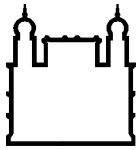


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Parasitária

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO VÍRUS
DENGUE CIRCULANTE NO BRASIL.**

ANA CECILIA RIBEIRO CRUZ

Rio de Janeiro
2005



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ana Cecília Ribeiro Cruz

Caracterização molecular e biológica do vírus dengue circulante no Brasil.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em ciências na área de virologia.

Orientadores: Dr. Ricardo Galler
Dr. Vivaldo Moura Neto/UFRJ

Rio de Janeiro
2005

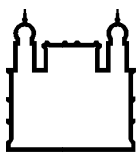
C955 Cruz, Ana Cecilia Ribeiro.

Caracterização Molecular e Biológica do vírus dengue circulante no Brasil/ Ana Cecilia Ribeiro Cruz. - Rio de Janeiro, 2005. xv,243p.: il.

Dissertação (Doutorado) Biologia Parasitária - Instituto Oswaldo Cruz.

1.Dengue. 2.Flavivirus. 3.Biologia molecular. I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Título.

CDD 614.58852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Ana Cecília Ribeiro Cruz

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DO VÍRUS DENGUE
CIRCULANTE NO BRASIL**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Ricardo Galler
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto

Aprovada em: 27/07/2005

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Nome Dra. Elena Cristina Caride Siqueira Campos- **Presidente**
Prof. Dra. Nome: Christina Maeda Takiya
Prof. Dra. Nome: Jussara Pereira Nascimento

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2005

Trabalho realizado na Fundação Oswaldo Cruz, no Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico (DEDET) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (BioManguinhos), Laboratório de Morfogênese do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Seção de Arbovirus do Instituto Evandro Chagas sob a orientação do Dr. Ricardo Galler e co-orientação do Dr. Vivaldo Moura Neto com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar
no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou
que você nunca vai ser alguém....
....Quem acredita sempre alcança.
Renato Russo (*In memoriam*).
(Cantor e compositor)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
ao meu pai (*in memoriam*) e minha
mãe, pela oportunidade de vida e pela
minha formação moral e profissional;
Ao meu irmão e minhas irmãs pelo
apoio e amizade que sempre me
deram.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sentir sua presença em todos os momentos.

Ao Dr. Ricardo Galler, pela orientação indispensável, por ser um grande exemplo de seriedade, qualidade e competência científica.

Ao Dr. Vivaldo Moura Neto, pela orientação e colaboração nos experimentos com culturas primárias de neurônios e sugestões oportunas em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho, com qualidade e competência científica.

A minha revisora científica Dra. Elena Caride que deu uma grande contribuição com seus conhecimentos na preparação final desse trabalho;

Ao Diretor do Instituto Evandro Chagas Dr. Edvaldo Loureiro e toda sua equipe, pelo apoio e compreensão, durante minhas ausências na instituição, que possibilitou a finalização desse trabalho.

Ao Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, chefe da seção de Arbovirus do IEC, que sem sua compreensão seria impossível à conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Marcos da Silva Freire e toda sua equipe pelo apoio durante o curso de doutorado. Em especial aos colegas Alfredo Jabor que me auxiliou na implantação do sequenciamento desse estudo, e Dra. Márcia Arché, que com seus conhecimentos me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho nas infecções experimentais *in vitro*.

A Claudia Elaine, secretária da vice-diretoria de desenvolvimento tecnológico de biomanguinhos/Fiocruz, que com sua paciência, carinho e amizade deu apoio administrativo no andamento de preparação da dissertação.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular de flavivirus do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM)/IOC/FIOCRUZ, em especial a Daniele, Adriana, Ingrid e Jaqueline, pelo apoio e amizade no decorrer do curso de doutorado.

A todas as pessoas do DBBM que me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

As Dras. Ana Carolina e Rosa do Departamento de Genética/IOC/Fiocruz, que me deram apoio na execução final desta tese.

Aos colegas Angélica, Bruno, Gisele, Sheila, Luciana, Tércia, Suzana e Rosângela, do laboratório de Morfogênese Celular do Departamento de Anatomia da UFRJ, que sempre contribuíram com seus conhecimentos e compreensão durante a execução deste trabalho.

Agradeço em especial, os colegas Nathan, Jane e Rosenildes, do laboratório de Morfogênese Celular do Departamento de Anatomia da UFRJ, que com paciência contribuíram com seus conhecimentos, dando-me a oportunidade de aprender e desenvolver grande parte dos trabalhos experimentais de neurovirulência, e pela inestimável colaboração e por momentos de prazeroso convívio.

Aos colegas da seção de Arbovirus do Instituto Evandro Chagas, Dras. Eliana Pinto, Sueli Guerreiro, Elizabeth Salbé, Nazaré Segura, Raimunda do Socorro, Danielle Medeiros, Jannifer Chiang e Dr. Márcio Nunes que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis do meu doutoramento.

A todos os técnicos da seção de Arbovirus do Instituto Evandro Chagas, em especial ao Sr. Basílio, Luiz Roberto e Iveraldo que nos auxiliaram nos experimentos envolvendo camundongos.

A minha ex-estagiária de iniciação científica, Alcione Pena Ferreira, que muito contribuiu nos experimentos de infecção experimental em animal e cultura primária de astrócito, sua preciosa ajuda foi imprescindível no desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe que tem sido minha fiel companheira no decorrer de minha carreira profissional.

Aos meus irmãos, João Carlos, Sandra, Sílvia, Rosa e Ana Débora pela compreensão, amizade e companheirismo durante os momentos mais difíceis no curso do meu doutoramento.

A minha prima e amiga Roseneide e meu amigo Gutemberg Sobral, que têm sido fieis em sua amizade e com carinho me auxiliam nos meses de ausência de minha casa.

A todos que possibilitaram, direta ou indiretamente, o desenvolvimento e execução desse trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Histórico e Taxonomia.....	1
1.2- Vírus Dengue (VDEN).....	2
1.2.1- Histórico.....	2
1.2.2- Epidemiologia	4
1.2.2.1- Ciclo de Manutenção.....	4
1.2.2.2- Transmissão do VDEN.....	6
1.2.3- Agente Etiológico.....	12
1.2.4- Organização Genômica.....	12
1.2.4.1- Proteínas Estruturais.....	14
1.2.4.2- Proteínas Não Estruturais	16
1.2.5- Diversidade Genética.....	21
1.2.6- Replicação Viral.....	23
1.2.7- Imunopatogenese.....	26
1.2.7.1- Manifestações Clínicas.....	29
1.2.7.2- Organização do sistema nervoso central (SNC).....	31
2- JUSTIFICATIVA	34
3- OBJETIVOS	35
4- MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1- Amostras do estudo.....	36
4.2- Cepas dos vírus controles.....	37
4.2.1- Vírus VDEN2 44/2.....	37
4.2.2- Vírus VFA vacinal 17DD.....	37
4.2.3- Vírus quimérico 17D/D2.....	38

4.2.4- Seqüências do Genbank para análise.....	38
4.3- Manutenção de Cultura de Células.....	39
4.3.1- Cultura de Células da linhagem de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36.....	39
4.3.2- Cultura de células Vero.....	39
4.3.3- Cultura primária de neurônios.....	40
4.3.4- Cultura primária de astrócito.....	41
4.3.5- Cultura de Células de Glioma Humano linhagem U87.....	42
4.4- Isolamento Viral das Amostras do Estudo e Preparação de Estoque.....	42
4.5- Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).....	42
4.6- Infecção das Culturas Celulares (Primárias – Neurônios e Astrócito/Contínuas – U87).....	43
4.7- Titulação Viral.....	44
4.8- Imunofluorescência com Dupla Marcação.....	44
4.9- . Extração de RNA.....	45
4.10- Teste de RT-semi-“nested”-PCR (Transcriptase Reversa-Semi-Nested- Reação em Cadeia da Polimerase).....	46
4.11- Transcrição Reversa (RT)-Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para preparação de cDNA para o Sequenciamento.....	47
4.12- Isolamento do DNA do Gel de Agarose.....	48
4.13- Sequenciamento Nucleotídico.....	49
4.14- Análise de Seqüências.....	50
4.15- Quantificação de Fluorescência	51
4.16- Análise de Tamanho de Núcleos.....	51
4.17- Meios de Cultura e Soluções	52
4.17.1- Meios para cultura de células.....	52
4.17.2- Soluções para Biologia Molecular.....	57
5- RESULTADOS - Parte I	58
5.1- Amostras dos VDEN usados no estudo.....	58
5.2- Sequenciamento Nucleotídico da Região Estrutural dos Vírus VDEN2 e VDEN3.....	59

5.3. Alinhamento das Seqüências Nucleotídicas e Análises de Identidade.....	60
5.4- Análise de Saturação.....	86
5.1- Análise Filogenética.....	87
5.5.1- Análise Filogenética do Vírus VDEN2.....	87
5.5.2- Análise Filogenética do Vírus VDEN3.....	90
6- PARTE II	93
6.1. Fundamentação teórica do caso clínico.....	93
6.1.1. Infecção experimental em camundongo.....	94
6.1.2. Infecção em cultura de primária de astrócito de camundongo recém-nascido.....	97
6.1.3. Infecção em cultura primária de neurônio de embrião de rato para observação de efeito citopático (CPE).....	99
6.1.4. Análise de imunocitoquímica por IFI das culturas primárias de neurônios de ratos infectados com Flavivirus.....	100
6.1.5- Análise do tamanho do núcleo de neurônios infectados com <i>Flavivirus</i>	117
6.1.6- Infecção de cultura de células de glioma humano U87.....	119
6.2. Determinantes genéticos de neurovirulência do vírus VDEN2 Bel61082.....	129
DISCUSSÃO	131
Parte I	131
Parte II	145
CONCLUSÕES	156
Parte I	156
Parte II	158
PERSPECTIVAS	160
REFERÊNCIAS	161
APÊNDICES	193

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	5
Figura 2. Sorotipos de dengue circulantes no Brasil.....	7
Figura 3. Casos notificados de dengue por semana epidemiológica, segundo região Brasil, 2003-2004	8
Figura 4. Distribuição histórica por ano de casos de VDEN no Brasil, 1980 –2003.....	10
Figura 5. Distribuição dos óbitos ocorridos por FHD/SCD no Brasil, 1980 - 2003.....	11
Figura 6. Organização estrutural dos flavivírus.....	12
Figura 7. Organização genômica dos flavivírus.....	14
Figura 8. Ciclo celular dos flavivírus.....	25
Figura 9. Hipótese dos fatores de risco para FHD.....	27
Figura 10. Gel de agarose 2% com amostras de VDEN.....	59
Figura 11. Alinhamento de 27 sequencias de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E dos vírus.VDEN2.....	62
Figura 12. Alinhamento de 3 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E.dos vírus VDEN3.....	74
Figura 13. Análise de saturação nos genes prM/M/E/NS1 de VDEN2	86
Figura 14. Análise de saturação no gene prM/E de VDEN3	86
Figura 15. Analise filogenética dos genes C/prM/M/E dos vírus VDEN2.....	88
Figura 16. Analise filogenética dos genes C/prM/M/E dos vírus VDEN2.....	89
Figura 17. Analise filogenética dos genes E/NS1 dos vírus VDEN3.....	91
Figura 18. Analise filogenética dos genes E/NS1 dos vírus VDEN3.....	92
Figura 19. Análise por RT-semi-nested-PCR das suspensões de cérebro inoculados com VDEN2.....	96
Figura 20. Fotomicrografia de cultura primária de astrócitos de rato infectado com vírus Bel61082 e não infectado.....	98
Figura 21. Fotomicrografia de cultura primária de neurônios de rato infectado com vírus VDEN2 e não infectado.....	99
Figura 22. Fotomicrografias de cultura primária de neurônios de rato infectado não infectado.....	101
Figura 23. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus 44/2, 72 H p.i.....	102
Figura 24. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus 44/2, 96 H p.i.....	103
Figura 25. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus Bel61082, 72 H p.i.....	104
Figura 26. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus Bel61082, 96 H p.i.....	105
Figura 27. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus NGC, 72 H p.i.....	106
Figura 28. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus NGC, 96 H p.i.....	107
Figura 29. Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus VFA 17DD, 72 H p.i.....	108

Figura 30.	Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus VFA 17DD, 96 H p.i.....	109
Figura 31.	Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus quimérico 17D/D2, 72 H p.i.....	110
Figura 32.	Fotomicrografias de cultura primária de neurônio de rato infectado com vírus quimérico 17D/D2, 96 H p.i.....	111
Figura 33.	Análise comparativa da infecção de neurônio de rato com flavivirus.....	114
Figura 34.	Análise quantitativa das infecções de Flavivirus em neurônios de ratos.....	115
Figura 35.	Curva de crescimento dos Flavivirus em sobrenadantes de cultura primária de neurônios de rato, dias pós-infecção.....	116
Figura 36.	Gráficos de análise dos tamanhos dos núcleos pós-infecção em neurônio primário de ratos infectados com Flavivirus e Mock, 72 e 96 horas. Análise dos dados após normalização.....	118
Figura 37.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 não infectado	120
Figura 38.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus 44/2, 72 H p.i.....	121
Figura 39.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus Bel61082, 72 H p.i.....	122
Figura 40.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus Bel61082, 96 H p.i.....	123
Figura 41.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus NGC, 96 H p.i.....	124
Figura 42.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus VFA 17DD, 72 H p.i.....	125
Figura 43.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus VFA 17DD, 96 H p.i.....	126
Figura 44.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus quimérico 17D-D2, 72 H p.i.....	127
Figura 45.	Fotomicrografias de células de glioma humano U87 infectado com vírus quimérico 17D-D2, 96 H p.i.....	128
Figura 46.	Alinhamento do vírus Bel61082 com vírus os VDEN2 44-2 e NGC.....	130
Figura 47.	Comparação dos genótipos VDEN2 circulantes nas Américas....	133

