fragmentos menores utilizando método enzimático através do *kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit for AB Library Builder™ System* ou utilizando método de fragmentação mecânica utilizando *Bioruptor™ UCD-200 TS Sonication System*. Nosso estudo iniciou utilizando o métodos enzimático, porém devido a dificuldade de ajustes no tempo de reação para obter fragmentos de *amplicon* correto passamos a utilizar o método sônico.

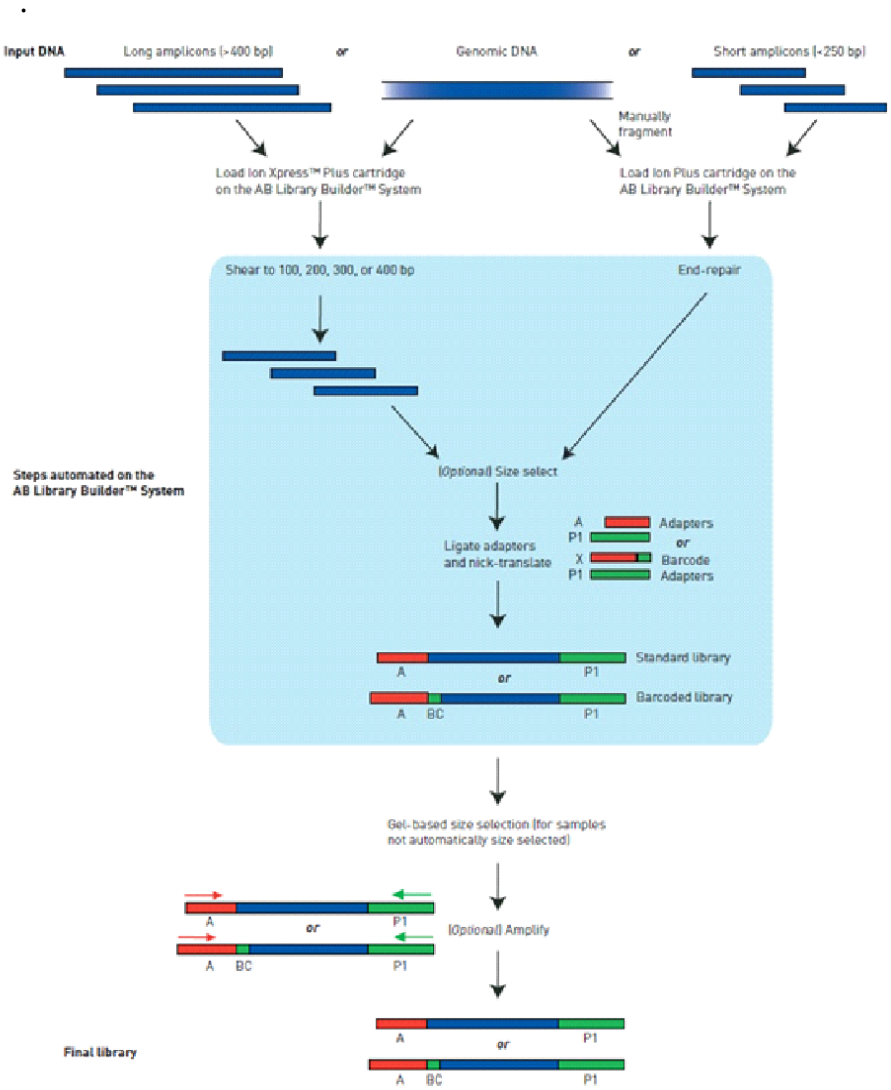

Figura 5 - Preparo da Biblioteca para IonTorrent. Obtido de: *Use Guide: Ion Xpress™ Plus and Ion Plus Library Preparation for the AB Library Builder™ System*

O tamanho dos fragmentos gerados durante o processo de preparo de biblioteca depende da plataforma Ion utilizada, como utilizamos a plataforma *Ion PGM™ System* com chip 314, se optássemos pela utilização de fragmentos mais longos, aproximadamente 500 pares de bases, nossa cobertura seria pequena, assim utilizamos um *kit* de preparo de biblioteca que gerasse fragmentos com tamanho entre 270 a 370 pares de base, aumentando nossa cobertura de sequenciamento.

Para que a montagem da biblioteca utilizamos amostras com concentrações de DNA entre 100ng e 1ug, como o requerido pela empresa. As amostras utilizadas

nesse processo foram quantificadas em aparelho *Qubit* com o *kit Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay*.

Então, após a quantificação, as amostras foram fragmentadas mecanicamente, onde são submetidas a um pulso sônicos de 15 minutos, formando fragmentos de 300 pares de base. Como esse tipo de fragmentação pode deixar bases extras/grupo fosfatos extras em uma das fitas é necessário a utilização de enzimas de reparo para garantir a ligação dos adaptadores no próximo passo.

Assim ao término da a fragmentação o material é transferido para um microtubo *Eppendorf LoBind*, que diminui a adesão de DNA e RNA em suas paredes, e em seguida são adicionados os reagentes para o reparo das extremidades da fita de DNA, que são o tampão de reparo *5X End Repair Buffer* e a enzima de reparo *End Repair Enzyme*.

Após esse processo de reparo, as amostras foram ligadas a adaptadores e *barcodes*, que consistem em pequenos fragmentos de sequencia nucleotídica. Os adaptadores auxiliam no enriquecimento da biblioteca, onde são complementares aos *primers* utilizados neste processo, consiste em uma PCR de emulsão, já os os *barcodes* são sequências distintas conhecidas ligadas a cada amostra, sendo reconhecidas pelo software do sequenciador, identificando cada amostra durante o processo de leitura de sequência.

Para realizar a ligação dos adaptadores e *barcodes* utilizamos a enzima DNA ligase, que necessita de um ciclo de temperaturas ideais para agir. Em cada amostra processada irá um *barcode* diferente, identificando a amostra pela sequência nucleotídica de cada *barcode*.

Concluída a ligação dos adaptadores e *barcodes*, as amostras são purificadas utilizando *Agencourt™ AMPure™ XP*, este reagente é composto por pequenas esferas magnéticas (*beads*) onde os fragmentos de DNA se ligarão. Assim, após adicionar as *beads* ao DNA, o microtubo contendo essa solução é posto em uma estante magnética para tubos (*DynaMag™*) por 3 minutos, onde as esferas com o DNA serão atraídas pelo magnetismo da estante, permitindo que toda a fase líquida seja retirada sem perder a amostra.

A fase líquida é descartada utilizando pipeta e as esferas são lavadas com Etanol 70%, incubando o materia por 30 segundo e em seguida girando o microtubo na estante magnética duas vezes para a lavagem completa do material. Em seguida esperamos a atração de todas as esferas para a parede do microtubo voltada para a estante magnética e repetimos a lavagem.

Ao término da segunda lavagem toda a fase líquida é descartada utilizando pipeta e mantemos o tubo aberto na estante para o Etanol evaporar das *beads* por aproximadamente 5 minutos. Após a secagem das *beads* adicionamos tampão *Low TE* diretamente no pellet para eluição do DNA.

Em seguida essa solução é centrifugada rapidamente e posta novamente na estante magnética, aderindo as *beads* sem DNA na parede do tubo e transferindo a solução contendo DNA para um novo microtubo.

Após a purificação precisamos selecionar os fragmentos com o tamanho adequado para o sequenciamento, pois mesmo utilizando a fragmentação mecânica, podemos originar fragmentos menores ou maiores.

Assim a seleção dos fragmentos é realizada utilizando o gel de agarose *E-Gel®* da *Invitrogen*. Este gel já vem polimerizado em um *cassett* e possui poços na região superior para adição das amostras e poços centrais para recuperar a amostra após eletroforese, o tamanho da amostra é dado por um peso molecular aplicado no menor poço do gel (figura 6). O processo de eletroforese ocorre em uma cuba própria (*E-Gel® iBase™ Power System*), O processo de eletroforese ocorre em uma cuba própria (*E-Gel® iBase™ Power System*), que possui transluminador para evidenciar as bandas de DNA (figura 7).

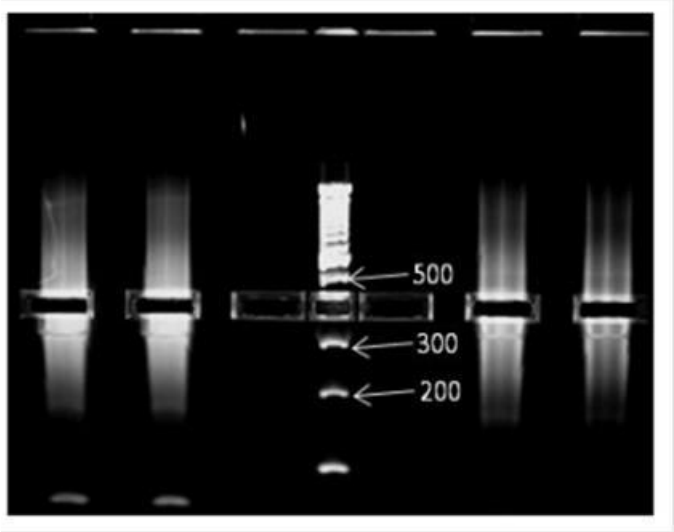

Figura 6 -Seleção de fragmentos do tamanho adequado para a reação de sequenciamento utilizando *E-Gel*®. Poços 1, 2, 6 e 7 contendo amostras, 4º poço contendo peso molecular. A amostra com o peso molecular correto é arrastado pela trama do gel e fica acessível nos poços em região central do gel. O peso das amostras são identificados pelo peso molecular que corre junto as amostras

Figura 7 -Seleção de fragmentos utilizando *E-Gel*. O primeiro quadro mostra a aplicação das amostras no *E-Gel*® dentro da cuba de eletroforese própria, o segundo quadro mostra a corrida de eletroforese sendo iniciada e o terceiro quadro mostra a recuperação das amostras do tamanho específico utilizando o transiluminador que fica na cuba abaixo do gel

Após a seleção dos fragmentos é realizado o Preparo do *Template*, que consiste em um PCR de emulsão. Os fragmentos obtidos na Biblioteca são novamente ligados a *beads* denominadas *Ion Sphere*™, que serão adicionadas em uma solução com óleo mineral. Esta solução heterogênea forma gotículas de óleo no meio aquoso, onde cada gotícula contém uma *Ion Sphere*™ com um único DNA e

reagentes para a PCR, que amplificarão a sequência alvo inúmeras vezes, permitindo um sequenciamento de melhor qualidade.

Após essa amplificação, o produto é injetado no *chip*, processo este que requer muito cuidado para que não haja entrada de ar, o que acarreta na formação de bolhas e consequentemente impedindo o preenchimento da região onde a bolha se encontra com o material a ser sequenciado. Para evitar esse problema, o material é injetado com a ajuda de uma pipeta, rotacionando o regulador de volume vagarosamente e injetando a solução contendo a *Ion Sphere*™ mais DNA amplificado.

O *chip* utilizado para o sequenciamento (Figura 8) contém pequenos poços onde uma única *Ion Sphere*™ com DNA é inserida, assim uma única sequência sofrerá a reação de sequenciamento em cada poço, visto que o PCR de emulsão visa aumentar a quantidade de fragmentos de DNA de forma clonal em cada *Ion Sphere*™.

Nosso estudo utilizou o *chip* 314, que possui 1 milhão de sensores, o que permite sequenciar até dez megabases (10Mb), gerando dados suficientes para um estudo de um genoma formado por doze mil pares de base (12Kb).

Figura 8 - Modelo de *chip* utilizado para sequenciamento na plataforma Ion Torrent

O *chip* permite que o sequenciador detecte a mudança de pH que ocorre no poço em que estão presentes as *beads* com o material que será sequenciado. Esta alteração do pH é decorrente da liberação de um íon Hidrogênio durante o processo de polimerização da fita complementar, sendo então detectado pelo sensor de íons presente no aparelho (figura 9).

Para que essa detecção de pH gere uma informação correspondente a sequência, cada base nitrogenada é injetada separadamente em solução líquida e após o tempo de reação da polimerização ocorre uma lavagem, sendo injetada outra base nitrogenada após a lavagem. Caso haja repetição de uma mesma base nitrogenada na sequência, o pH do meio ficará duas vezes mais ácido, desta forma o *software* consegue processar a acidificação local com o nucleotídeo injetado, montando os dados da sequência obtida.

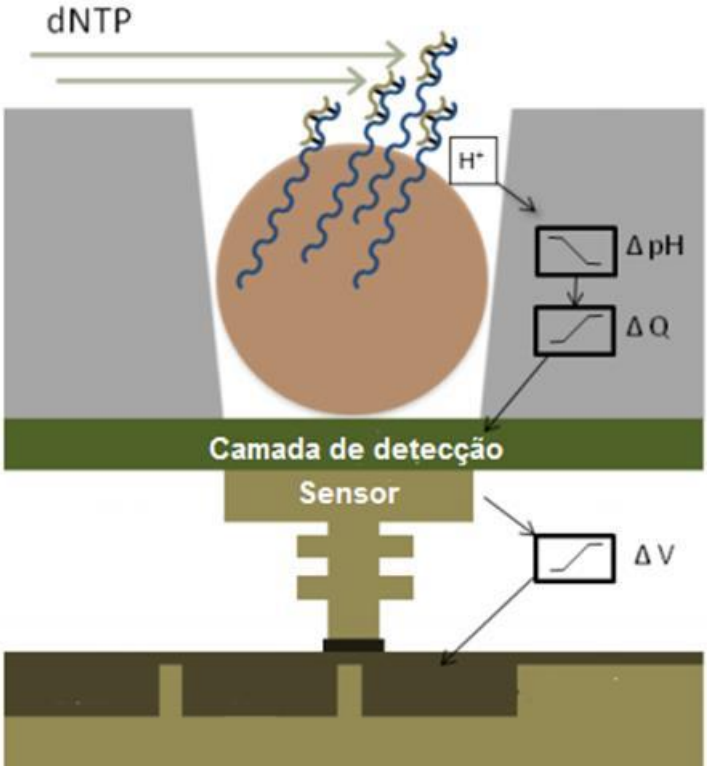

Figura 9 - Esquema representando a forma de detecção da alteração de pH realizada pela inserção de um nucleotídeo durante o processo de sequenciamento. Adaptado de https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf

4.8. Montagem das sequencias e Análise

O programa utilizado para as análises de montagem dos reads e bioinformática foi o *CLC Workbench 6.1* que possui inúmeras ferramentas para realizar uma gama de análises com as informações geradas por sequenciamento de

nova geração (*NGS*). Dentre elas utilizamos as seguintes: 1) Montagem do *reads* contra referência; 2) Detecção de Variantes Baseada em Qualidade de Base e 3) Detecção Probabilística de Variantes.

Cálculos como o de taxa de mutação e taxa de substituição não podem ser realizados pelo programa, tendo sido portanto calculados com a ajuda do programa Excel.

4.8.1. *Trimagem* dos *reads*

Assim que os dados são gerados pelo sequenciador é necessário realizar um processo denominado *Trimagem*, que visa a retirada das sequências dos adaptadores e barcodes utilizados para o sequenciamento e identificação das amostras. Para esse procedimento utilizamos o software *Torrent Browser*, que realiza também a a remoção de sequências policlonais e de baixa qualidade, assim os dados filtrados foram exportados em formato FastQ e analisados utilizando o programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

4.8.2. ACS-46

Para a montagem do *reads* dos vírus de cada passagem sequenciada foi utilizado como referência o genoma completo do vírus ACS-46 obtido a partir de amplicon de Dengue gerado do plasma de paciente, com descrito no trabalho de Romano *et al*.[51]

Essa montagem inicial foi realizada visando à detecção de mutações que estivessem ocorrendo em quantidade tal que alterasse o consenso, assim, contrastando com o vírus original como referencia, isso seria facilmente observado. Para isso utilizamos os seguintes parâmetros de qualidade: *Mismatch* – 1; *Insertion* – 2; *Deletion* – 2; *Length Fraction* – 0,8 e *Similarity Fraction* – 0,8.

Após obter o consenso através desse tipo de montagem, realizamos um segundo mapeamento, com o objetivo de potencializar a detecção de mutações intrapopulacionais, realizando montagens das sequências contra o consenso obtido

com a montagem contra o consenso original do plasma (Figura 10). Para realizar esse procedimento utilizamos os mesmo parâmetros da primeira montagem..

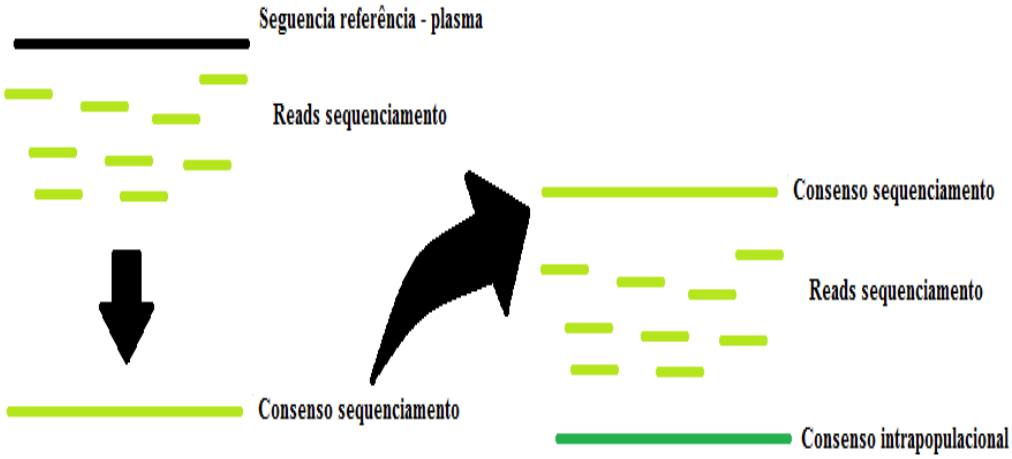

Figura 10 - Método utilizado para a montagem do consenso. O consenso gerado na primeira montagem serviu de modelo para a segunda montagem, objetivando a analise de variantes intrapopulação.

Após a obtenção das montagens dos *contigs* foi realizada a detecção de variantes, tanto pelo método de Qualidade de Bases quanto pelo Probabilístico, dentro de cada passagem sequenciada

A diferença entre esses dois métodos consiste no tipo de busca das variantes, onde o primeiro é baseado no algoritmo *Neighborhood Quality Standard* (NQS), que utiliza uma combinação de filtros de qualidade e limites especificados pelo usuário para a cobertura e frequência das variantes. Já o segundo método utiliza uma combinação de cálculo Bayesiano e Máxima Verossimilhança para calcular a probabilidade do acontecimento da variante.

Os parâmetros na utilização dessas duas ferramentas foram *defaut* do programa. A única exceção foi a opção de exclusão de inserção e deleção (in/del) pontual pelo método busca por qualidade. Este processo de exclusão é realizado pois a plataforma IonTorrent pode gerar erros durante o sequenciamento em regiões homopoliméricas, inserindo ou deletando uma base nitrogenada durante o processo de reconhecimento da amplificação para o sequenciamento.

Além da obtenção das Variantes, os consensos foram alinhados entre eles para observar as mutações fixadas nas populações (passagens celulares), ainda utilizando ferramentas de alinhamento presentes no programa CLC.

Com o número de variantes obtidos, podemos calcular a taxa de mutação dentro das populações utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Nº de mutações}}{\text{Nº de nucleotídeos sequenciados}}$$

Para a obtenção do número de nucleotídeos sequenciados multiplicou-se a cobertura média pelo tamanho do fragmento sequenciado.

4.9. Teste de *fitness* viral

Após o aparecimento de mutações com provável caráter adaptativo na cepa ACS-46, o que proporcionaria um aumento no fitness viral com relação a célula hospedeira, consequentemente podendo levar a uma alteração de caráter no efeito citopático ou na produção de partículas virais, realizamos um experimento onde a carga viral do vírus sem mutação foi comparada com a carga viral do vírus com mutação após sete dias de infeção na célula para qual o vírus foi adaptado.

Assim, para realizar esse experimento foram cultivadas células C6/36 em placas para cultura celular de fundo chato com 24 poços, onde cada poço continha $2x10^5$ células.

Após 24 horas ao repique da célula em placa de cultura, foi inoculado 300ul dos vírus parental e mutado, com carga viral já calculada de 10e5 cópias/ml pela reação de qPCR.

Para a infecção celular utilizamos o protocolo de infecção do item 4.3.1 modificado, onde após o período de adsorção, o sobrenadante contendo vírus foi retirado por sucção com bomba de vácuo e em seguida colocando 1ml de meio de cultura L-15 com 5% de SFB.

O sobrenadante dos poços foi colhido após sete dias e o material genético foi extraído e amplificado por qPCR, com o objetivo de comparar então a carga viral gerada na infecção pelo vírus não mutado e pelo vírus mutado.

4.10. JHA1

Para a montagem do *contig* da cepa JHA foi usado como referência nossa sequência de ACS-46 plasma, pois ambas são Dengue Sorotipo 2. Contudo, pertencem a genótipos diferentes. Sendo assim, a sequência completa obtida pela primeira montagem foi usada como referência para montar um segundo consenso contra ela mesma, gerando assim uma sequência mais fidedigna.

O consenso JHA1 foi utilizado como referência para as montagens realizadas com as sequências obtidas das passagens 23 e 29, bem como com o vírus passado em cérebro de camundongo.

As montagens dos contigs dessas populações foram realizadas da mesma maneira descritas no item 4.8.1, bem como as detecções de variantes.

4.10.1. Reconstrução Filogenética e Distância Partenogenética JHA

Devido a alta taxa de mortalidade em roedores, após a obtenção do consenso completo da poliproteína da cepa JHA, decidimos realizar uma Reconstrução Filogenética utilizando 142 sequências da região de Envelope de Dengue sorotipo 2 presentes no Genbank. Para realizar esta reconstrução utilizamos o programa *Beast*,v1.8, que usa inferência Bayesiana, utilizando como prior o modelo Coalescente e com relógio molecular relaxado, gerando vinte milhões de corridas[89].

Para a sumarização das árvores geradas utilizamos o programa *TreeAnotator* v1.8 onde foram sumarizadas 2000 arvores amostradas das 20 milhões geradas pelo programa *Beast*, e visualizadas no *Figtree*.[90]

A seguir utilizamos o programa PAUP*[91] calcular a distância genética da cepa neurovirulenta em relação aos demais genótipos de Dengue 2. Para essa etapa utilizamos 62 sequencias da região de envelope dos genótipos Americano, Americano/Asiático, Cosmopolita, Silvatico e das cepas Trin53 e JHA. A análise de distância foi feita par a par utilizando o método de Verossimilhança com modelo GTR+I+G, estimado no MODELTEST[92].

Para as análises de recombinação entre a cepa JHA e os demais vírus Americanos, utilizamos o programa *SimPlot*[93], utilizando um *dataset* com 85 sequência.

5. RESULTADOS

5.1. Cultura Celular ACS-46

As culturas de C6/36 e HepG2 foram estabelecidas e padronizadas, obtendo crescimento dentro do padrão esperado para esses tipos de células.

5.1.1. C6/36

As infecções das culturas de C6/36 pelo DENV-2 ACS-46 foram realizadas com sucesso, e um total de 24 passagens propostas pelo estudo foram feitas. Durante as passagens seriadas, foi observado um aumento no efeito citopático (ECP) provocado pelo vírus a partir da décima sexta passagem, onde foram notados sincícios muito maiores e numerosos se comparado com os provocados pelo vírus parental (Figura 11).

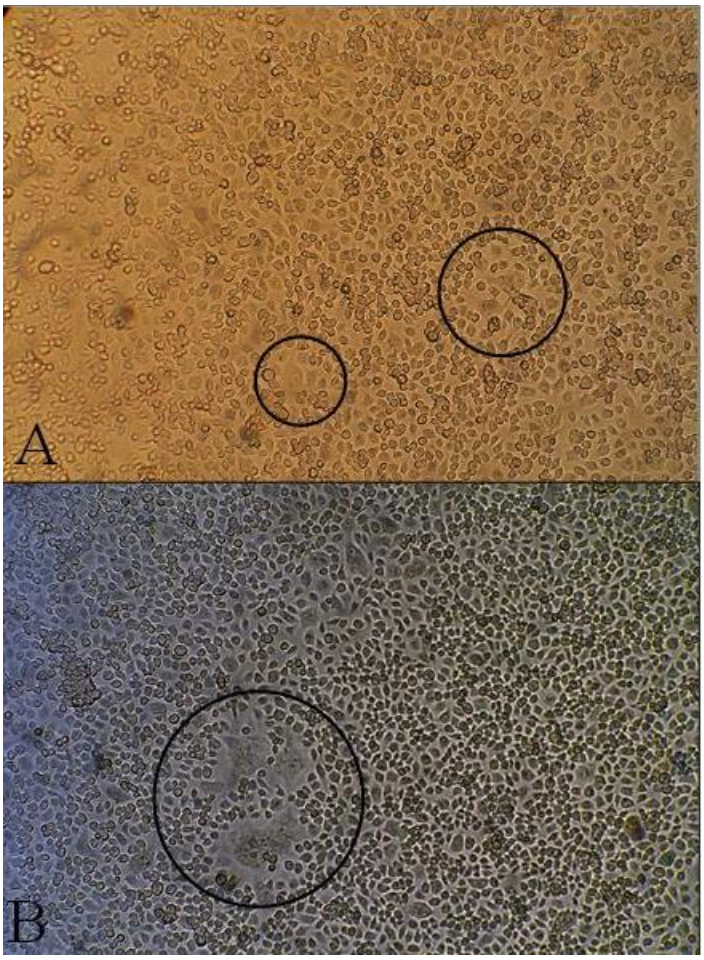

Figura 11 - Fotomicrografia da diferença entre os efeitos citopáticos do vírus parental (A) e vírus na 16ª passagem (B) após 5 dias de infecção.

Juntamente com o aumento do número de sincícios, houve aumento na carga viral, refletida pela quantificação por qPCR, onde as passagens que apresentavam essa característica de ECP mais sincicial apresentavam em torno de 1 log de vírus a mais do que as passagens com efeito citopático padrão.

5.1.2. HepG2

Foram realizadas passagens alternadas entre C6/36 e HepG2, obtendo ao final vírus de quatro passagens alternadas (4 x C6/36 e 4 x HepG2). Optamos por utilizar como inóculo para primeira passagem em célula HepG2 o sobrenadante da vigésima passagem em células C6/36, assim poderíamos analisar além dos efeitos da passagem

em sistemas taxonomicamente diferentes, o caráter adaptativo da mutação encontrada durante as passagens consecutivas nas células de mosquito.

Durante as passagens alternadas obtivemos no máximo um log de diferença entre a propagação viral em HepG2 e C6/36, algo esperado devido a permissividade para o vírus ser menor nas células de mamífero do que na linhagem de larva de mosquito.

Durante as passagens alternadas foi notada a formação de sincícios com a mesma característica das passagens iniciais em C6/36, sugerindo portanto, a perda da adaptação a célula de mosquito.

5.2. RT-PCR

5.2.1. ACS-46 em C6/36

Durante o processos de passagens consecutivas, foram realizadas amplificações do RNA viral por RT-PCR da décima sexta e vigésima passagens, visando a amplificação do material para as reações de sequenciamento, através de três reações diferentes, onde cada uma amplificou um fragmento longo com tamanho de aproximadamente 4 kb, que se sobrepõe (figura 12).

A existência de bandas inespecíficas, geralmente de tamanho menor que o esperado, são interferentes para a reação de seqüenciamento. Por isso, as bandas de 4kb de todas as passagens em células foram extraídas do gel e purificadas com kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* da marca Promega.

O protocolo de purificação foi modificado, elevando o tempo de adsorção do material retirado do gel nas colunas de sílica, permitindo a captura de uma maior quantidade de ácido nucleico.

O material obtido da amplificação foi utilizado para o sequenciamento, onde foram escolhidos para essa reação vírus da 16ª e da 20ª passagens. Isso porque na 16ª passagem foi observado o início de efeitos citopáticos mais intensos conforme descrito no item 5.1.1, que poderia ser um indicativo de adaptação do vírus para a célula de inseto. Com o objetivo de verificar se as possíveis variantes emergentes se fixaram ou não, vírus da 20ª passagem também foram selecionados.

.

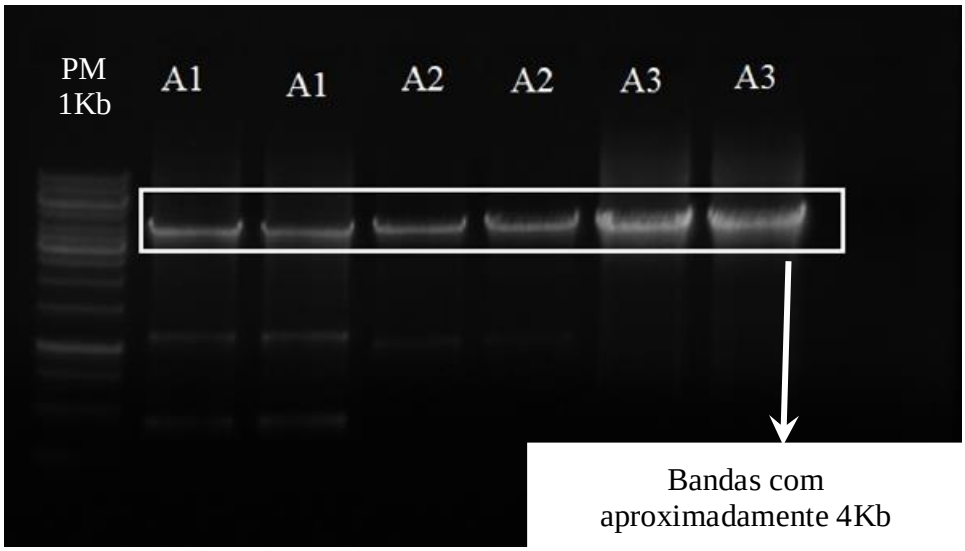

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose do material proveniente da reação *One Step RT-PCR* realizada em duplicata com primers A1, A2 e A3 do sobrenadante da 20ª passagem. Legenda: PM – Peso Molecular, A1 – Produto obtido com o primeiro par de primers, que abrange as regiões 28 à 4120, A2 - Produto obtido com o segundo par de primers, que abrange as regiões 3661 à 7749, A3 - Produto obtido com o terceiro par de primers, que abrange as regiões 6668 à 10644

5.2.2. ACS-46 em HepG2 - C6/36

Durante o processos de passagens alternadas foram realizadas RT-PCRs e sequenciamento dos vírus crescidos nas 4ª e 6ª passagens, uma vez que é documentado na literatura o aparecimento de mutações mais rapidamente em células de mamífero. Estas reações utilizaram o mesmo conjunto de primers e enzima utilizados na etapa do crescimento somente em C6/36, obtendo igualmente produto genômico viral amplificado em três fragmentos grandes de 4kb.

Assim como nas reações realizadas para as culturas em C6/36, as bandas de 4Kb de todas as passagens em células foram extraídas do gel e purificadas, devido o aparecimento de bandas inespecíficas.

5.3. Análise do Sequenciamento

5.3.1. C6/36

O sequenciamento da 16ª passagem foi realizado obtendo uma boa cobertura do genoma viral, com aproximadamente 3.000/base. Os *reads* gerados foram filtrados utilizando o software *Torrent Browser* para a remoção de sequências policlonais e de baixa qualidade, e os dados filtrados foram exportados em formato FastQ. Os *reads* obtidos após a filtragem tiveram a região de *barcode* trimada (retirada da sequência) e analisados utilizando o programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1,* desenvolvido para uma gama de análises de sequencias e de seqüenciamento, incluindo o de nova geração.

5.3.1.1. Análises Interpopulacionais

Ao obtermos o consenso através do mapeamento dos *reads* contra o consenso do vírus obtido pelo sequenciamento de plasma humano, constatamos uma deleção de seis nucleotídeos na décima sexta passagem (Figura 13), levando a perda de dois aminoácidos.

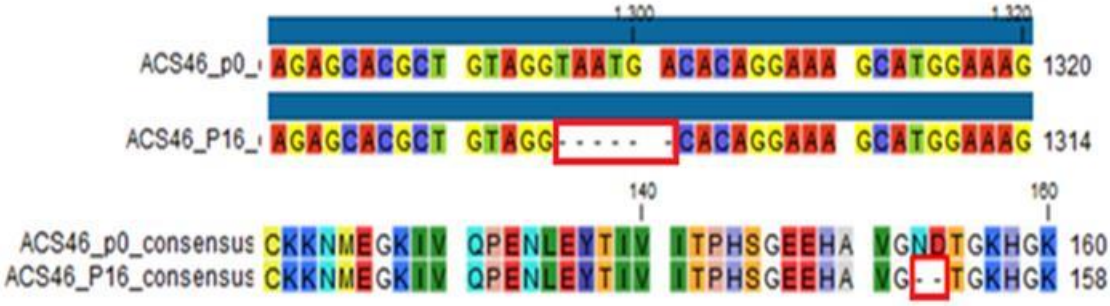

Figura 13 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos e resíduos de aminoácidos obtidas através das montagens no programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*, com ênfase na região da perda dos nucleotídeos. Em vermelho destaca-se a região da perda de seis nucleotídeos (dois códons) na 16ª passagem

Essa deleção foi observada também no consenso da vigésima passagem, em porcentagem superior a 60%, levando a crer que ela foi fixada na população majoritária do vírus adaptado a células de inseto.

A deleção de seis bases nitrogenadas na região 1296 do genoma da poliproteína altera a estrutura do Envelope do vírus, mais especificamente no sítio de glicosilação 153 do Domínio I da glicoproteína do Envelope, ou seja, uma região onde ocorre a ligação da proteína com um açúcar, mais especificamente uma manose, que está correlacionada com a entrada do vírus na célula hospedeira.

Além dessa deleção do sítio de glicosilação, não foram observadas outras alterações na sequência consenso do vírus da 16ª e 20ª passagens em comparação entre si e com a referência do plasma humano

5.3.1.2. Análises Intrapopulacionais

Após a obtenção dos consensos foram realizadas as análises de variantes presentes na 16ª e 20ª passagens. Estas análises foram realizadas comparando as variantes presentes nos *reads* obtidos através do sequenciamento das passagens utilizando como referência o consenso do próprio vírus (obtido através da montagem dos *reads* usando como referência o consenso do vírus parental obtido em outro projeto e já publicado [69]).

Visando gerar uma maior fidelidade nos resultados de variabilidade, utilizamos duas ferramentas de detecção de variantes presentes no programa CLC: a detecção baseada em qualidade e a detecção probabilística. O número de variantes obtidas na análise baseada em qualidade foi muito grande, enquanto na probabilística foram detectadas apenas as variantes com maior probabilidade de serem reais.

Para as análises dos dados assumimos que as mutações válidas seriam aquelas com frequência igual ou superior a 1%, pois dentro da cobertura obtida para o genoma, esse valor não faria com que houvesse perda de variantes verdadeiras e tampouco incluiria variantes falsas por erros de amplificação ou de sequenciamento.

As tabelas contendo todos os dados brutos de detecção de variantes por qualidade e probabilístico estão disponíveis nos Anexos 3, 4 (detecção de variantes pelos métodos probabilístico e qualidade da passagem 16 C6/36), 5 e 6 (detecção de variantes pelos métodos probabilístico e qualidade da passagem 20 C6/36).

Do montante total das variantes obtidas nas populações de 16ª e 20ª passagens em comparação com o genoma do vírus parental apresentaremos aqui as

variantes que mantiveram uma correlação temporal entre a 16ª e 20ª passagens. Estas variantes estão descritas na tabela 3.

Destas variantes, nove foram encontradas na região codificadora para poliproteína, sendo duas em Envelope (C206T, 456_461delTAATGA), três em NS 2B (T223C, C281T, A340C), uma em NS3 (G41A), duas em NS 4A (C166T, C185T), e uma em NS 4B (C477A), além de três em região 3'UTR (T134G, G137A, A139G) alterando parte das populações presentes na 16ª e 20ª passagens em relação ao vírus parental.

Das variantes em poliproteína, 8 foram encontradas na 16ª passagem, bem como todas as três em 3'URT, mas ao compararmos a 20ª passagem em relação a 16ª podemos constatar o ganho de mais uma variante em região de poliproteína (A340C) e a perda de duas das três variantes de UTR (G137A, A139G).