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos genótipos dos vírus VDEN.....	22
Tabela 2. Resumo das teorias proposta de patogênese de VDEN.....	28
Tabela 3. Divisão do grau de severidade das apresentações clínicas de dengue (Segundo a OMS).....	30
Tabela 4. Amostras de VDEN2 dos casos clínicos estudados	36
Tabela 5. Amostras de VDEN3 dos casos clínicos estudados.....	37
Tabela 6. Seqüências retiradas do Genbank (genbank/ncbi/nlm/nih/gov)	38
Tabela 7. Oligonucleotídeos usados no RT-Semi-“Nested”-PCR	47
Tabela 8. Oligonucleotídeos usados na preparação dos fragmentos de DNA para seqüenciamento para VDEN2	48
Tabela 9. Oligonucleotídeos usados na preparação dos fragmentos de DNA para seqüenciamento para VDEN3.....	48
Tabela 10. Oligonucleotídeos usados no seqüenciamento de nucleotídeos para VDEN2	50
Tabela 11. Oligonucleotídeos usados no seqüenciamento de nucleotídeos para VDEN3	50
Tabela 12. Resultados da IFI e RT-PCR para caracterização dos sorotipos das amostras virais isoladas no estudo.....	52
Tabela 13. Análise de Identidade e divergência das sequencias parciais da prM/E de VDEN2.....	69
Tabela 14. Diferenças de aminoácidos entre as seqüências prM/E VDEN2 brasileiros comparadas com a cepa Jam83.....	70
Tabela 15. Freqüências dos pares de nucleotídeos do vírus VDEN2.....	71
Tabela 16. Análise de identidade e Divergência nucleotídica das seqüências parciais prM/E de VDEN3.....	83
Tabela 17. Diferenças de aminoácidos entre as seqüências prM/E VDEN3 brasileiros comparadas com a cepa protótipo Asiático SriLanka.....	84
Tabela 18. Freqüências dos pares de nucleotídeos do vírus VDEN3.....	85
Tabela 19. Análise de amostras de cérebro de camundongo inoculados com variantes do VDEN2.....	95
Tabela 20. Análise da quantidade absoluta e percentual da infecção de cada Vírus em cultura de células primárias de neurônio de rato.....	113
Tabela 21. Titulação do sobrenadante de cultura primária de neurônio de ratos infectados com Flavivirus coletados de 24 em 24 H.	116
Tabela 22. Principais características encontradas nas células neuronais primárias de rato e gliais humanas infectadas com Flavivirus.....	152
Tabela 23. Distribuição da variação de aminoácido no gene da proteína M do vírus VDEN2.....	154

ABREVIATURAS E SIGLAS

%	percentagem
A	1. adenina
AA	aminoácido
ADE	Intensificação da infecção dependente de anticorpo (Antibody-Dependent Enhancement)
ATCC	Coleção Americana de Culturas e Depósitos (American Type Culture Collection)
BioManguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BrdU	5' –Bromo-2'-deoxiuridina
BrdUTP	5' –Bromo-2'-deoxiuridina tri fosfato
BSA	albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
C	1. citosina 2. capsídeo ou proteína do capsídeo
°C	grau Celsius
C6/36	clone de células de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
CCL	Linhagem Celular Certificada (Certified Cell Line)
DNAc	Ácido desoxiribonucleico complementar
cap	resíduo G metilado (7-metil G) na extremidade 5' do mRNA
cm	centímetro
CMC	carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPE	efeito citopático (Cytopathic effect)
DAPI	4,6 –diamino-2-phenyllyndole, dilactate
DBBM	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNTP	Deoxinucleotídeo
DTT	1,4-ditiotreitol
E	envelope ou proteína do envelope viral
ECP	Efeito Citopático
EDTA	etileno-diamino tetra acetato de sódio
EGF	Epidermal Growth Factor
VFA	Vírus da febre amarela ou febre amarela
FD	febre por dengue ou dengue clássico
FHD	febre hemorrágica por dengue ou dengue hemorrágico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Conjugado de Isotiocinado de flouresceína
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde (Ministério da Saúde)
G	Guanina
g	1. grama 2. força centrífuga relativa, calculada através do raio de centrifugação e da velocidade de rotação. É expressa como um múltiplo da aceleração da gravidade (9,8 m/s ²)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
H	Hora
HCl	ácido clorídrico
pi	pós-infecção
i.c.	via de inoculação intracerebral
IEC	Instituto Evandro Chagas

IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	imunoglobulina
IH	Inibição da hemaglutinação
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
JEV	Vírus da encefalite japonesa (Japanese Encephalitis virus)
KUNV	Vírus Kunjin
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LCR	Líquido céfalo raquidiano
Log ou log ₁₀	logaritmo de base 10
LIV	Louping ill virus
M	1. concentração molar ou molaridade 2. proteína de membrana
m	1. mili (x10 ⁻³) 2. metro
mg	miligrama
min	minuto
MEM	Meio Eagle Mínimo Essencial
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
Mock	Células não infectadas
moi	multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
MVE	Murray Valley encephalitis
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOAc	acetato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NGC	VDEN-2 Nova guinea C
NS	proteína não estrutural (non-structural protein)
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
nt	nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization)
ORF	Cadeia aberta para leitura (Open Reading Frame)
PAHO	Pan American Health Organization
pb	par de bases
PBS	solução salina fosfato tamponada (Phosphate Buffered Saline solution)
PCR	reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)
pfu	unidade formadora de placa (plaque forming unit)
pH	potencial de hidrogênio
p.i.	pós-infecção
PM	peso molecular

Poli-A	estrutura poliadenilada da extremidade 3' do mRNA
prM	precursor da proteína de membrana
PRNT	teste de neutralização da redução da formação de placas de lise (Plaque Reduction Neutralization Test)
p.t.	pós-transfecção
q.s.p.	quantidade suficiente para preencher
RE	retículo endoplasmático
RER	retículo endoplasmático rugoso
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RNase	ribonuclease
RPdR	RNA polimerase dependente de RNA
rpm	rotação por minuto
RT	1. transcriptase reversa ou ARN polimerase dependente de ADN; 2. reação de transcrição reversa
SAM	S-Adenosil-Metionina
SCD	Síndrome de Choque por Dengue
SBF	soro bovino fetal
SEARB	Seção de arbovirus
SLEV	Saint Louis encephalitis vírus (vírus da encefalite São Luiz)
SNC	Sistema Nervoso Central
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	timina
TA	Temperatura Ambiente
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TBEV	vírus da Encefalite Tick-Borne (Tick-Borne Encephalite virus)
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Uracila; Unidade Internacional
UI	Unidade Internacional
UTR	região não traduzida (untranslation region)
v	1. volume
VDEN-1	vírus dengue 1
VDEN-2	vírus dengue 2
VDEN-3	vírus dengue 3
VDEN-4	vírus dengue 4
VILH	Virus Ilhéus
WHO	World Health Organization
WNV	West Nile virus
VDEN2-WNV	Virus dengue2-West Nile virus
μ	Micro (x10 ⁻⁶)
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMO

A febre do dengue está amplamente distribuída por todas as áreas tropicais do mundo. Em certas áreas endêmicas, as formas graves da doença, febre hemorrágica do dengue (FHD) e síndrome de choque do dengue (SCD), ocorrem com frequência. Outras manifestações clínicas, como, por exemplo, encefalopatias, encefalites, mielite transversa, também tem sido observadas. O nosso objetivo foi a caracterização genética e biológica de amostras de vírus VDEN2 e 3, com ênfase no caráter de neurovirulência do vírus VDEN2. As amostras de VDEN 2 e 3 utilizadas foram isoladas na Serviço de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas a partir de soro de pacientes com quadro clínico de dengue (FD e FHD) e manifestações neurológicas. Os vírus padrão foram o VDEN2 Nova Guiné C e 44-2, VDEN3 H87. As 11 seqüências do vírus VDEN2 quando comparados entre si e com 16 outras seqüências do VDEN2 apresentaram percentual médio de identidade nucleotídica e aminoácido de 89,5 e 99,8% respectivamente. Os estudos filogenéticos realizados mostram os isolados brasileiros pertencem ao genótipo III de origem Asiática. As 10 seqüências do vírus VDEN3 quando comparados entre si e com 16 outras seqüências do VDEN3 apresentaram percentual médio identidade nucleotídica e aminoácido de 89,6 e 100% respectivamente. Os estudos filogenéticos realizados mostram que estão agrupados ao genótipo III também de origem Asiática. O vírus VDEN2 isolado a partir de caso mielite transversa (Bel61082) foi caracterizado pelo sequenciamento nucleotídico da região estrutural assim como em testes de neurovirulência em camundongos recém-nascidos. A susceptibilidade de culturas primárias de neurônios e astrócitos, células de glioma humano, também foi estudada para fins de caracterização do caráter neurovirulento do vírus. O estudo de neurovirulência em infecção de camundongo mostrou sinais aparentes de doença apenas após a inoculação da cepa NGC, mas a replicação do vírus Bel 61082 pode ser detectada por RT-PCR em suspensão de cérebro de camundongo. Obtivemos evidências experimentais de apoptose nas células neuronais infectadas com VDEN2 NGC e Bel61082. No sequenciamento nucleotídico, a principal alteração observada está localizada na proteína M28, região esta conhecida como pró-apoptótica.

ABSTRACT

Dengue fever is present throughout the tropical areas with the occurrence of mild disease forms as well as the more severe dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Other clinical manifestations such as encephalopathies, have also been observed. Here we have genetically characterized dengue types 2 and 3 viruses circulating in the country. Samples were made available by the Serviço de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas and were primarily isolated from patient sera with different clinical manifestations. The 11 dengue type 2 sequences when compared among them and 16 other sequences available in the GenBank have shown an identity at the nucleotide and amino acid sequence level of 89.5 e 99.8% respectively. The brazilian isolates were shown to belong to the genotype III of asian origin but more recent than the ancient New Guinea C virus. The 10 dengue type 3 sequences were compared with 16 other sequences available in the GenBank and showed an identity of 89.6 e 100% for nucleotide and amino acid sequences, respectively. These viruses belong to genotype III also of asiatic origin (SriLanka). The dengue 2 virus isolated from a case of transverse myelitis (Bel61082) was characterized by the nucleotide sequencing of the whole structural region as well as for its neurovirulence for suckling mice. The susceptibility of primary neuron cultures and astrocyte and glial cell lines was also studied. Mice neurovirulence was only apparent with the neuroadapted New Guinea C strain but replication of the Bel61082 isolate could be detected by RT-PCR in mouse brain suspensions. Experimental evidence for apoptosis was obtained after infection of the cell cultures above with dengue type 2 viruses NGC and Bel61082. The nucleotide sequencing revealed a significant change in the M protein amino acid 28, a region known to be pro-apoptotic

1- INTRODUÇÃO

1.1 - HISTÓRICO E TAXONOMIA DA FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE*

A família *Flaviviridae* (da qual o *vírus Dengue* faz parte) está classificada ecologicamente como Arbovírus, que incluem também outras famílias (*Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*). Conceitualmente, os Arbovírus são vírus mantidos na natureza mediante transmissão entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e artrópodes hematófagos, de hospedeiro artrópode à hospedeiro artrópode através da via transovariana e, possivelmente da via venérea (OMS, 1985). A transmissão vertical entre artrópodes é importante por ser um dos meios de manutenção de alguns arbovírus na natureza (Rehle, 1989).

Os arbovírus estão espalhados no mundo inteiro, muitos dos quais causam importantes epidemias e doenças enzoóticas (Varma e Webb, 1985). Dos 534 arbovírus registrados no Catálogo Internacional dos Arbovírus, cerca de 139 podem infectar humanos. A maioria dos arbovírus provoca uma síndrome febril com ou sem exantema, enquanto parte causa quadros clínicos hemorrágicos ou de encefalite.

A família *Flaviviridae* está dividida em três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, além disso, possui um número de vírus que estão ainda não agrupados segundo o Comitê de taxonomia dos Vírus. O gênero *Flavivirus* é constituído de 12 complexos antigênicos (Calisher e Gould, 2003).

Os *Flavivirus* têm sido reconhecidos entre os mais proeminentes dos vírus transmitidos por picada de mosquito desde o século passado, quando o vírus da febre amarela (VFA) e vírus dengue (VDEN) foram os primeiros encontrados em humanos como agente etiológico (Schlesinger, 1980). Em 1927 foi feito o primeiro isolamento do VFA e mais adiante, agentes associados com encefalites foram isolados em surtos e dentre estes se incluem os vírus da *encefalite japonesa* (JEV), *St. Louis* (SLEV), *encefalite transmitida por carrapato* (TBEV) e *louping ill* (LIV) (Schlesinger, 1980 e Calisher e Gould, 2003).

A classificação antigênica iniciou após 1950 quando foi identificada uma grande diversidade arbovirus, muitos deles agora reconhecidos como sendo *Flavivirus*, o que abriu um vasto campo para investigações em vários países tropicais e sub-tropicais (Theiler and Downs, 1973). Com o número de isolamentos de arbovirus aumentando, tornou-se importante classificar esses isolados, já que alguns ensaios sorológicos revelaram graus variados de reatividade cruzada entre os isolados e os critérios físico-químicos foram pouco usados para distingui-los.