Tabela - 3 - Principais variantes intrapopulacionais em porcentagem presentes na décima sexta e vigésima passagens

Posição	Região	P16 P(%)	p16 Q(%)	P20 P(%)	p20 Q(%)	S/NS	Codon/Nt	AA	Polaridade
■206	Env	-	6,93	32,8	33,23	NS	ACA ATA	T69I	PO APO
♦456	Env	70,83	60,36	59,19	78,68	-	TAATGA -	152_153 delGN	APO _PO APO
▼223	NS2 B	14,36	14,89	23,35	23,75	NS	TCA CCA	S75P	PO APO
■281	NS2 B	-	2,2	35,71	36,06	NS	ACA ATA	T94I	PO APO
340	NS2 B	-	-	19,69	19,88	NS	ATA CTA	I114L	APO APO
▼41	NS3	15,96	16,36	26,58	24,1	NS	GGA GAA	G14E	APO Ác
166	NS4 A	-	4,23	-	6,11	NS	CTT TTT	L56F	APO APO
■185	NS4 A	-	2,7	35,94	35,75	NS	GCA GTA	A62V	APO APO
477	NS4 B	24,59	25,21	45,35	45,92	S	CCC CCA	-	-
■134	3' UTR	15,19	14,86	34,72	35,19	-	T /G	-	-
●137	3' UTR	31,65	30,26	-	10,19	-	G/ A	-	-
●139	3' UTR	31,65	32,89	-	10,38	-	A /G	-	-

Dados apresentados na tabela: Posição em relação a sequência da proteína viral, região da poliproteína, porcentagem da população detectada pelo tipo de detecção de variante (P16 P – população da passagem 16 detectada pelo método probabilístico, P16 Q – população da passagem 16 detectada pelo método de qualidade, P20 P – população da passagem 20 detectada pelo método probabilístico e P20 Q – população da passagem 20 detectada pelo método de qualidade), tipo de mutação (S – sinônima ou NS – não sinônima), nucleotídeo ou códon alterado, resíduos de aminoácido (del – deleção) e polaridade dos resíduos (PO – polar; APO – apolar, Ác – ácido). (■, ▼e ●) prováveis variáveis que se correlacionem; (♦) deleção de dois códons.

Dentre as demais variantes na poliproteína, somente a C477A foi sinônima, as demais alteraram o aminoácido gerado pelo códon (variantes não sinônimas) e dentre essas, 57% alteram a polaridade do aminoácido, fazendo com que a estrutura proteica ou a afinidade por água (porção hidrofílica ou hidrofóbica) pudesse sofrer alteração.

Além disso, ao observarmos a frequência das variantes dentro de cada população, uma provável correlação entre algumas variantes emergiu, devido a correlação entre as porcentagens serem muito próxima entre essas variantes tanto na décima sexta quanto na vigésima passagens. Na tabela, para efeitos de clareza, as variantes correlacionadas e a deleção de dois códons foram marcadas usando símbolos.

5.3.2. HepG2

Para a mapearmos os *reads* utilizamos inicialmente como referência o consenso do inóculo inicial das culturas em HepG2, que foi o vírus obtido da vigésima passagem em C6/36. Contudo as montagens desprezavam grande parte dos *reads* obtidos durante o seqüenciamento. Assumindo que isso poderia estar ocorrendo por perda/ganho de variantes, utilizamos como referência a sequência do vírus parental e conseguimos enfim, um mapeamento muito maior do *reads* obtidos.

5.3.2.1. Análises Interpopulacionais

Os consensos obtidos das culturas em HepG2 foram alinhados entre si e com os obtidos das células de inseto, revelando que houve reversão da deleção no sítio de glicosilação em mais de 50% da população sequenciada (Figura 14), alterando assim o consenso.

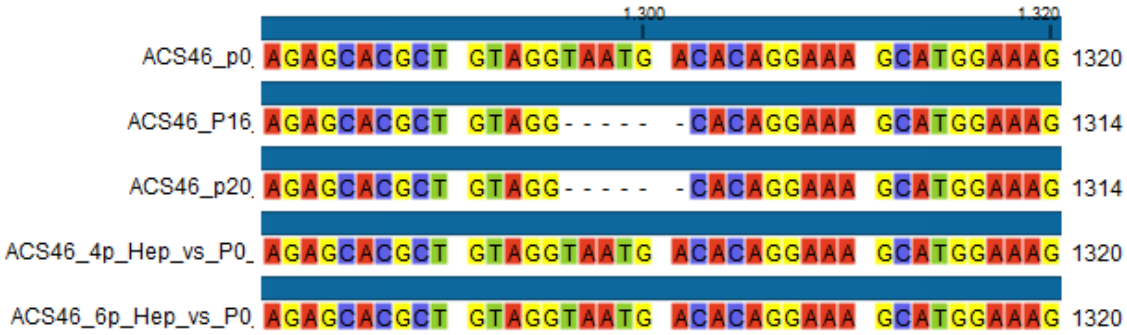

Figura 14 - Parte do alinhamento das sequências obtidas de cada população viral. A figura retrata a região onde houve reversão da deleção no sítio de glicosilação do envelope.

Após as montagens realizamos a detecção de variantes utilizando os mesmos parâmetros e métodos para as análises dos vírus obtidos das passagens em C6/36. Os dados brutos da detecção estão dispostos nos Anexos 7 (detecção de variantes pelos métodos probabilístico e qualidade da passagem 4 HepG2), 8 e 9 (detecção de variantes pelos métodos probabilístico e qualidade da passagem 6 HepG2)

5.3.2.2. Análises Intrapopulacionais

Para gerarmos as tabelas de variantes das populações de 4ª e 6ª passagem em HepG2 utilizamos o mesmo critério aplicado as variantes obtidas nas passagens em células de artrópode, obtendo assim os dados da tabela 5.

Das variantes presentem em proporção maior que 50% nas populações (†) da quarta para sexta passagem, apenas uma é não sinônima (T967C), alterando o resíduo de aminoácido presente na proteína, porém não alterando sua polaridade. Se compararmos temporalmente as variantes obtidas em HepG2 com as obtidas em C6/36, há claramente uma maior quantidade de variantes fixadas em poucas gerações. Interessantemente, como já demonstrado, houve a reversão em 100% das variantes deletada TAATGA.

Tabela - 4 - Principais variantes intrapopulacionais em porcentagem presentes na décima sexta e vigésima passagens

Posição	Região	p4 P(%)	p4 Q(%)	p6 P(%)	p6 Q(%)	S/NS	Codon/Nt	AA	Polaridade
297	Caps	-	-	56,16	56,94	S	CGT CGC	-	-
†967	Env	100	100	96	97,26	NS	TTT CTT	F43L	APO APO
1932	Env	-	-	59,18	58,95	S	CCA CCG	-	-
4635	NS3	41,59	41,1	41,3	42,32	S	GCA GCG	-	-
7041	NS4 B	-	-	14,94	13,09	S	CCT CCC	-	-
7297	NS4 B	-	-	18,71	18,61	S	TTG CTG	-	-
7890	NS5	-	-	18,46	15,1	S	AAG AAA	-	-
†9543	NS5	55,46	54,26	79,46	79,36	S	GAT GAC	-	-
†10065	NS5	53,78	54,24	73,48	73,7	S	CAG CAA	-	-
10347	3' UTR	-	-	19,37	19,23	S	T C	-	-

Dados apresentados na tabela: Posição no genoma viral, região da poliproteína, porcentagem da população detectada pelo tipo de detecção de variante (p4 P – população da passagem 4 detectada pelo método probabilístico, p4 Q – população da passagem 4 detectada pelo método de qualidade, p6 P – população da passagem 6 detectada pelo método probabilístico e P6 Q – população da passagem 6 detectada pelo método de qualidade), tipo de mutação (S – sinônima ou NS – não sinônima), nucleotídeo ou códon alterado, resíduos de aminoácido (AA) e polaridade dos resíduos (APO – apolar). (†) variantes que foram fixadas em um curto espaço de tempo.

Assim como nas passagens de C6/36, as variantes apareceram em grande quantidade nas regiões que codificam proteínas não estruturais. Contudo, neste tipo de célula, a grande maioria foi sinônima, não alterando resíduo de aminoácido e consequentemente mantendo a polaridade do mesmo.

A figura abaixo (figura 15) esquematiza a localização das mutações que apareceram em mais de 50% da população em uma passagem ou durante as passagens tanto em células de mosquito e de humano na poliproteina do vírus, onde a maioria destas mutações são sinônimas, com exceção das presentes no envelope.

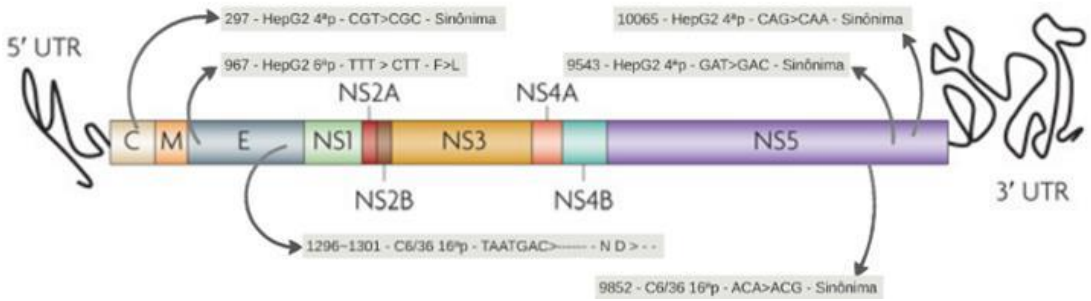

Figura 15 - Esquema representando as mutações em mais de 50% da população de uma passagem durante as passagens em cultura celular no genoma do vírus Dengue tipo 2 cepa ACS46. Imagem adaptade de Guzman, M. G. et al. Dengue: A continuing global threat. Nature Reviews Microbiology 8, S7–S16 (2010). doi:10.1038/nrmicro2460

5.3.3. Teste de *fitness* viral

Após a extração do RNA dos sobrenadantes obtidos das culturas do experimento de *fitness* viral, foi feita a síntese de cDNA e em seguida realizada a qPCR para quantificar as cargas virais. As cargas virais obtidas das cepas após os sete dias de infecção estão demonstradas na figura 16.

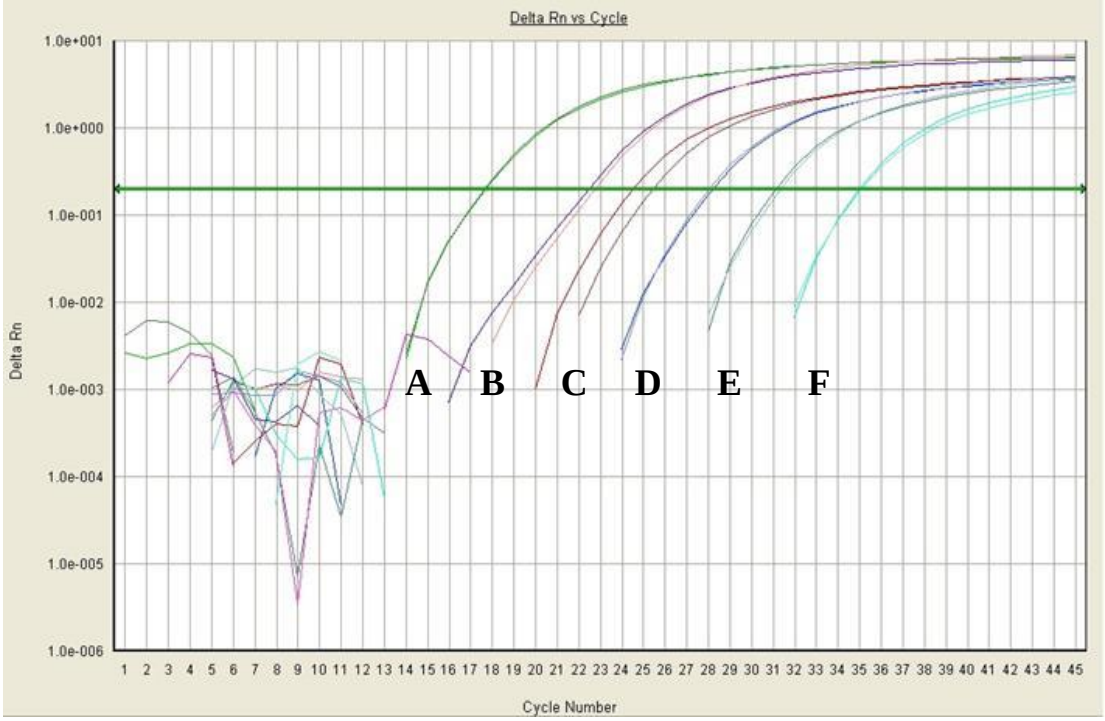

Figura 16 - Resultado da qPCR feita em amostras obtidas de sobrenadante do experimento de *fitness* viral. Curvas padrão de 10e2 cópias/ml (F), 10e3 cópias/ml (E), 10e4 cópias/ml (D), 10e5 cópias/ml (C), amostra não mutada (B) e amostra mutada (A).

Através da figura, é possível observar que a amostra mutada obteve curva de amplificação que cruza o *threshold* entre o 17º e 18º ciclo de amplificação, enquanto a amostra não mutada obteve curva de amplificação que cruza o *threshold* entre 22º e 23º ciclo de amplificação, demonstrando que a carga viral da amostra mutada é maior que a carga obtida na amostra não mutada.

Ao observarmos a quantificação de cópias calculada pelo programa utilizado para análise dos resultados, a população mutada obteve uma carga de 1.42x10e7 cópias/ml enquanto a população não mutada teve uma carga de 4.81x10e5 cópias/ml.

5.3.4. Taxa de Mutação

Embora nosso N seja extremamente pequeno, mais de uma população viral foi seqüenciada para cada modelo (C6/36 e HepG2). Assim, correndo o risco de sermos imprecisos, decidimos estimar a taxa de mutação dos vírus dentro das populações, comparando-as ainda com dados obtidos anteriormente em plasma

humano[69] e dados obtidos paralelamente em mosquito infectados (dados não publicados) (Gráfico 1).

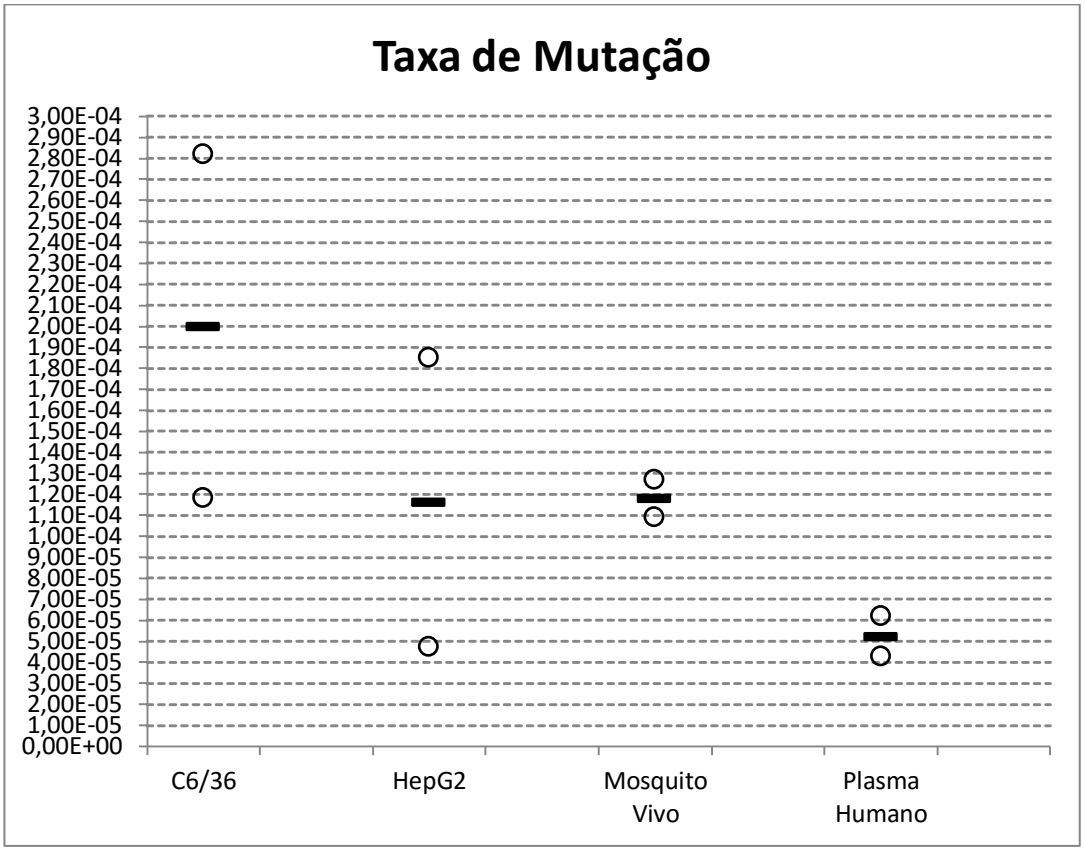

Gráfico 1 - Taxa de mutação da cepa ACS-46 obtida de células de mosquito (C6/36), células de humano (HepG2), mosquitos vivos e plasma de humano

Após o cálculo acima, realizamos a razão entre as médias das taxas mutacionais para observarmos a possível relação entre as taxas obtidas em mosquito (C6/36 / Mosquito Vivo) e em humano (HepG2 / Plasma Humano), obtendo dessa forma uma razão igual a 2.

Além do cálculo da razão entre os sistemas próximos, também calculamos a razão entre as taxas obtidas entre as culturas celulares (C6/36 / HepG2) e os sistemas vivos (Mosquito Vivo / Plasma Humano), obtendo novamente uma razão igual a 2.

5.4. Adaptação da cepa JHA1

5.4.1. Atenuação – Passagens em C6/36

Conforme mencionado anteriormente, o JHA1 é uma cepa de DENV2, genótipo Americano, que se mostrou ser neurovirulento em camundongos adultos Balbc. Objetivando investigar quais os sítios na poliproteína que poderiam estar conferindo ao vírus essa capacidade, experimentos de atenuação foram iniciados. Ao iniciar o processo de atenuação por passagem seriada em células de mosquito, foi observado que de fato, o efeito citopático causado por esse vírus é mais intenso que o causado pelo ACS-46, formando grandes sincícios (Figura 17).

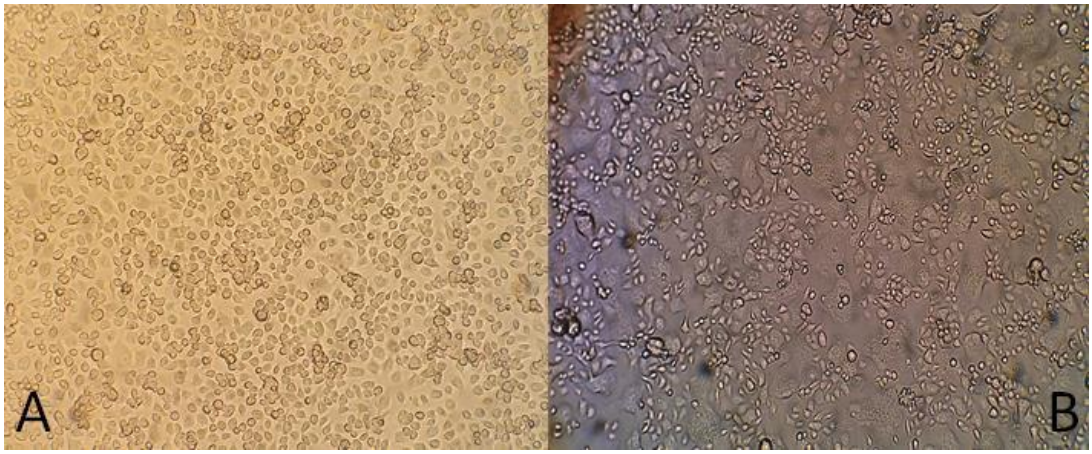

Figura 17 - Aumento no número e tamanho dos sincícios. Comparação entre infecção com cepa padrão ACS-46 (A) e infecção com cepa JHA (B)

Ainda que esse vírus levava as células à morte mais rapidamente que a cepa ACS-46. Enquanto que 7 dias pós inoculação da cepa ACS-46 cerca de 60% das células permaneciam aderidas, as culturas de JHA1 tinham por volta de 30% de células aderidas apos mesmo período.

Foram obtidas 29 passagens seriadas do vírus com perfil neurovirulento em células C6/36, onde os testes de neurovirulência realizados em grupos contendo 10 camundongos adultos macho imunocompetentes indicaram queda parcial no número de óbitos em camundongos adultos na vigésima terceira passagem (Gráfico 2) e perda total na vigésima nona passagem (Gráfico 3).

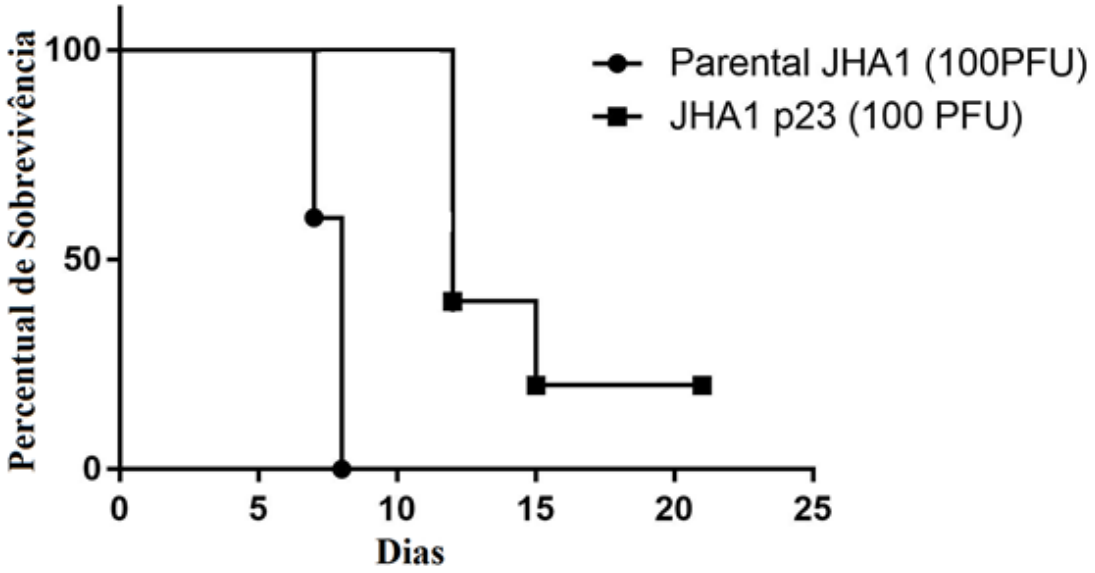

Gráfico 2 - Gráfico de sobrevivência. O gráfico indica o percentual de sobreviventes após a inoculação das cepas JHA parental (JHA1) e 23ª passagem da cepa JHA em C6/36 (JHA1 p23). Os grupos de roedores Parental JHA1 e JHA1 p23 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU).

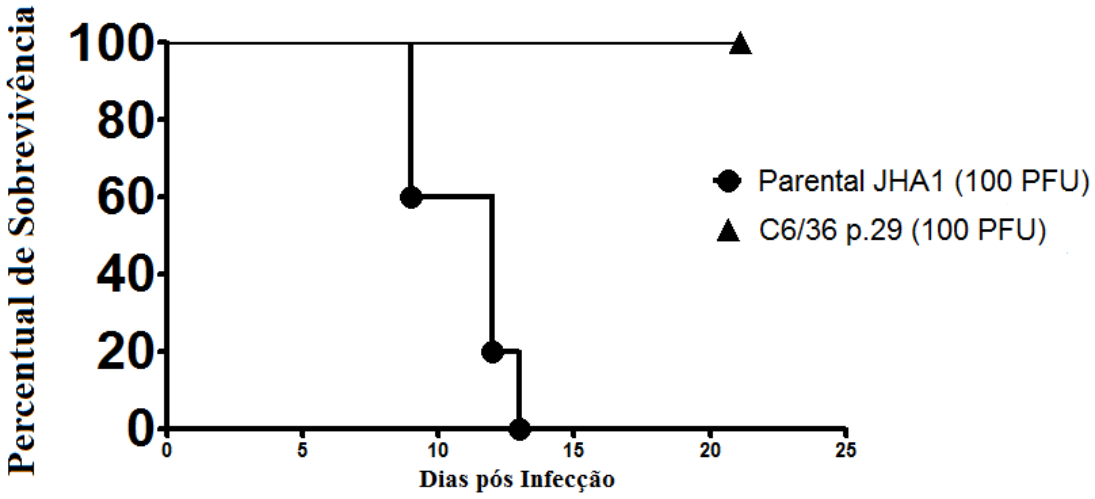

Gráfico 3 - Gráfico de sobrevivência. Percentual de sobreviventes após a inoculação das cepas JHA parental (JHA1) e JHA atenuado em C6/36 (C6/36 p29). Os grupos de roedores Parental JHA1 e C6/36 p29 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU).

5.4.2. Readaptação - Passagem em Roedor

A cepa obtida apos 29 passagens em C6/36 foi portanto considerada não neurovirulenta, e foi inoculada em cérebro de camundongo neonato. Isso objetivou provocar adaptação nesse sistema, proporcionando o retorno da característica de neurovirulência.

Após uma única passagem da cepa atenuada em cérebro de camundongos neonatos houve o retorno do perfil neurovirulento do vírus JHA1 para camundongos adultos imunocompetentes (Gráfico 4).

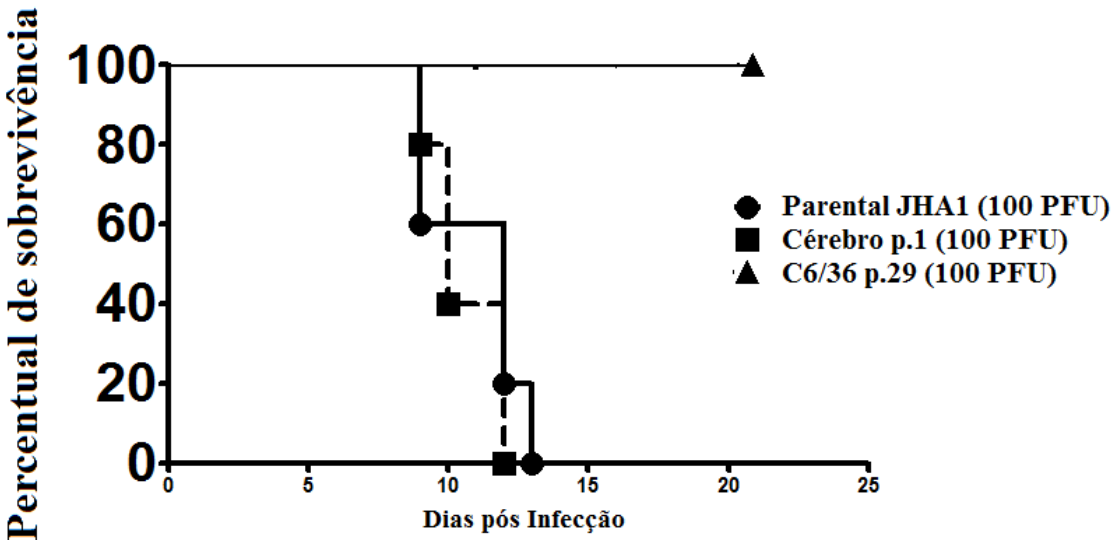

Gráfico 4 - Gráfico de sobrevivência. Percentual de sobrevivência de roedores comparando as cepas JHA1 parental, JHA C6/36 p.29 e JHA p.1 em cérebro de roedor neonato. Os grupos de roedores Parental JHA1, C6/36 p29 e Cérebro p1 continham 10 roedores cada, inoculados com 100 Unidades Formadoras de placa (PFU).

Todos os resultados de sobrevivência de roedores após inoculação das cepas de JHA foram obtidos através de experimentos realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo comandado pelo Professor Titular Luiz Carlos de Souza Ferreira.

5.4.3. Sequenciamento cepa JHA1

Após realizar os sequenciamentos com a mesma metodologia descrita nos itens anteriores, foi feito o mapeamento dos *reads* contra a referencia bem como montado o consenso da cepa JHA1 parental. Para tanto, foi utilizado como base o consenso da cepa ASC-46, visto que são do mesmo sorotipo de Dengue (DENV-2).

Os consensos da poliproteína obtidos dessas passagens foram alinhados e com isso constatamos algumas mutações não sinônimas nas passagens 23 e 29, sendo elas C1304T, C1833T, T2044C, A2692C, A3025G, G7931A e C8174T. Estas mutações poderiam ou não ser relacionadas com a perda da neurovirulência. O alinhamento do consenso da p1-neonato revelou que não houve recuperação de sítios candidatos a neurovirulencia presentes na cepa JHA1 parental. Contudo outro sitio, posição 113 da proteína NS4 B sofreu mutação, substituindo uma Leucina por uma Serina (L113S), mostrando-se uma mutação não sinônima, diferenciando-o da cepa JHA p.29 e da JHA1 parental (Figura 18)

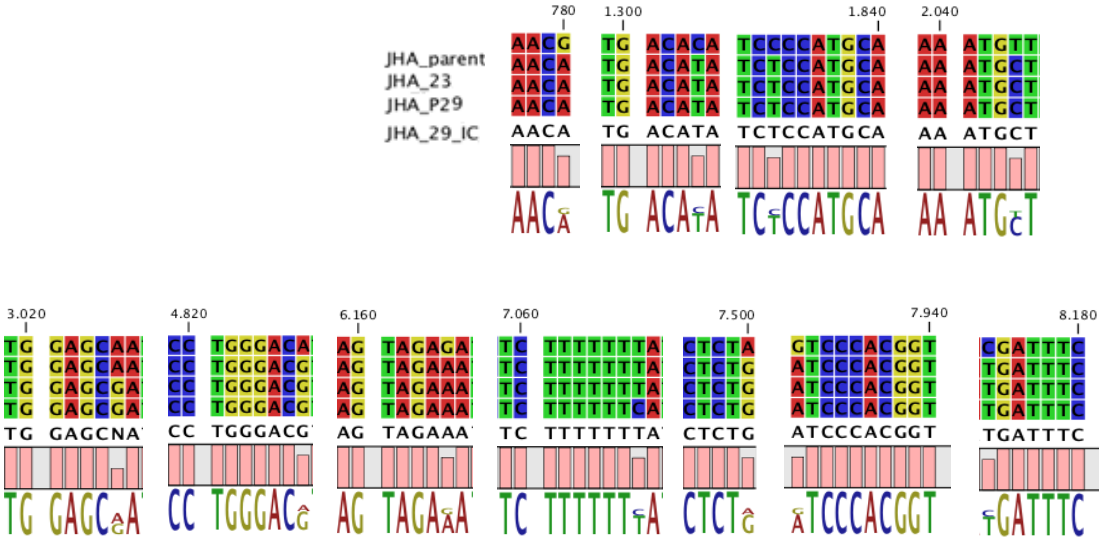

Figura 18 - Alinhamento representando somente das regiões contendo mutações nas populações de baixa neurovirulência JHA_23, não neurovirulenta JHA_P29 (G780A, C1304T, C1833T, T2044C, A3025G, A4827G, G6165A , A7500G, G7931A e C8174T) e neurovirulenta JHA_29_IC (T7067C) de JHA tendo como referência a sequência do vírus JHA_parental.

Além do alinhamento das sequencias consenso, realizamos as mesmas análises para detecção de variantes intrapopulacionais presentes nas populações

obtidas a partir das passagens do vírus JHA em células de mosquito e em cérebro de camundongo neonato. As diferenças nas populações presentes ao longo das passagens pelos métodos Probabilístico e de Qualidade podem ser observadas respectivamente nas tabelas 5 e 6.

Tabela - 5 - Populações detectadas em porcentagem nas passagens realizadas com a cepa JHA em células C6/36 e cérebro de camundongo neonato pelo método probabilístico de detecção de variantes

Posição	Região	Parental (%)	P23 (%)	P29 (%)	P29-IC (%)	S/ NS	Codon/Nt	AA	Polaridade
165	Glicoproteína M	-	60	83,12	87,74	S	ACG AGA	-	-
464	Domínio III Envelope	46,01	100	99,43	100	NS	ACA ATA	T155I	PO APO
993	Domínio III Envelope	50	100	92,83	96,83	NS	TCC TCT	-	-
1204	Domínio de ancoragem Envelope	38,05	71,43	98,39	100	NS	TTT CTT	F402L	APO APO
367	NS1	-	53,15	14,38	-	NS	ATG CTG	M123L	APO APO
700	NS1	43,71	55,56	78,3	100	NS	AAT GAT	N234D	PO Ác
402	NS3 serina protease	34,55	75	94,64	100	S	ACA ACG	-	-
1737	NS3	31,31	66,5	95,86	100	S	GAG GAA	-	-
*338	NS4-B	0	30,16	30,57	54,04	NS	TTA TCA	L113S	APO PO
27	NS5	29,66	70,53	93,82	100	S	CTA CTG	-	-
458	FtsJ-like metiltransferase	38,65	60,93	92,86	82,88	NS	AGT AAT	S153N	PO PO
701	NS5	39,24	63,34	95,8	100	NS	ACG ATG	T234M	PO APO

Dados presentes na tabela: Posição no genoma, região da poliproteína, populações estudadas, tipo de mutação (S – sinônima; NS – não sinônima), nucleotídeo alterado, resíduos de aminoácido e polaridade dos resíduos (PO – polar; APO – apolar; Ác – ácido). Populações estudadas, Parental (Parental), 23ª passagem em C6/36 (P23), 29ª passagem em C6/36 (P29) e cepa da 29ª passagem em C3/36 inoculada em cérebro de camundongo neonato (P29-IC). Variante marcada com (*) representa a única presente em mais de 50% na cepa que apresentou neurovirulência após passagem em cérebro de camundongo neonato

Tabela - 6 - Populações detectadas em porcentagem nas passagens realizadas com a cepa JHA em células C6/36 e cérebro de camundongo neonato pelo método detecção de variantes por qualidade.

Posição	Região	Parental (%)	P23 (%)	P29 (%)	P29-IC (%)	S/ NS	Codon /Nt	AA	Polaridade
165	Glicoproteína M	5,13	-	83,13	87,74	S	ACG AGA	-	-
464	Domínio III Envelope	46,2	-	99,82	100	NS	ACT ATA	T155I	PO APO
993	Domínio III Envelope	49,4	-	98	98,39	S	TCC TCT	-	-
1204	Domínio de ancoragem Envelope	38,61	-	98,43	100	NS	TTT CTT	F402L	APO APO
367	NS1	-	59,75	18,58	-	NS	ATG CTG	M123L	APO APO
700	NS1	43,89	60	78,42	100	NS	AAT GAT	N234D	PO Ác
402	NS3 serina protease	33,33	-	94,51	-	S	ACA ACG	-	-
1737	NS4-A	31,88	67,01	95,95	-	S	GAG GAA	-	-
*338	NS4-B	2,2	46,25	45,52	66,46	NS	TTA TCA	L113S	APO PO
27	NS5	29,49	70,41	93,82	100	S	CTA CTG	-	-
458	FtsJ-like metiltransferase	35,9	59,92	92,95	83,69	NS	AGT AAT	S153N	PO PO
701	NS5	39,87	64,29	95,74	100	NS	ACG ATG	T234M	PO APO

Dados presentes na tabela: Posição no genoma, região da poliproteína, populações estudadas, tipo de mutação (S – sinônima; NS – não sinônima), nucleotídeo alterado, resíduos de aminoácido e polaridade dos resíduos (PO – polar; APO – apolar; Ác – ácido). Populações estudadas, Parental (Parental), 23ª passagem em C6/36 (P23), 29ª passagem em C6/36 (P29) e cepa da 29ª passagem em C3/36 inoculada em cérebro de camundongo neonato (P29-IC). Variante marcada com (*) representa a única presente em mais de 50% na cepa que apresentou neurovirulência após passagem em cérebro de camundongo neonato

Nas tabelas acima, encontram-se as porcentagens de variantes na posição 338 (*) na população neurovirulenta JHA_29_IC bem como nas demais. Ela representa uma substituição sinônima (na proteína NS4-B, do aminoácido Leucina para Serina) que foi observada na poliproteína do vírus da P29 IC, e que, embora presente já nas demais, não era como majoritária.

5.4.4. Reconstrução Filogenética

Além da detecção de variantes feita para o estudo de atenuação de neurovirulência desta cepa, decidimos fazer uma análise um pouco mais aprofundada sobre o genoma deste vírus, pois sabíamos somente que a cepa pertencia ao genótipo Americano devido a um sequenciamento da região de envelope feito em estudo anterior. [88]

Realizamos então uma reconstrução filogenética para compará-lo com os demais vírus da dengue sorotipo 2, confirmando o genótipo da cepa JHA como Americano. Contudo, a cepa de maior similaridade com o JHA1 chamou atenção. A cepa Trin53 isolada em Trindad Tobago em 1953 que aparece em vermelho na árvore da Figura 19 possui alta similaridade com o JHA e é também uma cepa neurovirulenta.