Os agrupamentos antigênicos foram facilitados com aplicação do teste de inibição da hemaglutinação (IH), Casals, 1957 que distinguiu os dois maiores grupos antigênicos, grupo A (agora conhecidos como os alfavírus) e grupo B (os flavivirus). Estudos posteriores usando adsorção de anticorpo sugeriram que todos os determinantes antigênicos estariam localizados na proteína de envelope (Westaway *et al.*, 1975) e permitiram agrupar os vírus JEV, SLEV e West Nile (WNV) em um complexo, mas algumas reações cruzadas ocorreram com vírus VDEN e VFA. Conclusões similares foram registradas por Trent (1977) com uma análise antigênica radioimunológica de proteínas de envelope purificadas de vários *flavivirus*.

Com o avanço de técnicas bioquímicas e microscopia eletrônica, foi possível uma classificação mais racional, que, de acordo com sua morfologia, modo de replicação viral e relações antigênicas, sendo então alocados em diferentes famílias, gêneros e grupos antigênicos (Rehle, 1989).

1.2 - VIRUS DENGUE (VDEN)

1.2.1 - Histórico

Desde o século XIX, o mundo enfrenta o ressurgimento de muitas doenças infecciosas, sendo o dengue uma das mais importantes no que diz respeito à morbidade e mortalidade. A doença foi descrita entre 1779 – 1780, com o primeiro registro de uma grande epidemia possivelmente ocasionada pelo VDEN em três continentes (Ásia, África e América do Norte), porém há evidências que uma doença semelhante tenha ocorrido mais cedo. O perfil da doença associado com dengue de 1780 – 1940 foi caracterizado por pequenos surtos e às vezes grandes epidemias (Gubler, 1997). Apesar dos sorotipos do VDEN não terem sido isolados

até os anos 1940, o papel do mosquito *Aedes* (*Ae*) na transmissão do dengue é conhecido há muitos anos pelos resultados de experimentos em voluntários humanos. O primeiro foi em Beirute em 1903, em seguida na Austrália, o qual foi publicado por Bancroft em 1906 afirmando que o *Ae. aegypti* era o principal vetor de transmissão (Rodhain, 1998).

A epidemiologia do VDEN mudou com o rompimento ecológico no Sudeste Asiático durante a segunda guerra mundial, com uma grande distribuição geográfica, aumento da densidade da população de *Ae. aegypti* e elevação da circulação do vírus entre cidades, países, principalmente entre os soldados (Gubler, 1997; Gubler, 1988).

As primeiras epidemias de FHD foram observadas na Filipinas, em 1953, e a seguir na Tailândia em 1958. Posteriormente a FHD foi assinalada em alguns países Asiáticos e em diversas ilhas do Pacífico. No período de 1956 a 1959, os países asiáticos reportaram a OMS mais de 2.500.000 casos de FHD, dos quais cerca de 43.000 faleceram. Aproximadamente, 80% dos casos e cerca de 50% dos óbitos foram notificados pelo Vietnã e Tailândia.

Dos anos 1980 a início de 1990 ocorreu uma expansão dramática epidemias de dengue com FHD na Ásia, que se moveu a oeste para dentro da Índia, Paquistão, Sri Lanka e Ilhas Maldivas; a leste para dentro da China (Gubler, 1997). Atualmente somente os casos graves são registrados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1986).

Nas Américas, antes de 1981, ocorreram excepcionalmente registros de casos de FHD, em Porto Rico, Curaçao e Jamaica. Neste ano, contudo, registrou-se a primeira e mais grave epidemia que afetou Cuba, durante a qual se hospitalizaram 116.143 pacientes, dos quais 20.132 foram casos de FHD/SCD e 158 evoluíram para o óbito. A segunda epidemia grave de FHD ocorreu na Venezuela em 1989-1990, e a partir deste episódio, o país vem notificando epidemias de FHD praticamente em todos os anos. Entre 1989 e 1994 a Venezuela reportou 15.110 casos e 142 óbitos, portanto o país das Américas com maior incidência de FHD. Tanto em Cuba como na Venezuela, dois terços dos casos ocorreram em crianças com menos de 15 anos de idade. No Brasil e na Colômbia, contudo, predominam os pacientes com idade superior a 15 anos. Epidemias de dengue com FHD de intensidade variável causado pelo sorotipo VDEN2 ocorreram na Colômbia, Brasil, Porto Rico e México, mas nenhuma

delas tiveram a mesma magnitude e severidade da epidemia de Cuba em 1981 (Gubler, 1997; Gubler and Meltzer, 2003)

1.2.2 - Epidemiologia

1.2.2.1 - Ciclo de Manutenção VDEN

A maioria dos detalhes da transmissão do dengue pelo *Ae. aegypti* tal como a confirmação do envolvimento de segundo vetor, *Ae. albopictus*, foram elucidados por uma série extensa de experimentos em voluntários humanos nas Filipinas na década de 1920, por pesquisadores das forças armadas americanas (Rodhain, 1996).

O VDEN é transmitido pelos mosquitos do gênero *Aedes*, sub-gênero *Stegomyia*, sendo o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* os vetores principal e secundário, respectivamente, os quais são encontrados em densidade elevada nas áreas endêmicas, mas também as subpopulações de uma mesma espécie oriundos de diferentes regiões geográficas (PAHO, 1994; Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004). O mosquito *Ae. aegypti* tem hábito diurno e tem como criadouro preferencial o ambiente domiciliar. A abundância do vetor coincide com a incidência de dengue endêmico e epidêmico (Figura 01).

Outras espécies do gênero *Aedes* (*Ae.*) também podem agir como vetores de transmissão, onde se pode destacar o *Ae. Polynesiensis* e membros do grupo *Ae. scutellaris* (Gubler JD e Meltzer M, 2003).

A competência do vetor requer que uma determinada espécie do mosquito seja permissível à infecção pelo vírus e replicação do mesmo e finalmente seja capaz de transmitir. Neste último quesito, são importantes os aspectos da antropofilia e frequência de alimentação (Rodhain, 1998). Até o momento, nenhuma correlação tem sido estabelecida entre uma espécie particular de vetor e as características clínicas das doenças.

Assim como outros arbovírus, a dinâmica de replicação do VDEN em mosquitos infectados oralmente, depende da temperatura nas quais os mosquitos são mantidos, a cepa, quantidade de vírus ingerido e possivelmente a espécie e cepa do mosquito. Todavia, o tempo entre a ingestão do VDEN pelo mosquito e sua habilidade de transmitir a infecção (período de incubação extrínseco) é

altamente dependente da temperatura ambiental e da quantidade de vírus ingerido (Rodhain, 1998).

O mais importante ciclo de transmissão do VDEN para a saúde pública é o ciclo endêmico/epidêmico urbano, que ocorre nos grandes centros urbanos p-dos trópicos (Gubler, 1997; Gubler, 1988; Halstead, 1984). Os vírus são mantidos em um ciclo que envolve *Ae. aegypti* – humano – *Ae. aegypti*. Algumas vezes ocorrendo co-circulação de sorotipos em uma mesma cidade, com epidemias periódicas causadas por diferentes vírus (Gubler and Meltzer, 2003).

Os humanos são infectados com VDEN pela picada do mosquito *Ae.* infectado. Após a pessoa ser picada o vírus fica em um período de incubação (intrínseco) de 3 a 14 dias (em média 4 a 7 dias) até o aparecimento dos sintomas. Durante o período febril os mosquitos podem torna-se infectados e subseqüentemente transmitir os vírus a outras pessoas não infectadas após o período de incubação extrínseco (8 a 12 dias) (Gubler, 1988).

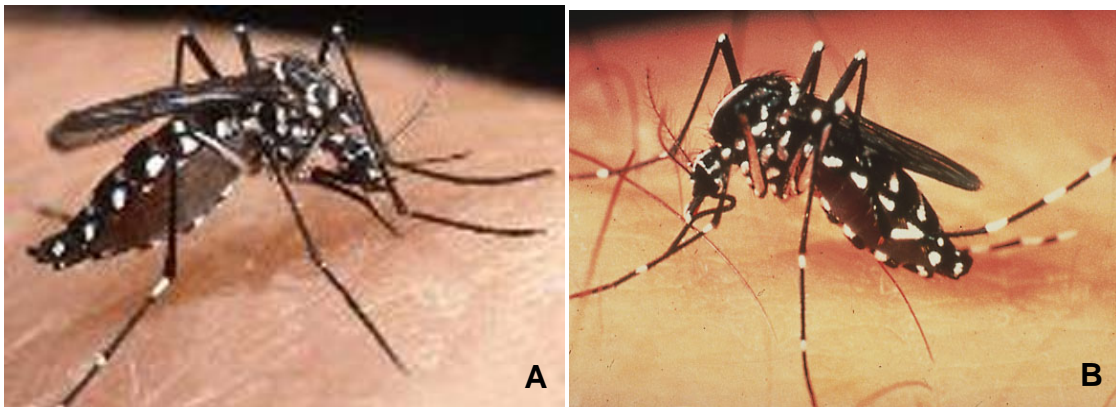


Figura 01 : A- *Aedes aegypti* adulto; B *Aedes albopictus* adulto.
Fonte: www.vnn.vn/suckhoe/; agnews.tamu.edu

A dispersão do *Ae. aegypti* pelo país vem aumentando a cada ano, em função da complexidade dos fatores que determinam o comportamento do vetor de transmissão. Apesar das intensivas medidas de controle adotadas contra o mosquito, o Brasil não conseguiu a redução dos índices vetoriais a ponto de evitar a propagação dos vírus (Barbosa, 2002).

Até que uma vacina esteja disponível, o controle de vetor é o único caminho para diminuir a transmissão de VDEN. O Ministério da Saúde deve dirigir o controle, estabelecer vigilâncias entomológica e epidemiológica, além de

campanhas educacionais para a comunidade. É fundamental que a comunidade reconheça a sua responsabilidade no controle do dengue.

1.2.2.2 - Transmissão do VDEN

A febre do dengue está amplamente distribuída por todas as áreas tropicais do mundo. Em certas áreas endêmicas, a forma grave da doença, febre hemorrágica do dengue e síndrome de choque, ocorre com frequência.

Nas Américas, epidemias de FD e FHD têm ocorrido desde 1981, quando uma epidemia grave, afetou Cuba. Desde então, vários outros países das Américas foram afetados, com a ampla dispersão do vetor *Ae. aegypti* e, hoje é um importante problema de saúde pública nos trópicos e sub-trópicos. O VDEN já foi detectado em mais de 100 países e estima-se que cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivam em área onde dengue é endêmico.

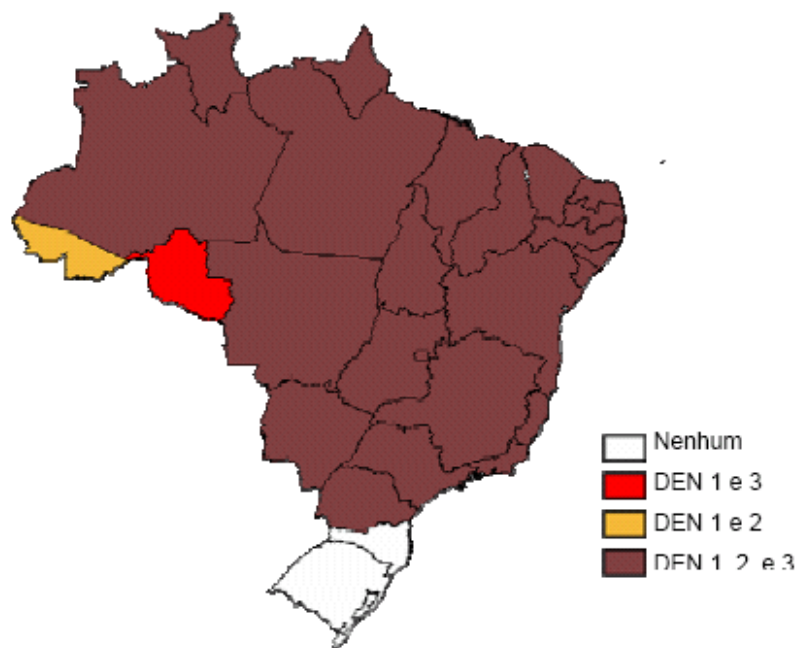
No Brasil, foram registrados os primeiros casos de dengue, documentados clínica e laboratorialmente, em Boa Vista, Roraima, em 1982, em epidemia causada pelos sorotipos VDEN1 e foram responsáveis pela infecção de aproximadamente 11.000 pessoas (Travassos da Rosa *et al.*, 1982; Osanai *et al.*, 1983). Posteriormente, reapareceu em 1986 no Rio de Janeiro - RJ, de onde se disseminou para todo o país, em uma nova epidemia de dengue causada pelo sorotipo VDEN1, onde milhares de casos foram notificados. Durante o período de 1986 a 1990, somente o sorotipo VDEN1 foi responsável pelas epidemias no Brasil, incluindo os estados de Alagoas, Ceará, Pernambuco, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

Em 1989 foi reportado o primeiro isolamento do VDEN2 em Belém, a partir de um paciente oriundo de Luanda, Angola (Travassos da Rosa *et al.*, 1989). No ano seguinte, após a introdução do sorotipo VDEN2, novas epidemias foram registradas no Rio de Janeiro, Ceará e Alagoas. Em 1991, o sorotipo VDEN2 causou uma grande epidemia em Araguaína, Tocantins, tendo sido notificados mais de 2.000 casos da doença (MS, 1994). A partir daí, os sorotipos VDEN1 e 2 circulam em quase todo o território nacional, causando epidemias nas suas mais diversas apresentações clínicas. Um exemplo foi a grande epidemia no ano de 1994 de FD e FHD em Fortaleza e vários municípios cearenses, a maioria

fazendo parte da área metropolitana da capital cearense (Vasconcelos *et al.*, 1995).