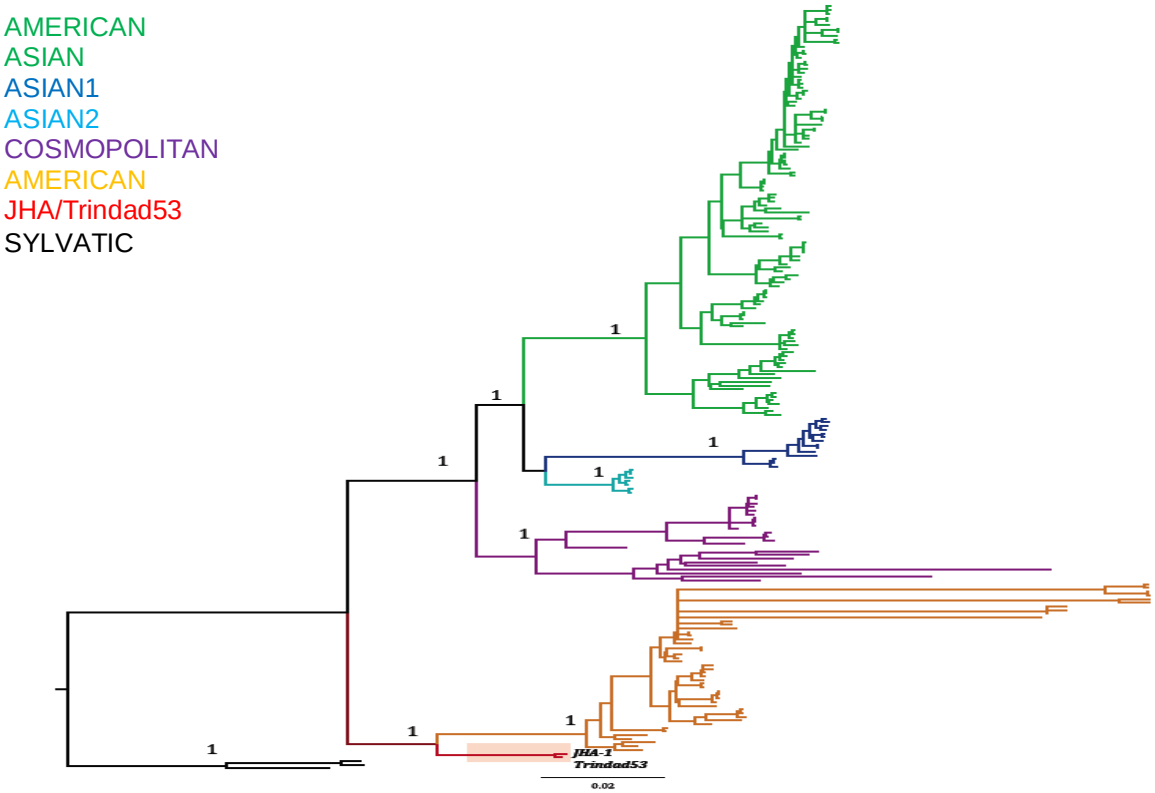

Figura 19 - Arvore de máxima credibilidade (MCC) reconstruída pelo método bayesiano com sequencias do gene do envelope dos genótipos presentes dentro do sorotipo 2 do vírus da Dengue. As cores dos ramos representam os diferentes genótipos – vide legenda a esquerda. Os valores numéricos nos principais nós correspondem ao suporte dos ramos

A cepa Trindad53 também possui característica de neurovirulência em camundongos e foi isolada em 1953 em Trinidade Tobago de um paciente com Dengue Com Sinais de Alerta/Dengue Hemorrágica. Contudo há apenas o registro da sequencia da região do Envelope do vírus no GenBank. [94]

Ainda, de acordo com a árvore de envelope, o ramo onde estão presentes as cepas neurovirulentas JHA1 e Trin53 é mais distante das demais sequências do genótipo Americano amostrados mais recentemente. Buscando um maior entendimento da distancia genética desses vírus em relação aos demais, decidimos observar a distância entre o JHA1 e os demais genótipos de Dengue 2, representados no Gráfico 5.

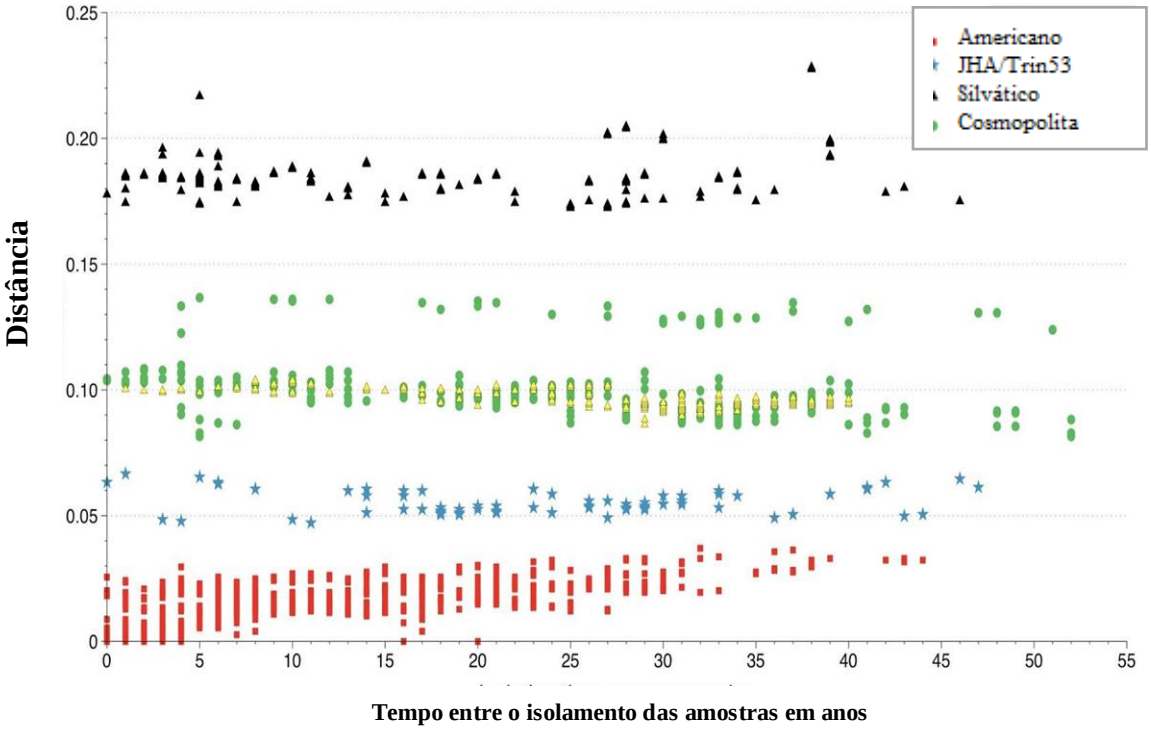

Gráfico 5 - Distância genética entre as sequências da Região de Envelope do JHA e outros genótipos de Dengue 2.

As cepas JHA e Trin53 (representadas em azul) divergem cerca de 6% das demais sequências do genótipo Americano (pontos vermelhos, com divergência média entre si de 2.5%). Contudo, a diferença do genótipo Americano para o Cosmopolita e Americano/Asiático é de 10%. Isso comprova que de fato há maior distancia entre o JHA e os demais do genótipo Americano, mas ainda é menor do que a distancia esperada para sequencias de genótipos distintos. Sabendo que isso poderia indicar que o JHA (bem como o Trin53) são vírus recombinantes, fizemos uma analise de recombinação utilizando agora o genoma completo do JHA e referencias de todos os demais genótipos, mostrando que não há evidência alguma que indique possíveis eventos de recombinação entre esse vírus.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da evolução de duas cepas de Dengue Sorotipo 2, uma não neurovirulenta (ACS-46) e outra neurovirulenta (JHA1), em diferentes sistemas de cultivo.

ACS-46:

As análises da cepa ACS-46 indicam a fixação de uma deleção de dois códons seguidos no genoma da região de Domínio I da proteína do Envelope, levando a uma deleção de dois aminoácidos nas regiões 152 e 153 (152_153delGN) do envelope durante passagem em células de mosquito.

O sítio 153 está relacionado com a adesão do vírus a receptores da célula alvo, e tem sido alvo de pesquisas para terapias antivirais visando o bloqueio da entrada do vírus a célula hospedeira. [95–99]

Em trabalhos publicados entre os anos de 2010 e 2013 foi demonstrado que mutações nos sítios de glicosilação N-67 e N-153 do envelope inviabilizam a montagem de novas partículas e entrada do vírus em células de mamífero respectivamente, impedindo assim sua replicação.[100] Um estudo realizado em 2012 demonstrou a ausência de açúcar ligado ao sítio N153 do envelope de vírus da Dengue sorotipo 2 proveniente de *Aedes albopictus*, o que leva a crer que a glicosilação dessa região pode não ser crucial para a entrada do vírus em mosquitos.[76]

Baseado nessas evidências, podemos sugerir que a deleção (456_461delTAATGA) gerada pelas múltiplas passagens possa ter um caráter adaptativo, visto que há uma melhora na capacidade de fusão viral nas células de mosquito observado através do aumento no efeito citopático. Além disso, o aumento da frequência dessa nova população entre as passagens 16 e 20 sugerem que a mesma foi positivamente selecionada nesse sistema. Ainda, a capacidade de diminuir ou anular a entrada do vírus em células de mamíferos, e o fato de que em apenas duas passagens alternadas em células de humano e mosquito a mutação desapareceu

completamente da população viral, reforçam a hipótese de que esta era de fato uma adaptação a células de inseto.

Esse desaparecimento da população mutada reforça outra hipótese que geramos durante tentativas de realizar passagens consecutivas em células de mamíferos que tínhamos como meta. Realizamos algumas tentativas de passagens consecutivas em Vero, HuH7 HepG2, todavia, após realizar a quantificação do sobrenadante constatamos uma queda drástica na quantidade de RNA viral, variando de dois a três logs, chegando ao ponto de zerá-la após três passagens e inviabilizando assim a inoculação de uma nova cultura visando a propagação viral, sendo descartada a proposta de infecção consecutiva em célula de mamífero.

Visando a perda/ganho de mutações adaptativas mais rapidamente, utilizamos como inoculo a 20ª passagem em célula de mosquito, o que provavelmente causou a dificuldade em realizar as passagens seriadas, pois como foi comprovado nas passagens alternadas, as mutações com caráter adaptativo possuem perfil deletério em células de mamífero, levando a uma queda drástica da população, inviabilizando as passagens consecutivas.

Corroborando com os resultados de alterações de perfil citopático, análise temporal dos dados de sequenciamento e o desaparecimento da população mutada em poucas passagens em células de humano, temos os resultados obtidos no experimento de *fitness*, onde comparamos as cargas virais obtidas das cepas não mutada e mutada em células de mosquito (C6/36).

Neste experimento a cepa mutada de ACS-46 obteve uma carga viral muito maior do que a cepa não mutada, indicando uma melhora no *fitness* viral para as células C6/36. Isto reforça a propriedade adaptativa da deleção, pois sabemos que uma melhora no processo replicativo em determinado sistema, ou até mesmo em sistemas correlatos, como visto na adaptação do Chikungunya para o *Aedes albopictus* [80], determina uma característica positiva a mutação.

As passagens em células de mosquito geraram outras variantes além da deleção de dois códons no envelope (C206T, T223C, C281T, A4340C, G41A, C166T, C185T, C477A), destas variantes apenas a C477A é sinônima, não alterando o resíduo de aminoácido na proteica da poliproteína. As demais variantes alteram resíduos de aminoácido das proteínas não estruturais (NS) do vírus. Tais proteínas

são relacionadas a replicação viral, tendo ação direta ou indireta com o genoma, gerando resistência a determinadas citocinas humanas ou alterando conformidade do retículo endoplasmático da célula para facilitar a formação do sítio replicativo. [29–37]

Das alterações geradas na poliproteína, 57% estão relacionadas a alteração de polaridade do resíduo do aminoácido que será inserido naquela posição, uma alteração na polaridade de determinada região na proteína pode gerar alterações de estrutura terciária, alterando drasticamente o funcionamento da proteína. [101]

Algumas destas variantes parecem estar correlacionadas entre si devido às porcentagens muito próximas na população. Aparentemente, juntamente com o aparecimento da variante A340C em algum momento após a 16ª passagem, as variantes C281T e C185T tiveram um aumento muito grande, de 2% para 30%, quando comparadas entre a 16ª e 20ª passagens. Essas alterações ocorreram respectivamente nas regiões codificantes das proteínas NS2B, NS3 e NS4A, que são proteínas responsáveis pela quebra da poliproteína (NS2B-NS3) e pela alteração do Retículo Endoplasmático da célula hospedeira, facilitando a replicação viral (NS4A). [25,29,35–37]

Este aumento pode estar correlacionado diretamente com a ação da variante A340C, que pode ter gerado sozinha uma melhora na capacidade de replicação da população que a tivesse, levando ao aumento da carga viral, fazendo com que as demais variantes presentes nessa população aumentem por carona (deriva genética) ou por agir nos processos replicativos de outros virions, aumentando assim outras populações, Ainda, é possível que essa variação seja ótima em conjunto com as demais variantes em sua própria população, aumentando suas funções durante a replicação, o que garantiria um aumento na população que possuísse esse conjunto de variantes. Contudo, seriam necessários ensaios com clones infecciosos para comprovar tais suposições, como os utilizados nos estudos de avaliação de mutações no envelope. [102–104]

A ação de mutações adaptativas já foi vista em outro arbovírus na natureza, mais especificamente no Vírus da Chikungunya, que sofreu uma mutação em um único aminoácido nas cepas asiáticas, levando a um aumento na sua capacidade de infectar *Aedes albopictus*, porém diminuindo drasticamente sua capacidade de

infectar *Aedes aegypti*, o que favoreceu sua propagação, pois a população *A. albopictus* é grande na Ásia. [82,83]

Ao analisarmos as variantes obtidas na passagem alternada entre HepG2 e C6/36, apenas uma é não sinônima, presente em região de envelope (T967), mais especificamente na região 43 da proteína, onde é observada a alteração de Fenilalanina por Leucina (F43L). Esta alteração já foi descrita em uma cepa de Dengue sorotipo 2 presente na epidemia de Dengue Hemorrágica de 1981 em Cuba.[105]

Estas análises de variantes mostram um perfil populacional completamente diferente observado nas passagens seriadas em células de mosquito, onde todas as variantes geradas em cultura de mosquito foram perdidas em poucas passagens alternadas. Essa alteração abrupta pode ocorrer por processos distintos, como efeito gargalo pelos processos de passagem celular ou seleção purificadora, devido o aparecimento de populações deletérias para células de mamífero.

Ao analisarmos todas as variantes presentes em mais de 50% da população observamos três mutações em região estrutural, sendo duas em Envelope (não sinônimas) e uma em Capsídeo (sinônima), e três em região não estrutural, todas em NS5 (sinônimas). As proteínas não estruturais estão relacionadas a replicação viral, onde a proteína NS5 desempenha a função de RNA polimerase, sendo assim a mais conservada dentro do genoma viral [106] o que explicaria a presença apenas de mutação sinônimas.

Segundo Lauring e colaboradores[64] a baixa fidelidade durante o processo replicativo dos vírus de RNA tem um custo muito grande, pois grande parte das variantes geradas por tais erros diminuem o *fitness* viral. Esse resultado seria derivado de uma quantidade muito grande de mutações não sinônimas, o que por sua vez faria com que houvesse uma seleção extremamente purificadora.

Ainda, de acordo com um estudo que analisou mutações descritas em isolados selvagens, populações de laboratório, clones de laboratório e mutações geradas randomicamente em clone infeccioso do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), há perda de no mínimo 40% da população por mutações deletérias.[107]

Infelizmente não podemos calcular a porcentagem de mutações deletérias ou que diminuam o *fitness* viral, pois precisaríamos de estudos com clones infecciosos para poder analisar o perfil de cada mutação.

Ao observarmos os dados antes de filtrar as variantes in/del, percebemos que as passagens em células de mosquito tiveram um número grande de mutações que alteram a fase de leitura, já nos vírus obtidos em células de humano não havia uma grande quantidade desse tipo de mutação. Esse caráter mutacional talvez esteja relacionado com a maior permissividade da linhagem celular C6/36 para arbovírus do que células de mamífero, permissividade essa dada talvez por uma menor complexidade de sistemas de defesa celular, ou até mesmo pela origem dos *Flavivirus*, que foi comprovado serem vírus originalmente de mosquito.[108,109] Porém em nossas análises as mutações in/del não foram consideradas devido aos erros sabidamente gerados pela plataforma escolhida para realizar o sequenciamento.

Contudo, se observarmos o perfil das mutações em mosquito e célula de humano alternada conseguimos notar que a grande maioria das mutações que prevaleceram temporalmente entre as passagens 16 e 20 em células de mosquito foram não sinônimas e ocorreram em regiões codificantes para proteínas não estruturais, que são cruciais para a replicação do vírus. Já nas passagens 4 e 6 das culturas alternadas de células de humano e células de inseto, grande parte das mutações que ocorreram em proteínas não estruturais foram sinônimas, o que poderia indicar também a maior permissividade das células de artrópode.

Um fator que também pode influenciar a observação das mutações sinônimas é MOI utilizado para as infecções. Em nossos experimentos usamos um MOI igual a 1, o que pode ser considerado alto para experimentos evolutivos. Com esse MOI, geramos uma população maior, obtendo uma maior variabilidade e consequentemente diminuindo o efeito gargalo.

Ao observarmos as taxas de mutação das populações obtidas tanto nas células de mosquito quanto nas células de humano, constatamos uma concordância com o descrito na literatura, onde Arbovírus possuem uma taxa entre 1e-3 e 1e-5 erros por nucleotídeo por replicação.[70] Quando relacionamos as taxas obtidas em células de mosquito com a obtidas em células de humano é possível notar que as taxas em células humanas é aproximadamente 0,5 log mais baixo que as obtidas em células de

mosquito e essa relação também é vista nas taxas calculadas diretamente a partir de vírus obtidos dos hospedeiros. Além dessa relação, ao observarmos o gráfico de taxas mutacionais suspeitamos que havia uma relação entre as taxas obtidas em culturas com as obtidas em hospedeiros e vetores vivos. Desta maneira calculamos a razão entre as taxas em hospedeiros e em células, obtendo razões idênticas, o que sugere proporcionalidade entre as taxas.

Esta comparação entre taxas obtidas em culturas celulares e hospedeiros vivos é algo intrigante e sugere um possível relaxamento para a ocorrência de mutações em vírus de mosquitos do que em humanos, tendo uma relação de aproximadamente meio log de diferença. Outro ponto a ser ressaltado são as taxas obtidas em cultura celular serem mais altas que as obtidas em hospedeiros vivos, isso provavelmente devido as barreiras teciduais e sistema imune presente nos seres vivos, o que levaria a uma pressão seletiva levemente maior, fazendo com que o número de mutações observadas fosse menor.

Sebastian e colaboradores [110] confirmaram a pressão decorrente do efeito gargalo exercida pelo intestino de mosquitos ao observarem a população viral em mosquitos que realizaram repasto de sangue com vírus da Dengue com mutações neutras. Segundo o autor, por serem variantes neutras a seleção positiva e negativa não teriam um grande efeito sobre elas. Tendo esse pressuposto como partida, a população obtida após o repasto deveria ser parcialmente idêntica à população ingurgitada, contudo houve uma grande redução da população inicial em amostras obtidas do intestino médio do mosquito. Desta maneira o autor sugere que o efeito gargalo imposto pelo repasto e pelo intestino faz com que a populações sofra redução drástica podendo favorecer variantes que estavam presentem em menor concentração na população inicial, pois diminuiria a disputa entre essas populações no intestino do mosquito**.**

Além do estudo com mosquitos, em um trabalho utilizando quantificação de antígenos através de citometria de fluxo comparando infecção em células de mosquito contra células de mamífero, foi observada maior quantidade de antígeno em membrana celular e intracitoplasmático em células de mosquito, sugerindo que há melhor replicação viral em células de mosquito, acarretando em um maior número de cópias e consequentemente maior chance de mutação.[111]

Contudo, nossos resultados sobre as taxas mutacionais possuem um fator limitante, o N amostral é pequeno, possuindo apenas duplicatas de cada amostra, o que não gera portanto, uma fidedignidade alta. Para creditar nossas afirmações sobre taxas mutacionais seria necessário realizar mais passagens, sequenciando-as e obtendo um N amostral maior.

JHA:

Das cepas existentes de Vírus da Dengue que possuem genoma completo sequenciado, a melhor para compararmos com a JHA é a cepa Nova Guiné C (NGC), pois ambas são pertencentes ao sorotipo 2 e apresentam neurovirulência em camundongos adultos imunocompetentes.

Foram descritos dois sítios mutados na proteína do Envelope correlacionados com a característica de neurovirulência na cepa NGC: E71D e E126K. Essas alterações no envelope foram testadas em ensaios com clones infecciosos em Vírus da Dengue sorotipo 2 e em Vírus quimérico Dengue sorotipo 4 com envelope Dengue Sorotipo 2 modificado E126K.[112,113]

Ao obtermos a sequência completa da poliproteína da cepa JHA parental, comparamos a sequência proteica do envelope com a cepa NGC, e esses dois sítios estavam presentes (D71 e K126). Contudo ao compararmos as cepas de baixa neurovirulência e sem neurovirulência, esses sítios não foram alterados.

Outro sítio descrito em NGC predito para neurovirulência é o Env402, onde a presença de Leucina nessa posição é associada a neurovirulência, porém durante o processo de atenuação do perfil neurovirulento, houve mudança de Fenilalanina para Leucina, mas quando observarmos a cepa que recuperou a virulência (P29-IC) este sítio não foi alterado.

Esses resultados sugerem que estes sítios não somente não parecem ser essenciais para a presença de neurovirulência, mas também chama atenção o fato de que nos trabalhos mencionados, a Leucina esta relacionada ao caráter agressivo do vírus, e não a fenilalanina, como observamos aqui. É possivel que por questões estruturais, já que esse vírus possui diversas outras alterações ao longo do envelope e

de outros genes, o mecanismo de neuroinvasão em camundongos Balb/C seja ligeiramente distinto.

Além disso, os resultados sugerem que o sitio E402 pode não ser o único relacionado a esta característica em nosso vírus, provavelmente pelas diferenças de genótipo, pois a cepa JHA é Americana e a cepa NGC é Asiática.

Ao observarmos a cepa que recuperou a capacidade de neurovirulência (P29_IC) a única alteração no consenso do vírus em relação a cepa não virulenta está presente na região NS4b (L113S). As proteínas não estruturais (NS) estão relacionadas a replicação viral e uma mutação em alguma dessas proteínas pode levar a um aumento na replicação, podendo gerar um caráter mais virulento.

A ausência da reversão das mutações da cepa não virulenta durante o processo de recuperação de neurovirulência sugere a não existência de um ou dois sítios determinantes para tal característica. Mais ainda, essa característica pode ser variável pelas variações de sorotipo ou genótipo estudado, gerando sempre sítios novos que não podem ser preditos como determinantes de neurovirulência de maneira generalizada, a todos os vírus da Dengue.

Um ponto negativo a ser destacado em nosso estudo de neurovirulência foi a análise apenas da sequência de poliproteína o que pode levantar outra possibilidade para a determinação da característica neurovirulenta. As regiões de UTR podem apresentar sítios que quando mutados, apresentem certo impacto no caráter de neurovirulência, contudo nossos *primers* ancoram nestas regiões, inviabilizando a análise total das mesmas. Além disso, a plataforma utilizada para realizar o sequenciamento gera muito erro de inserção e deleção e tivemos muitos eventos desse tipo nas UTRs, inviabilizando sua analise. Assim, para garantir uma analise fiel – mesmo que não do genoma completo- optamos por analisar somente a poliproteina.

Existe ainda uma terceira possibilidade, que seria a ação complementar entre as populações intra-hospedeiro durante o processo de replicação viral, levando a um caráter mais virulento. Esta possibilidade é viável pois como pode ser visto nas tabelas de variantes, os sítios que mudaram o consenso na população que recuperou a virulência (ex. L113S) já estava presente nas populações anteriores em quantidades menores (30,16%) que na população P29-IC virulenta (66,46%).

Desta maneira podemos supor que talvez sítios responsáveis por um determinado fenótipo não necessariamente estejam presentes em 100% da população viral. Mas, desde que existam variantes intra-hospedeiro capazes de conferir um dado fenótipo, este poderá ser observado mesmo que não seja decorrente de uma variante presente em 100% da população. Esta hipótese pode ser reforçada com os achados em amostras de dengue provenientes do surto de Myamar de 2001[114] , onde um *stopcodon* presente na poliproteína difundiu-se na população, tendo sido inclusive detectado em epidemias futuras, muito provavelmente através de complementação por coinfecção de células hospedeiras com vírus funcionais.

Análises filogenéticas

Os resultados obtidos pela reconstrução filogenética e distância gênica foram intrigantes. O genótipo de nossa cepa já havia sido descrito como American utilizando apenas a sequência parcial de envelope[88], o que foi confirmado em nossas análises. Contudo, foi surpreendente observar o vírus que nossa cepa agrupou como sendo o de menor distancia filogenética na análise, a cepa Trin53, que também possui característica neurovirulenta. Infelizmente a cepa Trin53 possui cadastrado no *GenBank* apenas a região de Envelope, impossibilitando estudos mais profundos a respeito dessa alta similaridade.

O ramo onde temos as cepas JHA e Trin53 apresentou-se mais distante dos genótipos Americanos atuais, indicando uma divergência considerável entre esses grupos. Para sabermos o quão divergente de fato esses grupos eram, calculamos a distância genética entre JHA, Trin53 e demais genótipos de Dengue 2. Os resultados indicam uma divergência de aproximadamente 6% em relação ao genótipo Americano atual. Essa divergência é grande, porém não suficiente para classifica-los como um novo genótipo, pois a divergência entre os genótipos Americano e os demais genótipos Americano/Asiático e Cosmopolita fica em torno de 10%

7. CONCLUSÃO

O vírus da DENV2 genótipo Americano/Asiático, aqui representado pela cepa ACS-46, não sofreu alteração fenotípica antes da 16ª passagem em células de inseto, indicando que poucas passagens em células de inseto não são suficientes para selecionar mutantes importantes.

A deleção de dois códons (456_461delTAATGA) fixada na cepa ACS-46 observada após a 16ª passagem possui perfil adaptativo devido as alterações observadas, como: aumento do tamanho dos sincícios em cultura de C6/36, aumento da carga viral gerada em cultura de células, e perda de infectividade em células de mamífero.

O caráter adaptativo das demais variantes, bem como se há relação entre a presença de duas ou mais variantes e o aumento no fitness viral não podem ser respondidos com os experimentos realizados neste estudo, sendo necessários estudos mais profundos para podermos confirmar esse caráter.

As taxas mutacionais obtidas em cultura de células de mamífero e artrópode aparentemente possuem correlação com as infecções geradas em hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Existe uma permissividade maior nas células de mosquito quando comparadas as células de mamífero, observado através do perfil mutacional das populações obtidas durante as passagens celulares. As taxas mutacionais, onde as células de mosquito obtiveram uma taxa mutacional maior que a das células de mamífero, parecem corroborar esta hipótese.

Quanto a cepa JHA fica claro que ele é um vírus divergente dos demais vírus de genótipo Americanos, já que possui distância genética media acima dos demais representantes desse genótipo. Contudo por não possuirmos a sequência completa da cepa Trindad53 não podemos afirmar se são o mesmo vírus amostrados em tempos distintos, ou se o que observamos no gene de envelope é produto de evolução convergente.

O perfil neurovirulento do JHA não foi decisivamente correlacionado com nenhuma variante presente na poliproteína no decorrer do estudo, mas pode estar

associado a populações virais atuando em conjunto durante a infecção no roedor ou a região de UTR do vírus, que não foi amplificada neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases., World Health Organization. Dengue : guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. New. Geneva: TDR : World Health Organization; 2009.

2. Organization. WH. Impact of Dengue . 2011;2011. Available from: http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html

3. Organization PAH. A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences . Hist. Dengue Dengue Hemorrhagic Fever Reg. Am. 1635-2001 2011;2011. Available from: http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue_history.htm

4. Ligon BL. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. Semin Pediatr Infect Dis 2005;16:60–5.

5. Torres JR, Torres CG V. Dengue in latin America - A unique situation. Dengue Bull.2002;26:62–9.

6. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. Clin Microbiol Rev 1990;3:376–96.

7. Tadeu L, Figueiredo M. Dengue in Brazil : Past , Present and Future Perspective Brazilian flaviviruses. Dengue Bull 2003;27:25–33.

8. Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2009;51:247–53.

9. Laguardia J, Domingues CMA, Carvalho C, Lauerman C, Macário E, Glatt R. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan): desafios no desenvolvimento de um sistema de informação em saúde. Epidemiol e serviços saúde 2004;13:135–46.

10. Rocco IM. Ocorrência de dengue no Estado de São Paulo, Brasil, de 1986 a 1996. Rev Inst Adolfo Lutz 1998;57:7–12.

11. Souza LTM. Dengue in the State of São Paulo-Epidemiological vigilance. III Encontro Nac. Virol.1986;39.

12. Souza LTM. Dengue in Ribeiro do Vale: The frist autochthonous cases in São Paulo. IV Encontro Nac. Virol.1988;41.

13. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Spec Program Res Train Trop Dis 2009;x, 147.

14. Farrar JJ, Hien TT, Horstick O, Hung NT, Jaenisch T, Junghanns T, et al. Dogma in classifying dengue disease. Am. J. Trop. Med. Hyg.2013;89:198–201.

15. Halstead SB. Dengue: The syndromic basis to pathogenesis research. Inutility of the 2009 WHO case definition. Am J Trop Med Hyg 2013;88:212–5.

16. Brasil. Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. 2013.

17. Singhi S, Kissoon N, Bansal A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. J Pediatr (Rio J) 2007;83:S22–35.

18. Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. Neurol India 2010;58:585–91.

19. Isturiz RE, Gubler DJ, Brea del Castillo J. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. Infect Dis Clin North Am 2000;14:121–40, ix.

20. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. Med J Armed Forces India 2015;71:67–70.

21. Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. Acta Biochim Biophys Sin 2008;40:91–101.

22. Messer WB, de Alwis R, Yount BL, Royal SR, Huynh JP, Smith SA, et al. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111:1939–44.

23. Allonso D, Andrade IS, Conde JN, Coelho DR, Rocha DCP, da Silva ML, et al. Dengue Virus NS1 Protein Modulates Cellular Energy Metabolism by Increasing Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. J Virol 2015;89:11871–83.

24. Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Hurtado-Monzon AM, Alcaraz-Estrada SL, et al. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. Virology 2015;484:113–26.

25. Amorim JH, Alves RP dos S, Boscardin SB, Ferreira LC de S. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. Virus Res 2014;181:53–60.

26. Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi P-Y. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. J Virol 2013;87:4609–22.

27. Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, Hyde J, Mackenzie JM, Khromykh A a. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. J Virol 2008;82:4731–41.

28. Kummerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. J Virol 2002;76:4773–84.

29. Meng F, Badierah RA, Almehdar HA, Redwan EM, Kurgan L, Uversky VN. Unstructural biology of the dengue virus proteins. FEBS J 2015;282:3368–94.

30. Incicco JJ, Gebhard LG, González-Lebrero RM, Gamarnik A V., Kaufman SB. Steady-State NTPase Activity of Dengue Virus NS3: Number of Catalytic Sites, Nucleotide Specificity and Activation by ssRNA. PLoS One 2013;8.

31. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. FEBS Lett 2009;583:691–6.

32. Hung Y-F, Schwarten M, Hoffmann S, Willbold D, Sklan E, Koenig B. Amino Terminal Region of Dengue Virus NS4A Cytosolic Domain Binds to Highly Curved Liposomes. Viruses 2015;7:4119–30.

33. Lee CM [Author], Xie X [Author], Zou J [Author], Li S-H [Author], Lee MYQ [Author], Dong H [Author], et al. Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. J Virol 2015;89:6171–83.

34. Teo CSH, Chu JJH. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. J Virol 2014;88:1897–913.

35. Zou J, Lee LT, Wang QY, Xie X, Lu S, Yau YH, et al. Mapping the Interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. J Virol 2015;89:3471–83.

36. Muñoz-jordán JL, Laurent-rolle M, Martínez-sobrido L, Ashok M, Ian W, Mun JL. Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. J Virol 2005;79:8004–13.

37. Kakumani PK, Ponia SS, S RK, Sood V, Chinnappan M, Banerjea AC, et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. J Virol 2013;87:8870–83.

38. Klema VJ, Ye M, Hindupur A, Teramoto T, Gottipati K. Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. 2016;5:1–21.

39. Lim SP, Noble CG, Shi P-Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. Antiviral Res 2015;119:57–67.

40. Freire M, Cruz-oliveira C, Conceic M, Higa LM, Castanho MARB, Poian AT Da. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells AND ITS COMPONENTS. 2015;155–70.

41. Brinton MA. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. Annu Rev Microbiol 2002;56:371–402.

42. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. Cell Host Microbe 2009;5:318–28.

43. Simmons CP, McPherson K, Van Vinh Chau N, Hoai Tam DT, Young P, Mackenzie J, et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. Vaccine 2015;33:7061–8.

44. Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. Medicina (B Aires) 1999;32:15–20.

45. Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. Blood 1989;74:1235–40.

46. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. J Virol 2004;78:12647–56.

47. Agarwal JP, Bhattacharyya PC, Das SK, Sharma M, Gupta M. Dengue Encephalitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009;40:54–5.

48. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. Vaccine 2011;29:7221–8.

49. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. Annu Rev Immunol 2011;29:587–619.

50. Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. Vaccine 2005;23:849–56.

51. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. Cell Mol Life Sci 2010;67:2773–86.

52. Bryant JE, Calvert AE, Mesesan K, Crabtree MB, Volpe KE, Silengo S, et al. Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated Aedes aegypti mosquitoes. Virology 2007;366:415–23.

53. Pryor MJ, Wright PJ. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. J Gen Virol 1994;75 (Pt 5):1183–7.

54. Barata EA, Costa AI, Chiaravalloti Neto F, Glasser CM, Barata JM, Natal D. [Aedes aegypti (l.) population in an endemic area of dengue in Southeast Brazil]. Rev Saude Publica 2001;35:237–42.

55. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The Aedes aegypti toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog 2008;4:e1000098.

56. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. Viruses2015;7:3741–67.

57. Cheng G, Liu Y, Wang P, Xiao X. Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. Trends Parasitol.2015;

58. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Indian J Dermatol 2010;55:68–78.

59. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. Postgr Med J 2004;80:588–601.

60. Donalisio MR, Glasser CM. Entomological Surveillance and Control of Dengue Fever Vectors. Rev Bras Epidemiol 2002;5:14.

61. Tauil PL. [Critical aspects of dengue control in Brazil]. Cad Saude Publica 2002;18:867–71.

62. Belshaw R, Sanjuán R, Pybus OG. Viral mutation and substitution: Units and levels. Curr Opin Virol 2011;1:430–5.

63. Combe M, Sanju??n R. Variation in RNA Virus Mutation Rates across Host Cells. PLoS Pathog 2014;10.

64. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. Nat Rev Microbiol 2013;11:327–36.

65. Elena SF. RNA virus genetic robustness: Possible causes and some consequences. Curr Opin Virol 2012;2:525–30.

66. Cuevas JM, Geller R, Garijo R, L??pez-Aldeguer J, Sanjuán R. Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. PLoS Biol 2015;13.

67. Ciota AT, Jia Y, Payne AF, Jerzak G, Davis LJ, Young DS, et al. Experimental passage of St. Louis encephalitis virus in vivo in mosquitoes and chickens reveals evolutionarily significant virus characteristics. PLoS One 2009;4:e7876.

68. Weaver SC, Brault AC, Kang W, Holland JJ. Genetic and fitness changes accompanying adaptation of an arbovirus to vertebrate and invertebrate cells. J Virol 1999;73:4316–26.

69. Romano CM, Lauck M, Salvador FS, Lima CR, Villas-Boas LS, Araújo ESA, et al. Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. PLoS One 2013;8.

70. Ciota AT, Kramer LD. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. Viruses 2010;2:2594–617.

71. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. J Virol 2010;84:9733–48.

72. Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. PLoS Pathog 2009;5:e1000467.