Em 2000, ocorreu o primeiro registro do VDEN3 no Brasil no Estado de São Paulo de um caso importado da Nicarágua (Rocco *et al.*, 2001). Em 2001 foram confirmados os primeiros casos autóctones no Estado do Rio de Janeiro, onde ocorreu uma grande epidemia, com elevado número de óbitos por FHD, espalhando-se rapidamente para todo o Brasil (Nogueira *et al.*, 2001).

No Brasil, todas as regiões foram atingidas por surtos de VDEN (Figuras 02 e 03). No panorama atual, há circulação de três sorotipos do dengue (VDEN1, VDEN2 e VDEN3) em 23 estados. A circulação simultânea de mais de um sorotipo viral é um dos principais fatores para o aparecimento das formas hemorrágicas, fato que vem ocorrendo nas últimas epidemias registradas no Brasil (MS/SVS/2004).



* Dados até o mês de junho/04, sujeito a alterações.

Figura 02: Mapa do Brasil com a distribuição dos sorotipos de dengue.

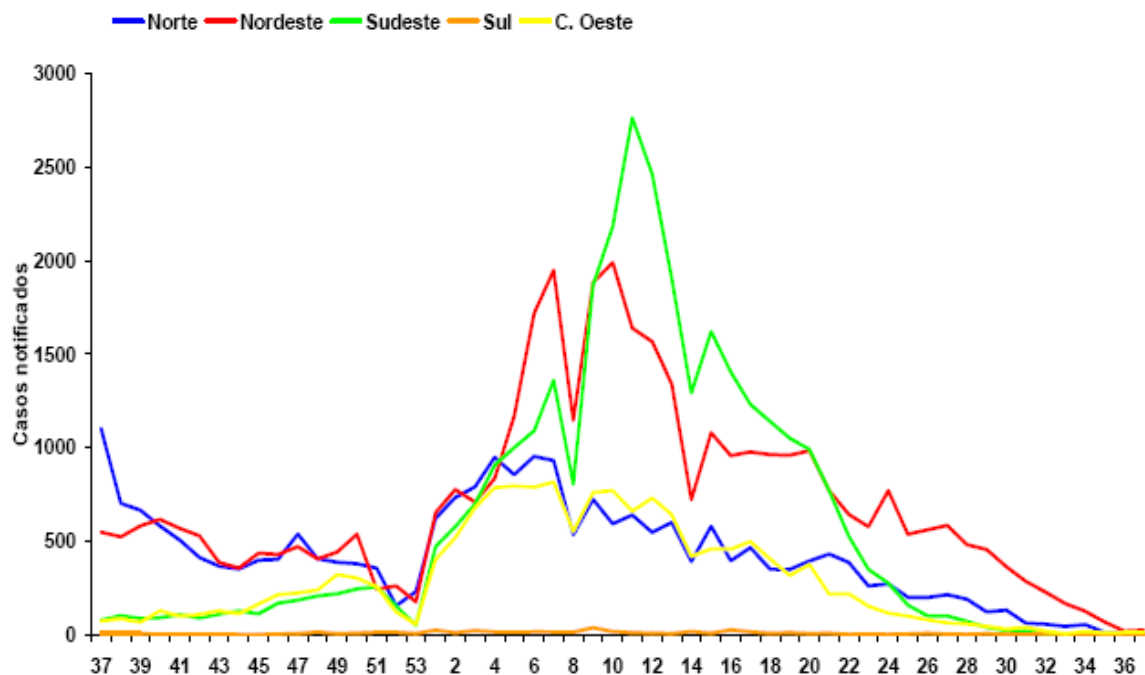


Figura 03: Casos notificados de dengue por semana epidemiológica, segundo região Brasil, 2003-2004*.

FONTE: SVS;Ministério da Saúde

*dados preliminares, até a semana 36

A ocorrência de casos de dengue aumentou consideravelmente durante a década de 90, e até hoje continua sendo a doença viral com maior número de casos notificados no Ministério da Saúde. No primeiro semestre de 2003 foram registrados 344.092 casos em todo o país (Funasa, 2004). Embora esses casos representem uma redução de mais de 60% em relação a 2002, o dengue ainda se constitui em uma ameaça à saúde pública no Brasil, pois nos último cinco anos aproximadamente 70% dos casos notificados nas Américas foram do Brasil (Siqueira *et al.*, 2005) (Figura 04). Considerando que a OMS estima que os casos notificados representem apenas 10% do total de casos, é estimado que em 2003 no Brasil ocorreram mais de 2,5 milhões de infecções por dengue (SVS/MS, 2005).

Em 2002 o número absoluto de casos de óbitos por FHD (150) foi o mais elevado em 20 anos de estudo de epidemias de FD/FHD ocorridas no Brasil (Figura 04 e 05), durante este ano ocorreu uma grande epidemia, com 250.000 casos na área metropolitana do Rio de Janeiro causando um grande problema de saúde pública (Halstead, 2002; Barbosa *et al.*, 2002).

A Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde registrou até a semana epidemiológica de 2004, 84.535 casos. Com a circulação

autóctone dos sorotipos VDEN1, VDEN2 e VDEN3 nas 23 unidades federadas (Figuras 02 e 03). No entanto, a distribuição da faixa etária dos casos de FHD tem mudado progressivamente, e é diferente nas Américas em relação à Ásia. Nos surtos de Cuba e da Venezuela a doença ocorreu em todas as faixas etárias, embora cerca de dois terços dos casos fatais tenham sido em crianças. Observações semelhantes têm sido feitas no Brasil e em Porto Rico (Zagne *et al*, 1994; Vorndam *et al*, 1997; Siqueira *et al.*, 2005). Em 2004, foram confirmados 48 casos de FHD, com um óbito registrado no estado de Minas Gerais. Esses dados indicam uma taxa de letalidade, por FHD, de 2,1% (SVS/Ministério da Saúde, 2005).

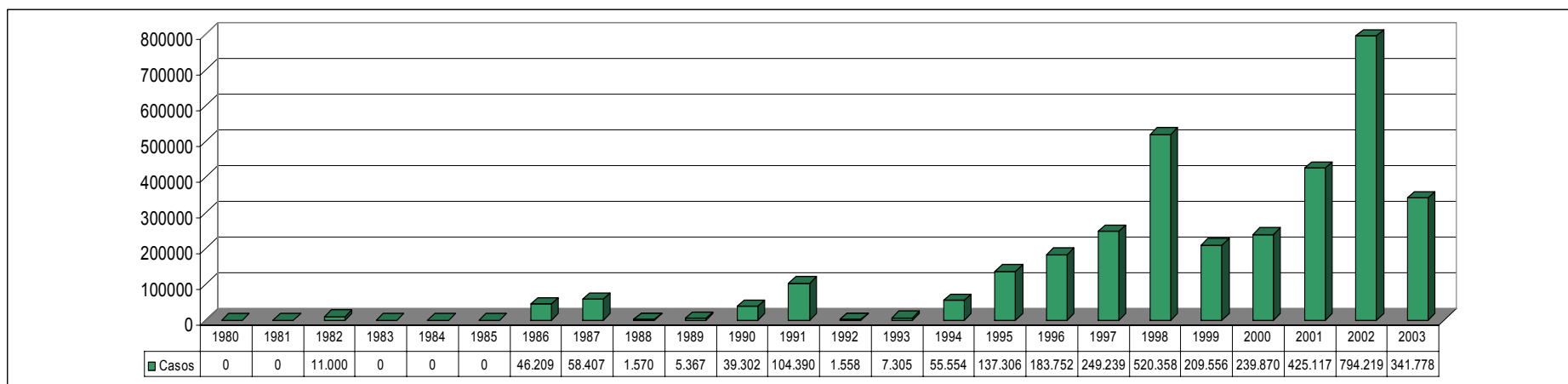


Figura 04: DENGUE –Distribuição histórica por ano de casos de VDEN no Brasil, 1980 -2003
 FONTE: SVS;Ministério da Saúde

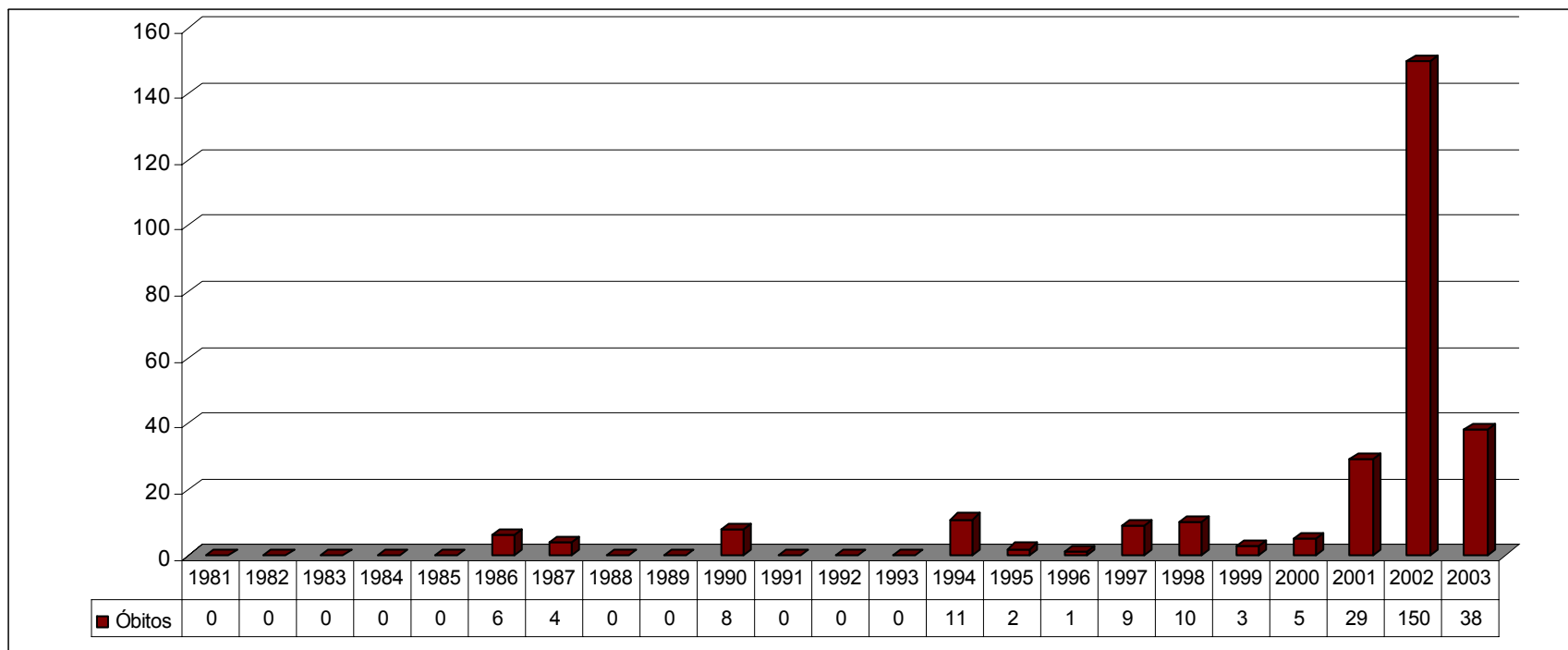


Figura 05: DENGUE – Distribuição dos óbitos ocorridos por FHD/SCD no Brasil, 1980 -2003
FONTE: SVS;Ministério da Saúde

1.2.3 .- Agente Etiológico

Os vírus VDEN morfologicamente são vírus esféricos, medindo cerca de 40 – 50 nm de diâmetro. Contém um envelope de natureza lipoprotéica (Murphy, 1980) e o genoma é composto de RNA de fita simples, polaridade positiva, com 10.158 a 10.173 bases, incluindo duas regiões não traduzidas (100 e 450 pares de bases) que flanqueiam uma região codificadora de 3.386 a 3.391 aminoácidos. A organização viral apresenta-se de duas formas, uma forma intracelular imatura, que é caracterizada pela presença da proteína de membrana prM, e a forma extracelular madura que é caracterizada pela presença da proteína M (Stadler et al., 1997) (Figura 06).