73. Thai KT, Henn MR, Zody MC, Tricou V, Minh Nguyet N, Charlebois P, et al. High-resolution analysis of intra-host genetic diversity in dengue virus serotype 1 identifies mixed infection. J Virol 2011;

74. Ciota AT, Lovelace AO, Ngo KA, Le AN, Maffei JG, Franke MA, et al. Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. Virology 2007;357:165–74.

75. Sim S, Dimopoulos G. Dengue virus inhibits immune responses in Aedes aegypti cells. PLoS One 2010;5:e10678.

76. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. J Virol 2005;79:1223–31.

77. Taylor WP, Marshall ID. Adaptation studies with Ross River virus: retention of field level virulence. J Gen Virol 1975;28:73–83.

78. Taylor WP, Marshall ID. Adaptation studies with Ross River virus: laboratory mice and cell cultures. J Gen Virol 1975;28:59–72.

79. Deardorff ER, Fitzpatrick KA, Jerzak G V, Shi PY, Kramer LD, Ebel GD. West Nile Virus Experimental Evolution in vivo and the Trade-off Hypothesis. PLoS Pathog 2011;7:e1002335.

80. Elena SF, Sanjuan R, Borderia A V, Turner PE. Transmission bottlenecks and the evolution of fitness in rapidly evolving RNA viruses. Infect Genet Evol 2001;1:41–8.

81. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. Viruses2014;6:3991–4004.

82. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathog 2007;3:e201.

83. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. PLoS Pathog 2011;7:e1002412.

84. Brault AC, Powers AM, Ortiz D, Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Weaver SC. Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:11344–9.

85. Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, et al. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. J Clin Virol 2010;47:49–53.

86. Pattanakitsakul SN, Rungrojcharoenkit K, Kanlaya R, Sinchaikul S, Noisakran S, Chen ST, et al. Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection. J Proteome Res 2007;6:4592–600.

87. Das S, Garver L, Ramirez JR, Xi Z, Dimopoulos G. Protocol for dengue infections in mosquitoes (A. aegypti) and infection phenotype determination. J Vis Exp 2007;220.

88. Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, et al. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. PLoS One 2012;7:1–12.

89. Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. Mol Biol Evol 2012;29:1969–73.

90. Rambaut website. Rambaut website . 2015; http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

91. Swofford DL. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10. 21 Libr 2003;11pp.

92. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 1998;14:817–8.

93. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol 1999;73:152–60.

94. ANDERSON CR, DOWNS WG, HILL AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. Science 1956;124:224–5.

95. Alen MMF, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. J. Trop. Med.2012;

96. Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD. Inhibition of dengue virus entry and multiplication into monocytes using RNA interference. PLoS Negl Trop Dis 2011;5.

97. Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. Int J Med Sci 2013;10:719–29.

98. Altmeyer R. Virus attachment and entry offer numerous targets for antiviral therapy. Curr Pharm Des 2004;10:3701–12.

99. Dubayle J, Vialle S, Schneider D, Pontvianne J, Mantel N, Adam O, et al. Site-specific characterization of envelope protein N-glycosylation on Sanofi Pasteur's tetravalent CYD dengue vaccine. Vaccine 2015;33:1360–8.

100. Mondotte J a, Lozach P-Y, Amara A, Gamarnik A V. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. J Virol 2007;81:7136–48.

101. Betts MJ, Russell RB. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data: Second Edition. 2007. página 311–42.

102. Roehrig JT, Butrapet S, Liss NM, Bennett SL, Luy BE, Childers T, et al. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. Virology 2013;441:114–25.

103. Huang CY-H, Butrapet S, Moss KJ, Childers T, Erb SM, Calvert AE, et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. Virology 2010;396:305–15.

104. Butrapet S, Childers T, Moss KJ, Erb SM, Luy BE, Calvert AE, et al. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. Virology 2011;413:118–27.

105. Guzman MG, Deubel V, Pelegrino JL, Rosario D, Marrero M, Sariol C KG. Partial nucleotide and amino acid sequences of the envelope and the envelope/nonstructural protein-1 gene junction of four dengue-2 virus strains isolated during the 1981 Cuban epidemic. Am J Trop Med Hyg 1995;52:241–6.

106. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. Antiviral Res.2010;87:125–48.

107. Sanjuán R, Moya A, Elena SF. The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:8396–401.

108. Cook S, Moureau G, Kitchen A, Gould EA, de Lamballerie X, Holmes EC, et al. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. J. Gen. Virol.2012;93.

109. Figueiredo LT. Uso de células de Aedes albopictus C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. Rev Soc Bras Med Trop 1990;23:13–8.

110. Lequime S, Fontaine A, Ar Gouilh M, Moltini-Conclois I, Lambrechts L. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. PLoS Genet 2016;12:e1006111.

111. Sydow FF, Santiago M a, Neves-Souza PC, Cerqueira DI, Gouvea a S, Lavatori MF, et al. Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95:483–9.

112. Gualano RC, Pryor MJ, Cauchi MR, Wright PJ, Davidson AD. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. J Gen Virol 1998;79:437–46.

113. Bray M, Men R, Tokimatsu I, Lai CJ. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. J Virol 1998;72:1647–51. A

114. Aaskov J, Buzacott K, Thu HM, Lowry K, Holmes EC. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and Aedes mosquitoes. Science 2006;311:236–8.

Anexo 1 – Projetos Paralelos

Este projeto de mestrado faz parte de um projeto maior, que além do estudo do *fitness* viral em culturas celulares, também objetiva realizar infecções em *Aedes* e os vírus extraídos destes mosquitos são analisados. Para tal estudo, em conjunto com o Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, criamos um alimentador artificial para mosquitos de baixo custo descrito em:

Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, **Salvador FS**, Karina-Costa M, Ioshino RS, et al. (2013) Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS ONE 8(1): e53816. doi:10.1371/journal.pone.0053816

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

André Luis Costa-da-Silva[1]*, Flávia Rosa Navarrete[1], Felipe Scassi Salvador[2], Maria Karina-Costa[1], Rafaella Sayuri Ioshino[1], Diego Soares Azevedo[1], Desirée Rafaela Rocha[1], Camila Malta Romano[2], Margareth Lara Capurro[1]

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, 2 Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

Aedes aegypti, the main vector of dengue virus, requires a blood meal to produce eggs. Although live animals are still the main blood source for laboratory colonies, many artificial feeders are available. These feeders are also the best method for experimental oral infection of *Ae. aegypti* with Dengue viruses. However, most of them are expensive or laborious to construct. Based on principle of Rutledge-type feeder, a conventional conical tube, glycerol and Parafilm-M were used to develop a simple *in-house* feeder device. The blood feeding efficiency of this apparatus was compared to a live blood source, mice, and no significant differences ($p = 0.1189$) were observed between artificial-fed (51.3% of engorgement) and mice-fed groups (40.6%). Thus, an easy to assemble and cost-effective artificial feeder, designated "Glytube" was developed in this report. This simple and efficient feeding device can be built with common laboratory materials for research on *Ae. aegypti*.

Citation: Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, et al. (2013) Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS ONE 8(1): e53816. doi:10.1371/journal.pone.0053816

Editor: Pedro Lagerblad Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received October 18, 2012; **Accepted** December 3, 2012; **Published** January 14, 2013

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

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (#2008/10254-1; #2009/53637-0) - www.fapesp.br, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Departamento de Ciência e Tecnologia – DECIT (#555648/2009-5) - www.cnpq.br, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - www.capes.gov.br, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM - www.inctem.bioqmed.ufrj.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: alcosta@icb.usp.br

Introduction

Blood feeding of *Aedes aegypti*, the major dengue viruses' vector, is a fundamental part of routine protocols to maintain mosquito colonies in insectary facilities since a blood meal is required for egg production by females [1]. After bioethical certification by animal-care committees [2,3], anesthetized or immobilized live animals are used frequently as a source of blood for mosquitoes [4]. However, use of live animals is not possible in many circumstances. For example, the lack of animal facilities or an animal-use regulatory or permitting structure can limit blood provision. Furthermore, the "3 Rs" principles (reduction, refinement and replacement) in the scientific use of live animals [5] also need to be considered when feeding anautogenous mosquito species. Artificial feeders can be applied to replace live animals as blood sources [4]. Dengue virus infection of *Ae. aegypti* for experimental proposes is usually done with a titered viremic blood meal and requires an artificial blood-feeder system [6,7].

There are numerous reports showing successful development and use of different devices to artificially feed blood-sucking invertebrate vectors of human pathogens [8–10]. Artificial feeding apparati for *Ae. aegypti* also are represented extensively in the literature [11–17]. These approaches share common features. Blood is placed between a heating element (used to mimic vertebrate blood temperature) and a thin membrane, which females penetrate with their proboscis to access and imbibe the blood. One of the most popular devices is Rutledge-type feeder with Parafilm-M® simulating the skin [11]. Several based versions are available, but a few number of these devices is easy to assemble with common materials available in research laboratories and cost-effective [15].

We developed a simple artificial membrane-feeding method using a standard conical tube and Parafilm M as a simplified and convenient apparatus to facilitate the *Ae. aegypti* artificial blood-feeding.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments with mice were carried out in accordance with the guidelines of the Ethical Principles for Experiment on Animals adopted by Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de laboratório (SBCAL) and approved by the Institutional Ethics Review Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA)-Universidade de São Paulo, protocol #014.

Os estudos atuais geraram a descrição do genoma da poliproteína de mais uma cepa neurovirulenta para camundongos adultos imunocompetentes, publicado em:

Salvador FS, Amorim JH, Alves RPS, Pereirab SA, Ferreira LCS, Romano CR. Complete Genome Sequence of an Atypical Dengue Virus Serotype 2 Lineage Isolated in Brazil. Genome Announc. July/August 2015 vol. 3 no. 4e00779-15

genomeA
Journals.ASM.org

Complete Genome Sequence of an Atypical Dengue Virus Serotype 2 Lineage Isolated in Brazil

Felipe Scassi Salvador,[a] Jaime Henrique Amorim,[b] Rubens Prince Santos Alves,[b] Sara A. Pereira,[b] Luis Carlos Souza Ferreira,[b] Camila Malta Romano[a]

São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil[a]; Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil[b]

Here, we report the complete polyprotein sequence of a dengue virus 2 strain isolated in Brazil. This virus belongs to the American genotype and has the ability to cause neurovirulence in immunocompetent adult mice. The data presented here may help understand the genetic determinants responsible for neurovirulence.

Received 8 June 2015 **Accepted** 12 June 2015 **Published** 16 July 2015

Citation Salvador FS, Amorim JH, Alves RPS, Pereira SA, Ferreira LCS, Romano CM. 2015. Complete genome sequence of an atypical dengue virus serotype 2 lineage isolated in Brazil. Genome Announc 3(4):e00779-15. doi:10.1128/genomeA.00779-15.

Copyright © 2015 Salvador et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license.

Address correspondence to Camila Malta Romano, cmromano@usp.br.

Dengue virus (DENV), which is composed of four distinct serotypes (DENV1 to -4), is responsible for the most prevalent arthropod-borne viral infection of humans in tropical and subtropical countries. The mechanisms involved in dengue pathogenesis and severity of the symptoms vary according to host and viral factors. In fact, natural DENV variants may express distinct molecular and physiological features that can impact viral fitness and virulence.

We report here the near-full-length genome sequence of an American strain of DENV2 (JHA1 strain). This virus was isolated from a patient in Belém do Pará, Brazil, presenting with dengue fever (1), and this strain was observed to be neurovirulent in immunocompetent adult mice.

The partial sequencing of the envelope and nonstructural 1 (NS1) genes of the JHA1 strain showed that the virus belongs to the serotype 2 American genotype. Since the capacity to kill immunocompetent adult mice after intracranial inoculation is an atypical virulence property of this virus, we decided to determine the full-length sequence encoding the viral polyprotein.

The virus was PCR amplified using a previously described protocol (2) with three subsets of primers that covered the complete polyprotein. Fragments were sequenced using the Ion Torrent platform (Life Technologies). Reads were assembled using the genome of a DENV2 American genotype virus as a reference (accession no. JX966380).

Phylogenetic analysis using both envelope and complete genome confirmed that this virus is a DENV2 serotype of the American genotype. Nevertheless, JHA1 was the most divergent virus among all American reference genomes ($n = 29$; GenBank accession numbers HM582099 to HM582117, GQ868588, GQ868589, GQ868599, EU056811, EU056812, FJ898449, JX966380, AY702040, and AY744147). Genetic distance was estimated for the American viruses (excluding JHA1) and also between JHA1 and other American strains. The average distance (p-distance) among American viruses (without JHA1) was 0.015, which is in accordance with the genetic distance observed for viruses belonging to the same genotype. However, JHA1 presented about 6.0% divergence (p-distance = 0.058 to 0.064) from other American viruses. Intriguingly, according to the envelope-based tree, JHA1 was very closely related to Trin53, which was isolated in 1953 from a female patient in Trinidad and Tobago (3). A pairwise comparison of Trin53 and JHA1 (1,485 bp) revealed five synonymous changes and one nonsynonymous change (p-distance = 0.033). Unfortunately, there is no available sequence other than the envelope gene of Trin53 to allow for a more detailed comparison between these two strains.

Similarities to the Trin53 virus were not restricted to the envelope gene. Similarly to Trin53, JHA1 rapidly replicates in brains of suckling mice and causes encephalitis. Nevertheless, JHA1, in contrast to Trin53, is harmful to adult immunocompetent mice.

Although with the available information, no clear conclusions can be drawn regarding the polymorphic sites that confer such neurovirulence to JHA1, a comparison with the New Guinea C (NGC) neurovirulent mouse-adapted strain revealed that both viruses have a lysine (K) at position 126, identified as a major determinant of neurovirulence in NGC (4).

In sum, we described here the complete polyprotein sequence of a DENV2 isolated in Brazil, which is atypically neurovirulent to adult immunocompetent mice and belongs to the American genotype.

Nucleotide sequence accession numbers. The genome described in this work has been deposited in GenBank under the accession no. JQ686088. The version described in this paper is the updated version, JQ686088.2.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by FAPESP grants 2012/15381-7, 2012/51204-2, and 2011/51761-6.

REFERENCES

1. Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, de Souza Ferreira LC. 2012. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encepha-

Downloaded from http://genomea.asm.org/ on June 27, 2016 by Sistema Integrado de Bibliotecas-USP/FOB

Ainda, o atual projeto é um aprofundamento de um projeto anterior que comparou a diversidade intra hospedeiro e inter hospedeiro do vírus da dengue durante um surto ocorrido em 2010. Minha participação nesse projeto foi particularmente centrada as clonagens de fragmentos amplificados de DENV2, por PCR, em vetores de clonagem, e seqüenciamento dos clones. Dentro da ideia geral do projeto, contribuí com uma analise em paralelo, onde a ideia era comparar as metodologias de Sanger e seqüenciamento em larga escala para a analise de variabilidade intra-hospedeiro. Como fruto desse trabalho, produzimos a seguinte publicação:

Romano CM, Lauck M, **Salvador FS**, Lima CR, Villas-Boas LS, et al. (2013) Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. PLoS ONE 8(8): e70318. doi:10.1371/journal.pone.0070318

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak

Camila Malta Romano[1]*, Michael Lauck[2], Felipe S. Salvador[1], Célia Rodrigues Lima[1], Lucy S. Villas-Boas[1], Evaldo Stanislau A. Araújo[3], José Eduardo Levi[1], Claudio Sergio Pannuti[1], David O'Connor[2], Esper Georges Kallas[4]

1 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (LIMHC), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2 Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Wisconsin–Madison, Madison, Wisconsin, United States of America, 3 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 4 Faculdade de Medicina, Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: High genetic diversity at both inter- and intra-host level are hallmarks of RNA viruses due to the error-prone nature of their genome replication. Several groups have evaluated the extent of viral variability using different RNA virus deep sequencing methods. Although much of this effort has been dedicated to pathogens that cause chronic infections in humans, few studies investigated arthropod-borne, acute viral infections.

Methods and Principal Findings: We deep sequenced the complete genome of ten DENV2 isolates from representative classical and severe cases sampled in a large outbreak in Brazil using two different approaches. Analysis of the consensus genomes confirmed the larger extent of the 2010 epidemic in comparison to a previous epidemic caused by the same viruses in another city two years before (genetic distance = 0.002 and 0.0008 respectively). Analysis of viral populations within the host revealed a high level of conservation. After excluding homopolymer regions of 454/Roche generated sequences, we found 10 to 44 variable sites per genome population at a frequency of >1%, resulting in very low intra-host genetic diversity. While up to 60% of all variable sites at intra-host level were non-synonymous changes, only 10% of inter-host variability resulted from non-synonymous mutations, indicative of purifying selection at the population level.

Conclusions and Significance: Despite the error-prone nature of RNA-dependent RNA-polymerase, dengue viruses maintain low levels of intra-host variability.

Citation: Romano CM, Lauck M, Salvador FS, Lima CR, Villas-Boas LS, et al. (2013) Inter- and Intra-Host Viral Diversity in a Large Seasonal DENV2 Outbreak. PLoS ONE 8(8): e70318. doi:10.1371/journal.pone.0070318

Editor: Cecilio López-Galíndez, Centro Nacional de Microbiología - Instituto de Salud Carlos III, Spain

Received February 5, 2013; **Accepted** June 18, 2013; **Published** August 2, 2013

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

Funding: The present work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP grant #10/12313-5 to CMR) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologico, Brazilian Ministry of Science and Technology (CNPq, grant #476088/2009-7 to EGK). URL of FAPESP: www.fapesp.br; URL of CNPq: www.cnpq.br; URL of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior: www.capes.gov.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This work was also made possible in part by National Institutes of Health grant R01 AI077376-04A1. The research was conducted, in part, at a facility constructed with support from Research Facilities Improvement Program grants RR15459-01 and RR020141-01.

Competing Interests: The authors state that the co-author Dr Esper George Kallas is currently a PLOS ONE Editorial Board member and also declare that this does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: cmromano@usp.br

Introduction

Dengue is the most frequent arthropod-borne human viral infection in tropical and sub-tropical regions, with one hundred million people at risk annually. In the last two decades, Brazil has been responsible for more than 60% of the total reported dengue fever cases in the Americas, experiencing severe yearly outbreaks of serotypes 1 to 3 [1]. In 2008, serotype 4 re-emerged in the northern region of Brazil [2] and rapidly spread to other regions, causing small outbreaks in at least six different states. Today, the country experiences outbreaks of all four serotypes. For this study, samples were collected during a large outbreak in the State of São Paulo coastal region during the first semester of 2010, with more than 108,000 reported cases, including 81 deaths associated with the severe forms of the disease [3]. This epidemic affected a geographic area nearby the city of Santos, with the greatest number of cases reported in five nearby cities (Figure 1).