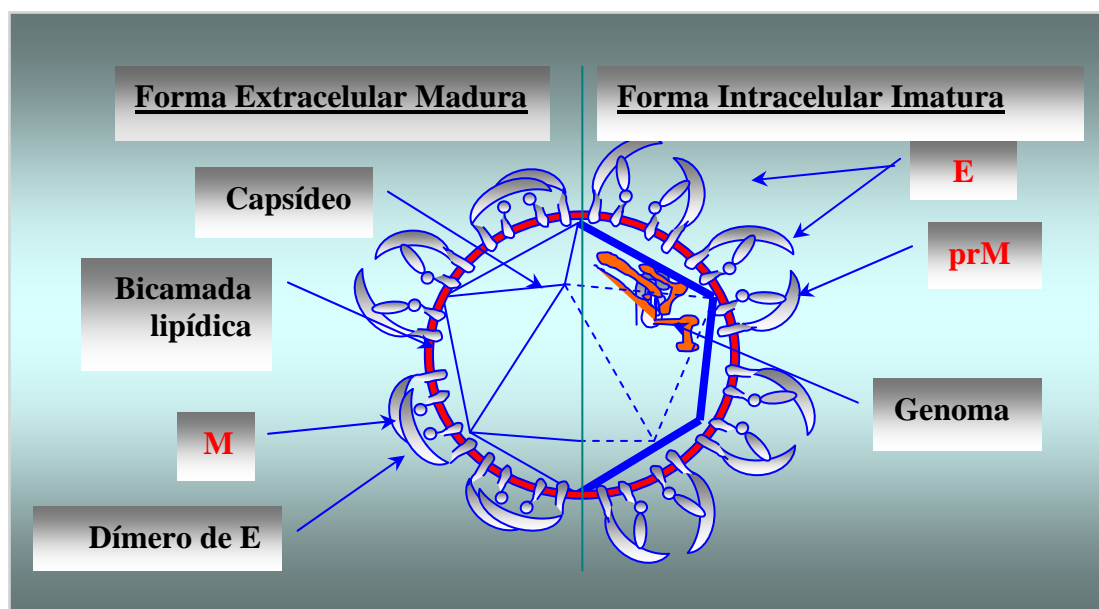


Figura 06. Organização estrutural dos **flavivírus**. O esquema representa a partícula viral em suas formas intracelular imatura e extracelular madura. O capsídeo do vírus tem a simetria icosaédrica com o genoma do vírus associado à face interna do capsídeo. Estão representadas a proteína de envelope (E) e a sua forma dimerica, a proteína de membrana (M) e seu precursor (prM), ainda presente no envelope na forma extracelular. Ao contrário das partículas extracelulares, as partículas intracelulares não são infectivas. Fonte: Chambers et al., 1990a.

1.2.4 – Organização genômica e seus produtos gênicos

A organização genômica do VDEN por ser semelhante ao do vírus da VFA facilita a análise das seqüências de aminoácidos das várias proteínas e sua relação com outros *Flavivirus* (Strauss, 1989). As signalases do hospedeiro no lúmen do retículo endoplasmático (RE) mediam o processamento inicial dos

eventos de clivagem separando as proteínas estruturais precursoras e a região N – terminal das proteínas não estruturais.

Nenhum RNA viral subgenômico tem sido encontrado em células infectadas com vírus (Chambers *et al.*, 1990). O genoma viral de polaridade positiva serve como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução das proteínas virais. Uma única fase de leitura codifica uma grande poliproteína, que é clivada co- e pós-traducionalmente em 10 proteínas (Figura 7). A partir da região N-terminal, um quarto da poliproteína codifica as proteínas estruturais (C-prM-E), seguidas pelas não estruturais, NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (Chambers *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1985). Uma peptidase sinal do hospedeiro é responsável pelas clivagens entre C-prM, prM-E, E-NS1, e próxima da região carboxiterminal da NS4A. Uma serina protease, codificada pelo vírus, é responsável pelas clivagens entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B e NS4B/NS5. A enzima responsável pela clivagem da NS1/NS2A até o momento é desconhecida (Lindenbach and Rice, 2003). As regiões 5' e 3' não codificadoras são importantes para controle da replicação e provavelmente da tradução do RNA viral.

A região não codificadora ou não traduzida (RNT) 5' é uma seqüência não conservada entre os diferentes *flavivirus*, embora possa ser encontrada entre eles uma estrutura secundária comum nessa região (Brinton and Dispoto, 1988; Cahour *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1987). Esta estrutura pode estar envolvida na tradução do genoma ou ainda na complementaridade da cadeia negativa, que serve como sitio de iniciação da cadeia positiva durante a síntese da replicação do RNA (Lindenbach and Rice, 2003).

A região não codificadora ou não traduzida (RNT) 3' do genoma dos *flavivirus* exibe grande variabilidade, embora várias características conservadas e estruturas secundárias tenham sido descritas (Mutebi *et al.*, 2004; Shurtleff *et al.*, 2001; Mandl *et al.*, 1998). No entanto as estruturas secundárias conservadas levam a uma grande similaridade estrutural entre os *flavivirus* (Rauscher S. *et al.*, 1997), e formam uma haste (“stem-loop” – 3' SL) longa (90 a 120 nucleotídeos) que são sustentadas por essa estrutura secundária (Brinton *et al.*, 1986; Grange *et al.*, 1985; Hahn *et al.*, 1987, 1991; Proutski *et al.*, 1997; Rauscher *et al.*, 1997; Rice, 1985; Shi *et al.*, 1996; Sumiyoshi *et al.*, 1987; Takegani *et al.*, 1986; Wengler and Castle, 1986; Zhao *et al.*, 1986; Markoff L., 2003; Whitehead SS, 2003;

Markoff L., 2002; You S, 2001). Estudos de análise mutacional de VDEN2 e desenvolvimento de quimeras de VDEN2-WNV revelaram um papel essencial desta estrutura para replicação viral. O papel preciso da região RNT 3' é desconhecida, sugere-se que ela interaja com diversas proteínas de relevância funcional. As proteínas de replicase viral NS3 e NS5 têm sido mostradas ligadas a esta estrutura *in vitro* (Chen *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 1998).

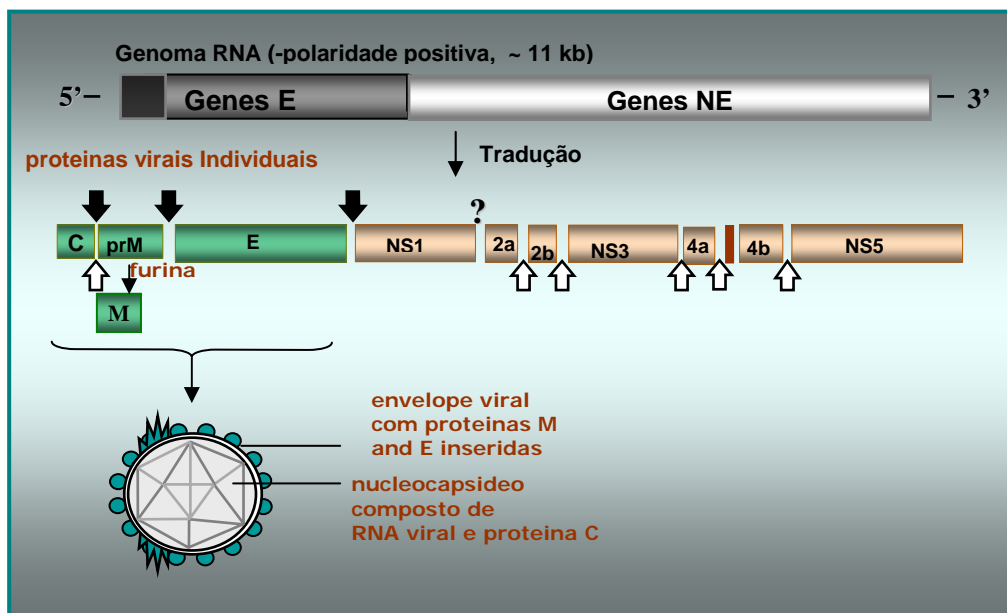


Figura 07. Organização genômica dos flavivírus. No topo está o genoma típico dos flavivírus, com as extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTR) e as regiões traduzidas em proteínas estruturais e não estruturais. Em seguida vemos a poliproteína, os precursores e as proteínas maduras geradas pelo processamento proteolítico. As setas pretas (↓) representam os sítios de clivagem pela signalase. As setas brancas (↕) representam os sítios de clivagem pela protease viral. A atividade proteolítica responsável pela clivagem entre NS1 e 2A ainda não é conhecida. As figuras sólidas representam as proteínas maduras após o último passo do processamento. Fonte: Chambers *et al.* (1990a), Rice (1996), Roizman & Palese (1996).

1.2.4..1 - Proteínas Estruturais

Proteína de Capsídeo (C)

A proteína C é altamente básica com cerca de 11 a 14 kilodaltons (kDa) e é responsável pela formação do nucleocapsídeo junto com o RNA viral (Boege *et al.*, 1983; Rice *et al.*, 1985; Trent, 1977). Possuem resíduos básicos que,

presumivelmente mediam a interação com o RNA e estão agrupados na região N e C terminal (Khromykh and Westaway, 1996), separados por um pequeno domínio que media a associação com a membrana (Markoff *et al.*, 1997). A proteína C nascente contém na região carboxi – terminal uma âncora membranosa hidrofóbica que serve como peptídeo sinal para translocação da prM dentro do lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER). Este domínio hidrofóbico é clivado para proteína C madura por uma serina protease viral (Amberg *et al.*, 1994; Lobigs, 1993; Yamshchikov e Compans, 1994). Apesar da estrutura tridimensional da proteína C dos flavivirus ainda serem desconhecidas, a proteína C de TBEV é rica em domínios α hélices, incluindo os domínios hidrofóbicos (Kofler *et al.*, 2002). Trabalhos adicionais devem ser feitos para um melhor entendimento da estrutura desta proteína, tal como sua interação com as proteínas de superfície e envelope viral (Lindenbach and Rice, 2003).

Proteína de Membrana (prM/M)

A glicoproteína precursora da proteína membrana (M), *prM* com peso molecular de aproximadamente 18 - 19 kDa, esta é translocada dentro do lúmen do RE pelo domínio hidrofóbico C-terminal da proteína C. Clivagens pela peptidase sinal do hospedeiro são liberadas até que esta seqüência sinal seja removida do capsídeo (Amberg *et al.*, 1994). Uma explicação para esta estratégia de processamento não usual seria o processamento tardio da proteína estrutural e conseqüentemente, produção de vírus até mais tarde na infecção, quando níveis de proteases virais estariam elevados. A região N-terminal da *pr* contém um dos três sítios de glicosilação da *prM* e seis resíduos conservados de cisteínas, que interagem via pontes de dissulfetos (Chambers *et al.*, 1990a; Nowak and Wengler, 1987). A conversão da partícula viral imatura para madura ocorre na via secretória e coincide com a clivagem da *prM* em *pr* e *M* pelas enzimas do complexo de Golgi semelhantes a furina (Stadler *et al.*, 1997).

A função da *prM* é estabilizar a proteína E, impedindo a exposição prematura do peptídeo de fusão ao pH reduzido encontrado na via exocítica. A retenção da proteína *prM* pode afetar a conformação e antigenicidade da proteína E, e reduzir a infectividade viral inibindo a fusão dependente de ácido (Stadler *et al.*, 1997; Heinz *et al.*, 1994a; Heinz *et al.*, 1994b)

Proteína de Envelope (E)

A proteína E tem o peso molecular com cerca de 53 kDa, é a maior proteína de superfície do vírus e o maior determinante antigênico, e tem como principal função participar da ligação e fusão com a membrana durante a entrada do vírus, e é o principal alvo da resposta imunoprotetora no hospedeiro vertebrado (Russel, 1980). É sintetizada como uma proteína de membrana tipo I, contendo 12 cisteínas conservadas que formam pontes dissulfeto (Nowak and Wengler, 1987). Para alguns vírus, a proteína E é N-glicosilada (Post *et al.*, 1992; Chambers *et al.*, 1990; Winkler *et al.*, 1987).

A estrutura cristalizada de um fragmento solúvel da proteína E do TBEV foi determinada a uma resolução de 2.0 Å (Rey *et al.*, 1995). Este modelo revelou uma estrutura alongada rica em folhas β , formando um homodímero (“head-to-tail”). Cada subunidade é composta de três domínios: I, as cadeias β predominam com uma estrutura de oito dando a forma de um Barril β e eixo orientado em paralelo à membrana viral; o domínio II é uma estrutura alongada semelhante a um “dedo”, que é composta de duas alças descontínuas estendidas do domínio I. Uma dessas alças é estabilizada por três pontes dissulfetos e formam uma ponta que interage com pontos hidrofóbicos providos de resíduos adjacentes da junção dos domínios I e III do segundo monômero a qual se projeta ao longo da superfície do vírus. A alça que constitui esta ponta é altamente conservada entre todos os flavivirus e funciona como um peptídeo de fusão interno (Allison *et al.*, 2001; Rey *et al.*, 1995); o domínio III é uma região constante semelhante uma imunoglobulina, que se supõem ser uma região de ligação ao receptor com uma série de determinantes de virulência e neutralização já mapeados neste domínio (Mandl *et al.*, 2000; Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2005; Nickells e Chambers, 2003).

1.2.4.2 - Proteínas Não Estruturais.

NS1

A proteína NS1 possui cerca de 46 kDa, com localização intracelular, mas também é encontrada na superfície celular, e é secretada lentamente nas células

de mamíferos (Mason, 1989; Post *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1970; Winkler *et al.*, 1988). Esta proteína é translocada para dentro do RE e liberada da proteína E pela peptidase sinal do hospedeiro (Chambers *et al.*, 1990a; Falgout *et al.*, 1989; Falgout and Markoff, 1995). Esta glicoproteína contém dois ou três sítios de N-glicosilação e 12 cisteínas conservadas que formam pontes dissulfetos (Lee *et al.*, 1989; Mason, 1989; Smith *et al.*, 1970). O processamento proteolítico da junção das proteínas NS1/NS2A ocorre por uma enzima do hospedeiro desconhecida residente no RE (Falgout and Markoff, 1995). A NS1 forma homodímeros que são altamente estáveis, resistentes à desnaturação com uréia 6 M ou 5 M de guanidina-HCl, mas são instáveis a altas temperaturas ou pH baixo (Winkler *et al.*, 1989).