Dengue has limited intra-genotype diversity, which is modulated by two main processes: (i) the host's immune response, which exerts a selective pressure on the virus, and (ii) the bottlenecks at transmission (two in this case, the vertebrate-invertebrate alternate cycle) [4]. As a result, a balance between variability gain due to mutations in each host and the maintenance of these mutations through natural selection is shaping the resulting viral diversity observed at the population level.

Our current understanding of dengue intra-host diversity has been mostly limited to the analysis of single genes of dengue serotypes 1 to 3 using conventional cloning and Sanger sequencing methods [5–7]. Most studies agree that the level of intra-host diversity is relatively high with mean pairwise differences reaching

Anexo 2 – Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **183** nas fls. **139** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Um novo caminho para a busca racional de uma vacina efetiva contra a dengue"* do qual participam o(s) aluno(s), **Jaime Henrique Amorim Santos,Rúbens Prince dos Santos Alves, Denicar Lina Naascimento,Raíza Sales P. Bezerra e a especialista de laboratório Sandra Regina Alexandre,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.02.13, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Anexo 3– Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 16 em C6/36

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
1296	Deleção	TAATGA	-	1471	69,61	29,18
1296	Substituição	TAATGACAC	AG	1471	1,97	24,61
1296	Substituição	TAATGACAC	AGGAA	1471	1,36	27,06
1296	Substituição	TAATGACAC	A	1471	1,02	27,93
1296	Substituição	TAATGA	AG	1471	0,82	28,54
1296	Deleção	TA	-	1471	0,54	28,74
1296	Substituição	TAATGA	AATG	1471	0,54	29,86
1296	Substituição	TAATGACAC	CACA	1471	0,54	28,58
1296	Substituição	TAATGAC	CA	1471	0,41	29
1296	Substituição	TAATGAC	AAGGA	1471	0,41	27,5
1296	Deleção	T	-	1471	0,34	30,2
1296	Substituição	TAATGACAC	G	1471	0,34	26,4
1296	Substituição	TAATGACAC	AA	1471	0,27	25,74
1296	Substituição	TAATGACAC	AAGGAA	1471	0,27	20,93
1297	Deleção	AATGACAC	-	1471	0,34	31,73
1298	SNV	A	G	1471	6,53	30,55
1298	Substituição	ATGA	G	1471	1,02	31,08
1298	Substituição	ATGACAC	GG	1471	0,2	24,44
1298	Substituição	ATGA	GTG	1471	0,14	31,2
1299	Substituição	TGACAC	GGAA	1471	0,2	31,84
1299	Substituição	TGA	G	1471	0,14	23,07
4258	SNV	T	C	195	14,36	28,11
4466	SNV	G	A	188	15,96	27,9
7206	SNV	C	A	244	24,59	29,33
9852	SNV	A	G	101	53,47	27,44
10307	SNV	T	G	79	15,19	30,17
10307	SNV	T	A	79	5,06	27,75
10308	Deleção	G	-	80	27,5	26,73
10310	SNV	G	A	79	31,65	27,28
10312	SNV	A	G	79	31,65	27,72

Anexo 4– Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 16 em C6/36

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
15	SNV	A	G	529	1,13	24,33
552	SNV	T	C	1436	2,44	29,66
561	SNV	A	C	1460	2,74	28,58
951	Deleção	C	-	1417	1,13	19,69
977	Deleção	T	-	1261	1,27	14,12
1046	SNV	C	T	1241	6,93	30,69
1297	SNV	A	G	717	2,93	30,29
1298	SNV	A	G	679	12,67	30,17
1299	Deleção	TGACAC	-	1307	47,67	27,4
1299	SNV	T	G	681	2,79	29,53
1299	Deleção	T	-	681	2,35	20,69
1301	Deleção	A	-	693	2,89	25,75
1301	SNV	A	G	693	1,3	27,67
1302	Deleção	C	-	649	2,93	27,68
1304	Deleção	C	-	664	4,52	21,87
1597	SNV	T	C	1580	1,84	29,76
1722	Inserção	-	A	1300	1,23	17,75
1746	SNV	T	C	1250	1,84	30,96
1791	SNV	T	C	1472	1,15	27,59
1890	SNV	C	T	1723	8,88	28,59
2459	Deleção	C	-	1794	1,06	23,42
2464	SNV	C	A	1831	1,15	24,14
2469	SNV	A	G	1461	8,21	27,13
2842	Deleção	G	-	2041	1,08	18,27
3067	SNV	G	T	1239	3,31	23,37
3067	Deleção	G	-	1239	1,78	17,36
3171	SNV	A	G	1503	1,13	27,94
3285	SNV	T	C	1328	4,14	27,58
3285	Deleção	T	-	1328	2,41	20,78
3310	Deleção	T	-	1316	1,37	22,89
3999	SNV	T	G	180	2,22	28
4015	SNV	T	G	163	4,91	27,62
4018	SNV	A	G	171	2,34	32,25
4196	SNV	A	G	157	1,27	32
4253	SNV	T	G	179	1,68	29
4258	SNV	T	C	188	14,89	27,93
4264	SNV	A	G	189	2,12	32
4267	SNV	A	G	189	1,06	33,5

4283	Deleção	G	-	186	1,08	18,5
4301	SNV	A	G	178	1,12	30,5
4316	SNV	C	T	182	2,2	26
4375	SNV	A	G	175	2,29	31,25
4406	SNV	G	T	176	1,7	30,67
4449	SNV	T	C	188	1,06	26,5
4466	SNV	G	A	165	16,36	23,37
4627	SNV	T	C	188	1,06	32,5
4769	SNV	T	C	181	1,1	23,5
4858	SNV	A	G	202	6,44	27,85
4929	SNV	C	G	184	1,09	28
4985	Deleção	G	-	225	1,33	14
5862	SNV	C	T	151	1,99	28,33
5898	Deleção	T	-	160	1,25	16
5951	SNV	T	C	161	1,24	30
6313	SNV	A	G	168	3,57	24,33
6325	SNV	T	C	192	2,08	31,25
6428	SNV	A	G	181	1,1	34
6445	SNV	C	T	189	4,23	29,12
6464	SNV	C	T	185	2,7	28,4
6585	SNV	A	G	203	6,4	29,62
6861	SNV	T	C	269	2,97	27,25
6883	SNV	T	C	291	5,15	31,13
7206	SNV	C	A	234	25,21	29,64
7286	Deleção	C	-	241	1,24	22
7499	Inserção	-	A	235	1,7	19,75
7608	SNV	C	T	154	1,95	22,67
7666	SNV	T	C	112	1,79	30,5
7885	Deleção	G	-	87	2,3	14,5
8256	SNV	A	G	105	1,9	28
9916	Deleção	A	-	105	1,9	18,5
9975	SNV	A	G	86	2,33	30,5

Anexo 5 - Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 20 em C6/36

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
1046	SNV	C	T	1698	32,8	27,89
1296	Deleção	TA	-	1431	0,28	23,76
1296	Substituição	TAAT	A	1431	0,7	22,75
1296	Deleção	TAAT	-	1431	0,42	24,72
1296	Deleção	TAATGA	-	1431	46,82	28,64
1296	Substituição	TAATGA	AAT	1431	0,14	25,83
1296	Substituição	TAATGAC	CA	1431	0,49	28,78
1296	Substituição	TAATGAC	AGA	1431	0,35	27,97
1296	Substituição	TAATGAC	AAGA	1431	0,14	26,12
1296	Substituição	TAATGACA	AATAC	1431	0,21	30,33
1296	Deleção	TAATGACAC	-	1431	11,46	27,12
1296	Substituição	TAATGACAC	AG	1431	1,05	19,8
1296	Substituição	TAATGACAC	CACA	1431	0,56	28,61
1296	Substituição	TAATGACAC	ATGAA	1431	0,28	25,08
1296	Substituição	TAATGACAC	A	1431	0,14	20,16
1298	Deleção	A	-	1431	0,21	15,71
1298	Substituição	ATGA	G	1431	2,87	29,99
1298	Substituição	ATGACAC	G	1431	0,21	22,78
1299	Substituição	TGA	G	1431	0,28	24,78
4258	SNV	T	C	1876	23,35	27,92
4316	SNV	C	T	2050	35,71	26,57
4375	SNV	A	C	1864	19,69	28,83
4466	SNV	G	A	1862	26,58	28,3
6464	SNV	C	T	1614	35,94	28,23
7206	SNV	C	A	2553	45,32	29,24
10307	SNV	T	G	1495	34,72	29,74
10308	Deleção	G	-	1504	49,14	26,56

Anexo 6 - Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 20 em C6/36

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade Média
944	Inserção	-	A	1950	1,33	22,12
977	Deleção	T	-	1444	1,52	16,18
1046	SNV	C	T	1622	33,23	29,17
1090	Inserção	-	A	1674	1,97	17,42
1101	Deleção	C	-	1528	1,9	17,97
1296	Deleção	T	-	1150	60	27,55
1299	Deleção	TGACAC	-	1267	13,1	27,33
1299	Deleção	T	-	1125	3,38	22,05
1301	Deleção	A	-	1135	2,2	27,36
1301	SNV	A	G	1135	1,94	26,27
1597	SNV	T	C	1961	2,96	27,36
1890	SNV	C	T	1498	3,27	29,73
2370	Inserção	-	A	1557	1,35	20,86
2469	SNV	A	G	1075	2,14	24,91
2695	Inserção	-	A	1844	1,03	16,63
2881	Deleção	G	-	2287	1,01	17,78
3048	Deleção	G	-	2066	1,26	16,12
3067	SNV	G	T	1792	2,9	21,58
3067	Deleção	G	-	1792	2,57	19
3409	SNV	C	T	2168	2,68	29,24
3891	SNV	A	C	4261	2,28	28,51
4015	SNV	T	G	1737	1,09	26,05
4258	SNV	T	C	1794	23,75	27,86
4258	Inserção	-	A	1836	1,42	17,19
4292	Deleção	T	-	1864	1,88	18,06
4316	SNV	C	T	1922	36,06	27,81
4316	Inserção	-	T	1998	1,55	20,61
4375	SNV	A	C	1821	19,88	29,3
4375	SNV	A	G	1821	1,43	28,85
4466	SNV	G	A	1639	24,1	25,56
4780	SNV	A	G	1956	1,84	28,03
4812	Deleção	C	-	2094	1,1	15,74
5570	Inserção	-	A	1864	1,61	20,83
6313	SNV	A	G	1387	3,89	26,52
6445	SNV	C	T	1669	6,11	28,3
6460	SNV	C	A	1493	1,41	30,05
6464	SNV	C	T	1546	35,77	28,62

6470	SNV	T	C	1618	2,29	27,62
6585	SNV	A	G	2012	3,43	29,8
7206	SNV	C	A	2354	45,92	29,76
7207	Deleção	T	-	2431	1,97	25,06
7210	Deleção	G	-	2543	1,38	27,57
7286	Deleção	C	-	2923	4,07	19,66
7741	Inserção	-	G	1263	2,45	22,68
8047	Deleção	G	-	1269	5,36	11,63
8049	Inserção	-	G	1339	1,64	15,73
8361	SNV	A	G	1708	5,09	29,02
8888	Deleção	G	-	1114	1,08	13,08
8962	Deleção	T	-	1405	1,28	17,67
9021	Deleção	C	-	1222	1,23	23,2
9395	SNV	T	C	1296	4,78	27,34
9852	SNV	A	G	1436	11,42	28,45
10070	Inserção	-	A	1298	1,31	18,94
10081	Deleção	G	-	1282	1,72	20,86
10306	SNV	T	G	1471	1,77	28,65
10307	SNV	T	G	1455	35,19	29,86
10308	Deleção	G	-	1479	49,9	28,4
10310	SNV	G	A	1452	10,19	28,68
10312	SNV	A	G	1445	10,38	30,39
10404	SNV	C	A	1146	5,58	30,62
10421	Deleção	T	-	829	5,67	27,32

Anexo 7- Tabelas de variantes obtidas pelo método probabilístico e de qualidade da passagem 4 em HepG2

Variantes obtidas pelo método probabilístico

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
4635	SNV	A	G	553	41,59	29,79
9543	SNV	T	C	99	55,56	28,22
10065	SNV	G	A	119	53,78	29,64

Variantes obtidas pelo método de qualidade

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
4635	SNV	A	G	528	41,1	29,09
4651	Inserção	-	A	531	1,13	22,5
5208	SNV	T	C	463	1,08	25,8
7446	Deleção	C	-	390	1,03	16,5
7499	Inserção	-	A	969	1,24	23
7633	Deleção	G	-	130	2,31	18,33
7868	SNV	T	C	115	1,74	29,5
7950	SNV	A	G	130	1,54	27
8285	SNV	T	C	108	2,78	29,33
8335	Inserção	-	A	100	12	22,08
8771	SNV	A	G	63	3,17	29,5
8780	SNV	A	G	57	3,51	33,5
9088	SNV	G	A	100	2	26,5
9470	SNV	T	C	101	1,98	32,5
9543	SNV	T	C	94	54,26	31,12
9625	SNV	A	G	126	1,59	22,5
9633	Deleção	T	-	122	1,64	25,5
9983	SNV	C	T	119	1,68	30,5
10059	SNV	T	C	112	1,79	32
10065	Deleção	G	-	118	2,54	28,67
10065	SNV	G	A	118	54,24	30,7
10475	SNV	T	A	147	1,36	35,5

Anexo 8– Tabela de variantes obtidas pelo método probabilístico da passagem 6 em HepG2

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade Média
297	SNV	T	C	73	56,16	30,66
967	SNV	T	C	75	96	28,89
1932	SNV	A	G	98	59,18	31,59
4635	SNV	A	G	247	41,3	31,48
7041	SNV	T	C	1131	14,94	25,53
7297	SNV	T	C	1192	18,71	29,98
7890	SNV	G	A	937	18,46	22,64
8293	SNV	C	T	852	20,89	31,17
9543	SNV	T	C	920	79,46	30,16
10065	SNV	G	A	988	73,48	30,83
10065	Deleção	G	-	988	5,97	28,71
10347	SNV	T	C	1017	19,37	30,25
10347	Deleção	T	-	1017	0,2	26,25
10347	Substituição	TA	C	1017	4,92	28,48

Anexo 9- Tabela de variantes obtidas pelo método de qualidade da passagem 6 em HepG2

Posição	Tipo	Referência	Alelo	Cobertura	Frequência	Qualidade média
123	SNV	C	A	86	2,33	32
187	Deleção	G	-	56	3,57	13
297	SNV	T	C	72	56,94	31,93
577	SNV	A	G	74	2,7	22,5
761	SNV	T	C	68	2,94	20,5
967	SNV	T	C	73	97,26	30,3
1534	SNV	A	G	52	5,77	22,67
1787	SNV	A	G	78	2,56	36
1869	SNV	A	G	80	3,75	27,67
1876	Deleção	C	-	94	2,13	18,5
1932	SNV	A	G	95	58,95	30,54
1983	SNV	A	G	90	2,22	35,5
2280	SNV	A	G	90	5,56	34,6
2438	SNV	C	T	74	2,7	32
2566	Deleção	G	-	115	1,74	18,5
2650	SNV	A	G	90	2,22	26,5
2694	SNV	G	A	90	3,33	33
2850	SNV	G	A	77	6,49	30,2
2878	SNV	T	C	78	2,56	25
3118	SNV	G	A	78	6,41	28,6
3653	SNV	T	C	640	1,56	30,6
3750	SNV	G	A	385	1,56	26,5
3759	SNV	G	A	368	1,09	29,5
4003	Deleção	C	-	382	2,62	19,9
4229	Deleção	C	-	232	1,72	12
4247	SNV	G	A	257	5,84	29,2
4275	SNV	A	G	236	1,27	29,67
4360	SNV	G	C	255	3,53	29,78
4635	SNV	A	G	241	42,32	29,28
4825	SNV	A	G	219	2,28	33
4902	SNV	A	T	244	2,87	32,14
4937	Deleção	G	-	237	1,27	15,33
4967	SNV	A	G	229	1,31	28,67
5023	SNV	A	G	237	1,27	31,67
5488	SNV	A	G	236	3,81	25,33
5495	SNV	A	G	264	1,14	35
5595	SNV	T	C	196	1,02	26

5975	SNV	A	G	233	1,72	27,5
6078	SNV	A	G	268	4,85	28,92
6155	SNV	T	C	186	1,08	30,5
6216	Deleção	T	-	197	1,02	20,5
6333	Deleção	T	-	273	1,1	28
6333	SNV	T	C	273	8,06	33,95
6535	SNV	T	C	296	2,03	27,33
6642	SNV	A	G	255	1,18	33
6670	Deleção	G	-	261	1,15	18,67
6682	SNV	A	G	249	2,41	23,17
7041	SNV	T	C	1085	13,09	26,26
7297	SNV	T	C	1177	18,61	31,37
7316	SNV	T	C	1181	1,86	28,05
7387	SNV	T	C	1148	1,05	28,75
7890	Deleção	G	-	881	2,5	20,59
7890	SNV	G	A	881	15,1	25,27
8047	Deleção	G	-	1011	1,78	13
8293	Deleção	C	-	834	1,2	21,4
8293	SNV	C	T	834	21,1	32,86
8845	SNV	A	G	277	1,08	26
8846	Deleção	G	-	346	2,02	22,29
9514	Inserção	-	A	951	1,05	24,2
9543	SNV	T	C	906	79,36	31,95
9650	SNV	T	C	1028	1,36	28,64
9826	SNV	T	C	993	1,11	30,64
9854	SNV	C	T	1042	3,84	32,25
10031	SNV	T	C	1034	1,45	28,87
10065	Deleção	G	-	981	6,01	23,8
10065	SNV	G	A	981	73,7	32,21
10067	Deleção	C	-	973	2,98	26,14
10069	Deleção	G	-	968	1,86	26,94
10081	Deleção	G	-	927	1,73	22,62
10347	Inserção	-	C	1000	1,2	25,58
10347	Deleção	T	-	993	5,24	23,54
10347	SNV	T	C	993	19,23	29,4
10348	SNV	A	C	837	5,85	24,41
10404	SNV	C	A	1048	10,88	31,41
10410	SNV	G	T	1019	6,67	32,44