Coincidente com a dimerização, a NS1 adquire parcialmente um caráter hidrofóbico, como demonstrado pela sedimentação com frações de membrana celular ou extração com Triton X-114 (Winkler *et al.*, 1988; 1989). Esta proteína é altamente hidrofílica e não contém domínios de transmembrana, porém a natureza desta associação com membranas é controversa (Lindenbach and Rice, 2003). Também não está bem definida ainda qual a função das formas extracelulares da NS1. Durante infecção, ocorre uma forte resposta imune humoral contra esta proteína, que tem lhe conferido uma função de imunoproteção (Falgout *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1998; Qu *et al.*, 1993; Schlesinger *et al.*, 1993). Estes anticorpos podem direcionar a lise mediada pelo complemento, em células infectadas por flavivirus com a NS1 na superfície (Henchal *et al.*, 1988; Schlesinger *et al.*, 1985, 1993). Todavia, anticorpos contra NS1 podem induzir fosforilação da tirosina de várias proteínas não identificadas, em células infectadas com VDEN2 (Jacobs *et al.*, 2000) e tem sido proposto que reação cruzada com anticorpos anti-NS1 para VDEN podem ser a causa de imunopatologia com o conseqüente extravasamento de fluídos (Chang *et al.*, 2002; Falconar, 1997). A forma secretada da NS1 foi originalmente caracterizada como antígeno fixador de complemento solúvel, presente no soro e tecidos de células infectadas (Brandt *et al.*, 1970). Estudos recentes sugerem que a dimerização seja um processo necessário para secreção da proteína NS1 (Pryor and Wrigth, 1993; Hall *et al.*, 1999). A forma secretada solúvel é uma partícula hexamérica de cerca de 11nm (Crooks *et al.*, 1990, 1994; Flamamand *et al.*, 1999), constituída de três grupos de dímeros, mantidos juntos por interações

hidrofóbicas que podem surgir via seqüestro de interações membranosas, colocadas na superfície dos dímeros de NS1 (Lindenbach and Rice, 2003). A dimerização não é tão evidente na propagação de vírus de FA 17D em culturas de células (Post *et al.*, 1991).

NS2A

É uma proteína relativamente pequena com cerca de 22 kDa e de característica hidrofóbica. A região N-terminal da NS2A é gerada via clivagem da NS1-2A por uma enzima do hospedeiro residente no RE ainda desconhecida (Falgout and Markoff, 1995). A região C-terminal é gerada pela clivagem pela serina protease viral, no citoplasma da célula hospedeira. Estudos de deleções sítio-específica ou de mutação na região C-terminal da proteína NS2A (substituição de Lys₁₉₀ → Ser), indicam perda de nucleocapsídeo, mas exibem níveis de replicação de RNA normal, que indica a importância dos resíduos de aminoácidos básicos, como na posição 190 da proteína NS2A na formação de partículas virais (Chambers *et al.*, 1990b; Nestorowicz *et al.*, 1994; Kummerer and Rice, 2002).

NS2B

É uma proteína de 14 kDa associada à membrana. Esta proteína forma um complexo com a NS3 e é um cofator para a atividade de serina protease da NS3 (Arias *et al.*, 1993; Chambers *et al.*, 1991, 1993; Falgout *et al.*, 1991; Jan *et al.*, 1995; Yusof *et al.*, 2000). A atividade de cofator da NS2B está contida em uma região hidrofílica central conservada de 40 resíduos (Chambers *et al.*, 1993; Falgout *et al.*, 1993; Leung *et al.*, 2001), flanqueada por regiões hidrofóbicas que mediam a associação com membranas (Clum *et al.*, 1997).

NS3

É uma proteína multifuncional contendo pelo menos três atividades enzimáticas envolvidas no processamento da poliproteína e replicação do RNA. É a segunda maior proteína viral com peso molecular que varia de 68-70 kDa, é altamente conservada entre os *Flavivirus* (Markoff *et al.*, 1990; Chambers *et al.*, 1990a) e não contém uma cadeia hidrofóbica longa. Está associada com

membranas via sua interação com NS2B (Arias *et al.*, 1993; Chambers *et al.*, 1993; Clum *et al.*, 1997).

Baseado em alinhamentos de sequências de um terço da região N-terminal, determinou-se que o terço amino-terminal da proteína NS3 dos flavivirus possui características estruturais similares à família da tripsina sendo, portanto uma serina protease (Bazan e Fletterick, 1990; Gorbalenya *et al.*, 1989). Isto foi confirmado por mutação no centro catalítico ativo composto por três resíduos de aminoácidos, que para VFA são: histidina₅₃, ácido aspártico₇₇ e serina₁₃₈, desta protease. A tríade de aminoácidos componente do sítio catalítico da proteína NS3 também foi alvo de estudos de mutagênese (Chambers *et al.*, 1990).

Estes dados mostram que a poliproteína contém uma sequência amino-terminal sinal que dá início ao processo de codificação das proteínas não estruturais NS2A e NS2B e, o segmento amino-terminal da NS3, que é proteoliticamente clivado *in vitro* na presença da membrana do RER (Chambers *et al.*, 1990c; Pugachev *et al.*, 1993; Valle and Falgout, 1998; Wengler *et al.*, 1991; Zang *et al.*, 1992) nos sítios amino e carboxi-terminal da proteína NS2B.

Estudos sobre a atividade de clivagem no genoma de VDEN2 deu importante contribuição para entendermos a clivagem das proteínas NS2A-NS2B e NS2B-NS3 (Preugschat *et al.*, 1990). A clivagem entre NS2A-NS2B é dependente da proteinase NS2B-NS3 como observado em experimentos de mutagênese do VFA (Nestorowicz *et al.*, 1994). No entanto, a atividade de clivagem pelo domínio da proteinase NS3 é também necessária para a clivagem da proteína NS2B (Chambers *et al.*, 1991; Falgout *et al.*, 1991).

Um modelo estrutural para NS3 baseado em estudos de homologia contém ainda, uma helicase na região central e a RNA trifosfatase no domínio carboxi-terminal, atividades estas importantes na replicação do RNA (Gorbalenya *et al.*, 1989; Wengler *et al.*, 1993). Os mecanismos enzimáticos da replicação do RNA utilizam a energia liberada da hidrólise do ATP para formação do RNA duplex, estimulando a atividade de NTPase, isto já demonstrado de várias formas inclusive com experimentos usando a NS3 truncada na região N-terminal (Kuo *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999; Takegami *et al.*, 1995; Warrenner *et al.*, 1993; Wengler and Wengler, 1991). A atividade de NTPase dessa proteína aumenta na presença da NS5 (Chen *et al.*, 1997; Cru *et al.*, 1998). Além da atividade de NTPase, a região C-terminal da NS3 codifica uma atividade de RNA trifosfatase (RTPase)

(Wengler and Wengler, 1993). Esta atividade é importante na defosforilação da extremidade 5' do RNA genômico antes da adição do CAP (Wengler and Wengler, 1993).

NS4A e NS4B

São pequenas proteínas com peso molecular de 16 e 27 kDa, respectivamente, hidrofóbicas e com função desconhecida. A região C terminal da NS4A age como uma seqüência sinal para a translocação da NS4B para dentro do lúmen do RE. Todavia, como mencionado anteriormente para a proteína de capsídeo, o processamento da junção NS4A-NS4B requer uma seqüência peptídica sinal, para que a serina protease NS2B-NS3 faça a clivagem necessária (Lin *et al.*, 1993; Preugschat and Strauss, 1991). Ainda não está claro por que estes eventos de clivagens são coordenados dessa maneira. Além disso, têm sido observadas formas de NS3-NS4A e NS4A-NS4B não processadas (Chambers *et al.*, 1990; Lobigs 1992; Preugschat and Strauss, 1991). A proteína NS4B é uma proteína de transmembrana que está localizada em sítios de replicação e no núcleo (Westaway *et al.*, 1997). Esta proteína é modificada após a tradução para uma forma que migra muito rapidamente em SDS-PAGE (Chambers *et al.*, 1990; Preugschat and Strauss, 1991), mas a função da NS4B e a natureza desta modificação ainda não estão determinadas (Lindenbach and Rice, 2003). Alguns estudos têm demonstrado que a interação genética entre as proteínas NS1 e NS4A é necessária para replicação do RNA (Lindenbach and Rice, 1999).

NS5

A NS5 é a maior proteína viral, com peso molecular de cerca de 103 kDa, bem conservada em termos de seqüência de aminoácidos (60-70%) entre os flavivirus e está envolvida na replicação do RNA. Ela contém na região N-terminal uma atividade de processamento de CAP do RNA e na região C-terminal uma atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RPdR). A NS5 pode ser fosforilada por serina quinase(s) associada(s) a serina-treonina (Kapoor *et al.*, 1995; Morozova *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1998).

A região N-terminal (aminoácidos 60 a 132) da NS5 tem uma homologia com S-adenosil-metionina (SAM) – dependente de metiltransferase, sugerindo que esta proteína esteja envolvida na formação do CAP 5'-terminal (Koonin,

1993). O suporte para esta hipótese veio de um estudo que demonstrou que o domínio N-terminal da NS5 de VDEN2 pode transferir grupos metil para SAM, estimulando a formação do CAP no RNA (Egloff *et al.*, 2002). Além disso, este grupo determinou a estrutura da NS5 cristalizada (resíduos 7 a 267 na resolução de 2.4 Å), validando a similaridade estrutural entre esta região e outras metiltransferases (Egloff *et al.*, 2002).

A região C-terminal da NS5 contém homologia significativa com a RPdR de outros vírus RNA de cadeia positiva (Koonin, 1993; Rice *et al.*, 1985). A atividade de polimerase dessa proteína tem sido confirmada com o desenvolvimento da proteína NS5 recombinante, e o maior produto destas reações *in vitro* parecem ser o seu próprio RNA (Ackerman and Padmanabhan, 2001; Guyatt *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1996).

Resumidamente, a NS5 tem uma função de RPdR e deve estar localizada nos sítios de replicação do RNA. Esta proteína forma um complexo com a NS3 (Kapoor *et al.*, 1995) e pode estimular a atividade de NTPase da NS3 (Cui *et al.*, 1998). Isto sugere que, talvez apenas uma fração resida em complexos de replicação ativa (Lindenbach and Rice, 2003).

1.2.5 - Diversidade Genética

A comparação da seqüência de aminoácidos do vírus VDEN2 e VDEN4 mostraram que eles compartilham 65% de similaridade de aminoácidos. Isto também acontece com outros flavivirus dentro de um mesmo complexo sorológico, como os pertencentes ao complexo das encefalites (WNV, MVE, KUNV, JEV e VILH), onde os seus membros dividem 65-75% de identidade (Strauss JH, 1989 e Cruz *et al.*, 1997).

A distribuição das variantes genéticas de isolados do vírus DENV1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4 no mundo, foram identificadas utilizando o seqüenciamento parcial da região estrutural do genoma viral (Rico-Hesse, 1990; Lanciotti, *et al.*, 1994, 1997; Gonçalves *et al.*, 2002). A relação genética entre isolados de vírus VDEN de várias regiões geográficas em várias áreas endêmicas do mundo permitiu o estabelecimento de grupos genotípicos distintos com 5% ou mais de divergência nucleotídica (Tabela 01).

No Brasil estudos filogenéticos realizados com seqüências de 240 nucleotídeos da junção dos genes das proteínas E/NS1 de vírus isolados em várias regiões do país desde 1988, mostraram que desde a introdução do VDEN1 e VDEN2, não ocorreram mudanças no perfil genotípico, permanecendo os genótipos I e III, respectivamente (Miagostovich *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004; Pires Neto *et al.*, 2005).

Análise de recombinação gênica fora realizada para VDEN1 e VDEN2, e não apresentou nenhuma evidência genética de recombinação nos vírus VDEN circulante no Brasil até o presente (Santos *et al.*, 2004).

Estudos filogenéticos com vírus VDEN3 isolados no Brasil, ainda não foi realizado, há apenas a caracterização genética de um VDEN3 isolado no Rio de Janeiro, que o agrupou no genótipo III que incluem a maioria dos vírus do Sudeste Asiático.

Tabela 01. Distribuição dos genótipos dos vírus VDEN

SOROTIPO	GENOTIPO	REFERÊNCIAS
VDEN1	1: Américas, África e Sudeste da Ásia; 2: Sri Lanka; 3: Japão; 4: Sudeste da África, Sul do Pacífico, Austrália e México; 5: Taiwan e Tailândia	Rico-Hesse, 1990 Gonçalvez <i>et al.</i> , 2002
VDEN2	1: Caribe e Sul do Pacífico; 2: Taiwan, Filipinas, Nova Guiné e Tailândia antiga; 3: Vietnã, Jamaica e cepas Thailândesas; 4: Indonésia, Seychelles, Burkina Faso e Sri Lanka; 5: África do Sul; 6: American.	Rico-Hesse, 1990 Rico-Hesse, 1997
VDEN3	1: Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Pacífico Sul; 2: Tailândia; 3: Sri Lanka, Índia, África e Samoa; 4: Porto Rico e Tahiti	Lanciotti <i>et al.</i> , 1994
VDEN4	1: Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; 2: Ilhas do Caribe e América Central.	Lanciotti <i>et al.</i> , 1997

1.2.6 - Replicação Viral

O conjunto de replicação do RNA viral é organizado pelas proteínas não estruturais, junto com o RNA molde genômico, e presumivelmente com alguns fatores do hospedeiro, como membranas citoplasmáticas. A co-localização do RNA viral e proteínas NS3 e NS5 têm indicado que complexos de vesículas são os principais sítios de replicação do RNA (Mackenzie *et al.*, 1996; Westaway *et al.*, 1997; 1999). A replicação começa com a síntese de uma fita RNA negativa, que serve como molde para a síntese de fita de RNA positiva adicional. A síntese de RNA é assimétrica, sendo 10 a 100 vezes o excesso de fitas positivas sobre as fitas negativas (Cleaves *et al.*, 1981; Muylaert *et al.*, 1996).

O ciclo de multiplicação viral ocorre totalmente no citoplasma das células infectadas e envolve poucas organelas celulares (Figura 03). A replicação dos flavivírus pode ser estudada em uma grande variedade de linhagens celulares. Evidências sugerem que os flavivírus entram nas células por endocitose mediada por receptores, provavelmente pela ligação da proteína E do *virion* a receptores da membrana plasmática da célula hospedeira (Gollins *et al.*, 1985). A ligação da proteína E a receptores celulares induz a formação de vesículas endocíticas recobertas por clatrina. Após a internalização por endocitose, mediada por receptor, os vírus são liberados no citoplasma por mudanças conformacionais induzidas por pH ácido, que levam à exposição do peptídeo de fusão (Allison *et al.*, 1995 e 2001; Heinz e Allison, 2001). Estas alterações causam a trimerização da proteína E (Stiasny *et al.*, 1996; Modis *et al.*, 2004).

O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma por meio de fusão do envelope com a membrana de vesículas endocíticas, catalizada por baixo pH (Gollins *et al.*, 1986a e 1986b). No citoplasma da célula hospedeira, o genoma de RNA positivo serve como RNAm para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais e também como molde para a síntese de uma fita complementar negativa que, por sua vez, servirá de molde para a síntese de mais fitas positivas a serem utilizadas na montagem de novas partículas virais. A replicação é um processo semiconservativo e envolvem intermediários e formas replicativas intermediárias (dupla fita) (Cleaves *et al.*, 1981).

A montagem das partículas virais ocorre em íntima associação com o RE das células hospedeiras. Durante a montagem do *virion*, o domínio citoplasmático,

altamente básico, da proteína C interage com o RNA genômico viral para formar o nucleocapsídeo precursor. As proteínas prM e E são deslocadas para o RE, posicionando seus domínios carboxi terminal hidrofóbicos na bicamada lipídica. A formação das partículas virais ocorre através do revestimento do nucleocapsídeo viral com as proteínas do envelope, ancoradas na membrana do RE celular (Figura 8). A clivagem de prM ocorre provavelmente próximo ou durante a liberação do vírus, já que não se detecta proteína M nas partículas intracelulares. E pode estar relacionada com o desencadeamento de mudanças no envelope que promovem a infectividade (Wengler *et al.*, 1989). Os vírus brotam para a luz do RE adquirindo uma membrana lipídica (envelope), assim, os vírus se mantêm solúveis nas cisternas do RE. A progênie viral é transportada em vesículas para a membrana plasmática e daí liberadas por exocitose através do sistema de Golgi (revisado por Chambers *et al.*, 1990a).

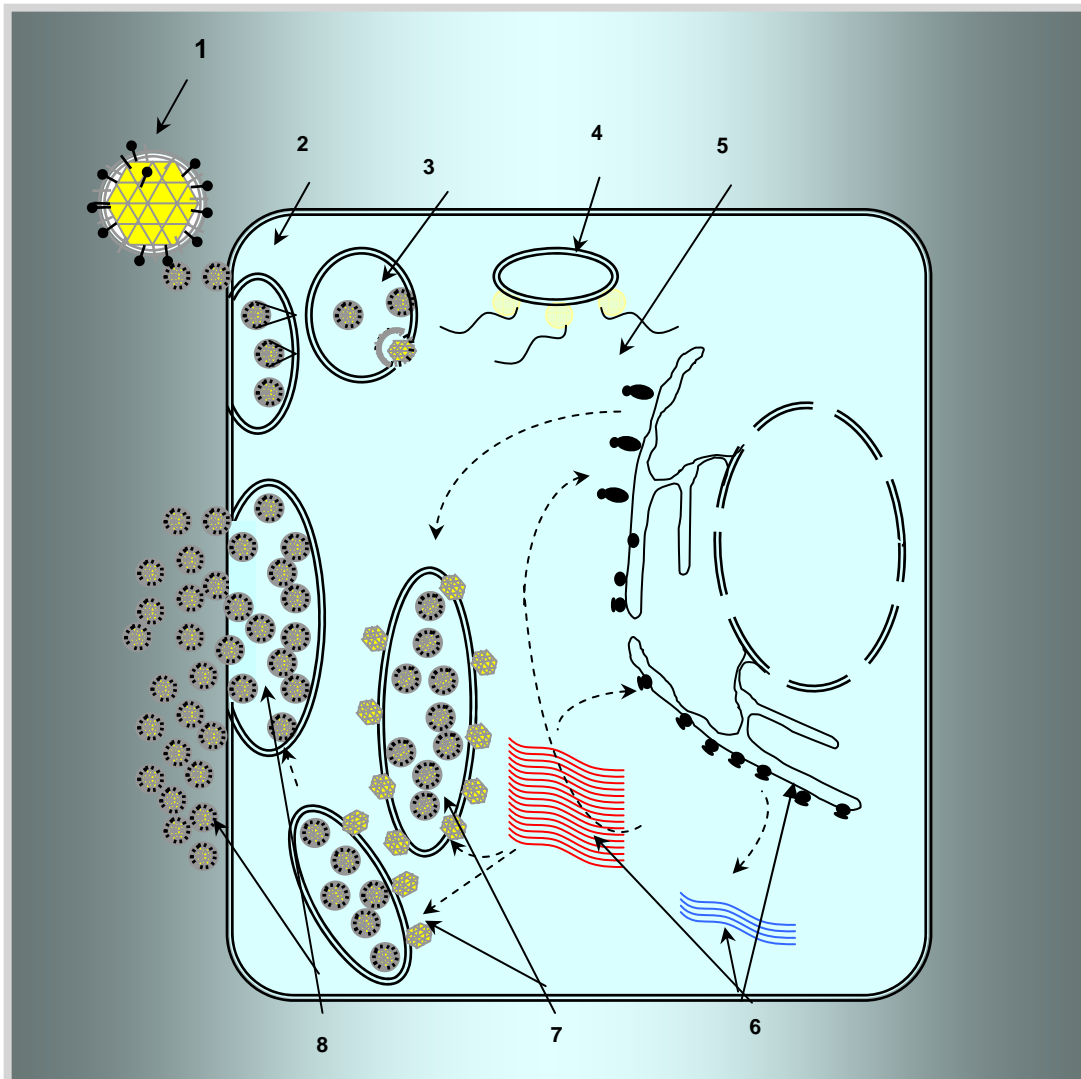


Figura 8 – Ciclo celular dos flavivírus

- 1) Adsorção
- 2) Endocitose (receptores?)
- 3) Fusão à membrana em pH baixo
- 4) Desencapamento e liberação do RNA
- 5) Tradução e processamento da poliproteína
- 6) Síntese de RNA
- 7) Morfogênese, maturação e transporte (Complexo de Golgi e vesículas)
- 8) Fusão à membrana plasmática e saída da progênie viral (Adaptado de Jabor, 2001)

1.2.7 - PATOGENÊSE DO VDEN

A FHD é a principal causa de mortalidade em infecções pelo vírus dengue. A patogênese da FHD não está definida, no entanto dados disponíveis sugerem fortemente que a maioria dos casos de FHD é causada por mecanismo imunopatológico (Rothman, 2004).

Durante muitos anos a patogênese de FHD tem sido uma controvérsia. Alguns trabalhos argumentam que infecção secundária é o principal fator na gravidade da doença, enquanto que outros indicam a virulência viral (Hammon, 1973; Kouri *et al.*, 1987). As características do hospedeiro são também importantes (Guzmán and Kouri, 2002).

FHD ocorre como uma consequência de um mecanismo muito complexo, onde o vírus, hospedeiro e resposta imune do hospedeiro interagem para determinar a gravidade da doença que ocorre em 2 a 4% dos indivíduos com infecção secundária (Guzmán *et al.*, 1997). Uma hipótese para o desenvolvimento das epidemias com FHD foi publicada em 1987 a partir das experiências em Cuba (Figura 9). A interseção de três grupos de fatores (hospedeiro, fatores epidemiológicos e virais) determina a ocorrência de uma epidemia de FHD. A elevada densidade do vetor, a ampla circulação do vírus e a população susceptível (risco de infecção secundária) são necessárias para aumentar o número de casos de FHD (Kouri *et al.*, 1987).

Aspectos epidemiológicos e virais são determinantes para epidemia de uma doença. Fatores de riscos individuais tais como: sexo, raça e doenças crônicas são fatores de predisposição que fazem a doença mais freqüente em certos grupos raciais e idade (Guzmán and Kouri, 2002). Todavia, a preexistência de anticorpos é principal fator de risco. Níveis de anticorpos devem ter um papel dominante no direcionamento da infecção por dengue seja para mais ou para menos célula infectada (Guzmán and Kouri, 2002).

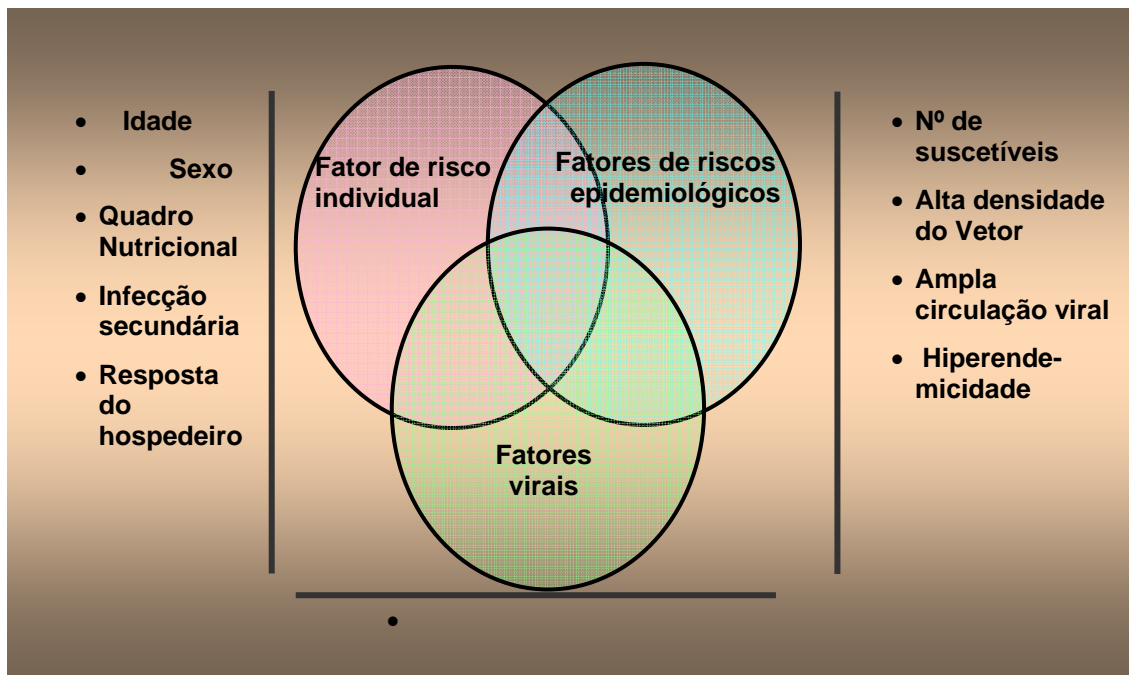


Figura 9: Hipótese dos fatores de risco para FHD.

Epitopos da proteína E são capazes de induzir anticorpos neutralizantes, homólogos e heterólogos. Pessoas infectadas com um sorotipo mantêm a imunidade protetora para o resto da vida para a infecção pelo vírus homólogo embora imunidade protetora com sorotipo heterólogo seja baixa. Durante a infecção secundária com um sorotipo diferente, há a presença de baixas quantidades de anticorpos neutralizantes heterotípicos que podem ou não prevenir infecção (Halstead, 1993).

Por outro lado, anticorpos heterotípicos formam complexos com VDEN que facilitam a entrada dos vírus opsonizados através dos receptores Fc γ RII via porção Fc da IgG de fagócitos mononucleares (monócito e macrófagos) e como consequência há um elevado número de células infectadas, desencadeando o mecanismo da amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADE) (Halstead, 1993; Halstead *et al*, 1967; Morens, 1994; Rothman, 2004).

Estudos epidemiológicos e sorológicos feitos na Tailândia e Cuba são exemplos da importância da infecção secundária como fator de risco de FHD. Desde a primeira observação feita por Halstead *et al*. 1970, FHD tem estado presente em situações onde há mais que um sorotipo circulando (PAHO, 1994; Guzmán *et al*, 1997; Sangkawibha *et al*, 1984; Morens, 1994; Guzmán *et al*,

1981). Ao lado da infecção secundária, doenças crônicas tais como: asma brônquica e diabetes estão incluídas entre os fatores de riscos de FHD.

Anticorpos neutralizantes são os fatores chaves na etiopatogenese da doença, contudo a resposta imune celular é também importante. A proteína NS3 parece ser o maior alvo das células T do tipo CD4+ e CD8+, embora alguns epitopes de células T reconheçam outras proteínas tais como proteínas de E e C. A magnitude da proliferação de sorotipos dengue heterologos é variável dependendo de diferentes fatores tais como sorotipo causador da infecção primária e a etnicidade do individuo.

As citocinas podem ser liberadas diretamente de monócitos e macrófagos como resultado da infecção ou após interações entre células imunes e infectadas, ou ambas. Elas podem induzir extravasamento de plasma, aumento de interferon γ , interleucina (IL) 2 e fator de necrose tumoral (TNF) α em casos de FHD. Todos esses fatores estão envolvidos no desencadeamento das síndromes hemorrágicas por DENV.

Apesar destes conhecimentos, ainda não estão bem definidos os fatores vírus específicos e do hospedeiro que determinam porque certos indivíduos têm apenas FD branda e outros desenvolvem FHD. Seqüências de aminoácidos e nucleotídica de diferentes sorotipos são estudadas para definir possíveis marcadores moleculares de atenuação e virulência. Comparações de seqüências de cepas virulentas e atenuadas demonstraram que mutações podem ser importantes para atenuação (Guzman e Kouri, 2002) (Tabela 02).

Tabela 02: Resumo das teorias propostas da patogênese de VDEN

HIPÓTESES	DEFINIÇÕES
Teoria da Facilitação por Anticorpo (<i>Antibody Enhancement</i>)	Anticorpos heterólogos preexistentes reconheceriam o vírus infectante e formariam um complexo antígeno-anticorpo, cuja ligação ao receptor Fc γ (Fc γ R), através da porção Fc da imunoglobulina G (IgG), resultaria no aumento da infecção (Halstead, 1980).
Teoria da Virulência	O DENV submetido à uma pressão seletiva apropriada, como a replicação no seu hospedeiro vertebrado e invertebrado, desenvolve variações

HIPÓTESES	DEFINIÇÕES
	genéticas que conferem aumento na virulência e no potencial epidêmico (Rosen, 1977,1986; Rico-Hesse cols, 1997; Leitmeyer <i>et al</i> , 1999).
Teoria do Mimetismo Molecular	Teoria baseada numa resposta auto-imune do hospedeiro (Markoff <i>et al</i> , 1990; Chungue <i>et al</i> , 1994; Lin <i>et al</i> , 2000).
Imunopatologia do Dengue	Patologia mediada pela ativação do sistema imune inato e adaptativo durante a infecção (Rothman & Ennis, 1999).

1.2.7.1 - Manifestações Clínicas

Infecção pelo vírus dengue (VDEN) pode ser assintomática ou pode conduzir a um amplo quadro clínico levando a morte. O período de incubação é de 3-14 dias (em média 4-7). A maioria das infecções por VDEN é caracterizada por febre indiferenciada com ou sem exantema, principalmente em crianças e jovens em áreas endêmicas (Travassos da Rosa *et al*, 1997).

Febre de Dengue (FD)

Adultos e jovens podem desenvolver uma síndrome febril branda ou febre de dengue (FD), consistindo de febre alta, cefaléia severa, dor retro-orbital, mialgia, artralgia e exantema maculo-papular. Sinais de sangramento na pele tais como, teste de torniquete positivo, petéquias ou equimoses são observadas em alguns pacientes. Casos de FD com complicações de sangramento, como epistaxis, sangramentos gengivais, intestinais, gastrointestinal, hematúria e hipermenorréia podem ser observados durante algumas epidemias, a trombocitopenia tem sido também registrada em alguns casos. O VDEN desaparece do sangue cerca de 5 dias após o aparecimento dos sintomas, coincidindo com o desaparecimento de febre. A FD é uma doença muito incapacitante, contudo seu prognóstico é benigno.

Febre Hemorrágica do Dengue (FHD)

A febre hemorrágica de dengue (FHD) se diferencia da FD típica com a ocorrência de formas mais graves pouco comuns, onde a principal característica patofisiológica observada é o extravasamento de plasma. Os sintomas mais comuns observados na FHD são: febre alta, sangramentos, trombocitopenia moderada (abaixo de 100.000/mL) e hemoconcentração (hematócrito elevado até 20%) caracterizando a severidade da doença. Hepatomegalia tem sido também um importante sinal em diferentes quadros clínicos (Travassos da Rosa *et al*, 1997; PAHO, 1994, WHO, 1997 & Guzmán, 2002).

Tanto FD como FHD começam com uma súbita elevação da temperatura. Após 3-4 dias sinais de hemorragia tais como petéquias, equimoses, epistaxis ou sangramento gengival ou gastrointestinal são observados em casos de FHD. A perda de plasma através de: extravasamento pleural e hipoproteinemia são comuns. Algumas pacientes podem desenvolver colapsos circulatórios pela perda de plasma, levando a síndrome de choque de dengue (SCD), apresentando pulso baixo ou hipotensão, pele fria e úmida e quadro mental alterado (PAHO, 1994; WHO, 1997 & Guzmán and Kouri, 2002) (Tabela 03).

Tabela 03: Divisão do grau de severidade das apresentações clínicas de dengue (Segundo a OMS)

GRAU DE SEVERIDADE	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
I	Febre, cefaléia, dor retroorbital, mialgia, artralgia e mal estar.
II	Além dos sintomas anteriores acrescidos de: náuseas, vômito, alteração de sensação do gosto, exantema, dores nos ossos, leucopenia, trombocitopenia e elevação de enzimas hepáticas.
III	Além dos sintomas anteriores acrescidos de: manifestações hemorrágicas, com sinais de falhas circulatória, extravasamento de plasma, teste do torniquete positivo, petéquias, efusão pleural, hipoproteinemia e ascite.
IV	Inicia com o grau I e evolui sucessivamente para o II e III até

GRAU DE SEVERIDADE	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
	desencadear uma síndrome de choque, que é definida como FHD com sinais de falhas circulatórias em decorrência das manifestações hemorrágicas, incluindo diminuição do pulso, hipotensão, hepatomegalia, aumento dos níveis enzimáticos, dores abdominais, vômito persistente, súbita mudança de febre para hipotermia com sudorese e prostração.

Outra manifestação clínica não comum da infecção de dengue é o envolvimento do sistema nervoso central (SNC). Desordens neurológicas podem ocorrer em ambos os casos FD e FHD. Em FD, sintomas neurológicos variam de irritabilidade e depressão por causa de paralisia motoneural até encefalites com convulsão e morte. Encefalopatia em FHD pode resultar de anoxia cerebral, edema, hemorragia intracranial e oclusão de vasos. Em geral, sintomas encefálicos em FHD são atribuídos a defeitos do fígado e edema associado com extravasamento vascular cerebral, contudo em FD a patogênese de encefalopatia está pouco esclarecida (Guzmán and Kouri, 2002). Embora a ocorrência de complicações neurológicas durante infecção de dengue seja discutível a não esteja bem esclarecida, freqüentemente infecção de dengue tem sido associada com encefalopatia seguida por choque e hipoxemia do sistema nervoso central (SNC) com comprometimento da camada cinzenta do cérebro (Cunha *et al.*, 1999; Kunishige *et al.*, 2004; Lum *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1998; Row *et al.*, 1996; Sumarmo *et al.*, 1978; Vasconcelos *et al.*, 1998).

1.2.7.2- Organização do sistema nervoso central (SNC)

Para entendermos melhor o mecanismo de neurovirulência deve-se ter noção da organização do SNC incluindo os tipos celulares encontrados. O SNC é composto por dois tipos celulares: os neurônios e as células da glia. Neurônio e glia representam diferentes componentes de uma única unidade funcional, sendo que a funcionalidade cerebral depende da sinalização entre eles.

O neurônio é uma unidade sinalizadora do SNC. É uma célula com morfologia polarizada e está adaptada para funções de transmissão e processamento de sinais, tem muitos prolongamentos próximos ao corpo celular (os dendritos), que funcionam como antenas para os sinais de outros neurônios, e um prolongamento longo que leva as mensagens do neurônio para sítios distantes (o axônio). Sendo unidades funcionais de informação, os neurônios operam em grandes conjuntos que associados formam os circuitos ou redes neurais.

As células neuronais apresentam características morfológicas, bioquímicas e funcionais que adquirem ao longo de um processo de maturação. No plano morfológico, o corpo celular (soma) cresce em volume e vão se formando os prolongamentos dendríticos, até que a configuração de cada tipo celular esteja estabelecida. Ao mesmo tempo, no pólo oposto aos dendritos, ocorre a emissão de um axônio que cresce numa direção determinada para buscar alvos sinápticos.

A diversidade morfológica dos neurônios pode ser classificada considerando a forma e o tamanho do soma; a forma da árvore dendrítica; e o comprimento do axônio e a morfologia final. Existem neurônios de variadas dimensões somáticas, com corpo celular esférico, elipsóide, alongado, estrelado ou piramidal. Os dendritos que emergem do soma podem ser complexos ou muitos simples com pouca ou nenhuma ramificação, quando a célula não necessita captar informações aferentes de grande complexidade.

As células da glia representam o grupo mais numeroso de células do cérebro, e tem funções estruturais, metabólicas e de apoio trófico a neurônios. As células gliais são divididas em duas classes principais: microglia e macroglia. As microglias apresentam corpo celular pequeno e comportam-se como fagócitos que são normalmente mobilizados após infecções, lesões ou doenças degenerativas do SNC (Ferrer e Sarmiento, 1980).

As três classes funcionais principais da macroglia são os oligodendrócitos, endimócitos e astrócitos. Iremos nos deter apenas na terceira classe da macroglia, os astrócitos que por estar presente na maior parte do cérebro, se originarem em parte da glia radial e terem durante o desenvolvimento um papel crucial na construção do SNC.

Os astrócitos maduros possuem um corpo celular irregular e muitas vezes apresentam prolongamentos relativamente longos que podem estar associados a

vasos, à superfície ventricular e a neurônios. Podem ser divididos morfológicamente em fibrosos e protoplasmáticos. Astrócitos fibrosos possuem corpo celular pequeno, prolongamentos longos e finos, e são encontrados na substância branca, enquanto astrócitos protoplasmáticos possuem corpo celular com prolongamentos mais curtos e mais ramificados e são encontrados na substância cinzenta (Miller e Raff, 1984).

Em culturas primárias de células provenientes de fase embrionária do desenvolvimento do cérebro podem ser observados dois tipos de astrócitos, tipo I e tipo II, diferenciados morfológicamente e por fenótipo antigênico, por resposta a fatores de crescimento e origem a partir de precursores distintos (Miller e Raff, 1984; Raffet *al.*, 1983). Os astrócitos denominados do tipo I têm morfologia poligonal e achatada, semelhante a fibroblastos, são estimulados a proliferar pelo fator de crescimento de epiderme (*epidermal growth factor* – EGF) e apresentam imunoreatividade para proteína acídica fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP). A maioria dos astrócitos denominados tipo II, apresentam prolongamentos e são ramificados, não proliferam em resposta a EGF e apresentam imunoreatividade para GFAP. A diferenciação das células gliais inicia-se com a formação de astrócitos tipo I a partir do seu precursor durante o desenvolvimento embrionário.

2- JUSTIFICATIVA

O dengue é um importante problema de saúde pública na maioria das áreas tropicais e sub-tropicais do mundo. Quatro sorotipos claramente distintos (VDEN1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4) são conhecidos e associados a doenças em humanos e epidemias em todos os continentes, exceto a Antártida, com uma incidência anual estimada em 100 milhões de casos ao ano (Halstead, 1988).

Nos últimos anos, entre 1986 e 2004, mais de dois milhões de casos foram registrados no Brasil durante epidemias de VDEN causados pelos sorotipos VDEN1, VDEN2 e VDEN3. Centenas de casos de FHD têm também sido diagnosticados no Brasil, e as formas mais graves de dengue parecem estar associadas com diferentes fatores de riscos: i) presença de diferentes sorotipos de VDEN; ii) infecção secundária na presença de anticorpos não neutralizantes pré-existentes; e iii) fatores de susceptibilidade individual como raça, sexo, idade, quadro nutricional, e imunológico.

O estudo genético de amostras isoladas de casos de FD e FHD tem permitido determinar a origem evolutiva dos VDEN, associando-os ou não com a gravidade da doença nas epidemias.

O reconhecimento dos genótipos do VDEN e suas origens fornecem subsídios para que se possam monitorar os genótipos mais virulentos na vigência de epidemias e pode orientar a adoção das medidas de controle. Por outro lado, esses estudos podem também ajudar no esclarecimento da patogênese do VDEN e o mecanismo associado à resposta imune do hospedeiro, bem como, o entendimento da influência do vetor na seleção das variantes genéticas.

Neste estudo nos propomos a analisar mais especificamente características virais relacionados com a virulência de amostras isoladas no Brasil. Nos propomos também analisar as características genéticas e biológicas do VDEN2 associado à manifestação de distúrbios neurológicos isolado de paciente em período epidêmico. Vale ressaltar ainda, que o estudo realizado com VDEN2 neurovirulento nos dará subsídio para o entendimento do mecanismo de atenuação e virulência, visando o desenvolvimento de vacinas quiméricas.

3- OBJETIVOS

3.1 - GERAL

Estudo molecular dos vírus VDEN2 e VDEN3, por seqüenciamento nucleotídico parcial e caracterização de uma cepa de VDEN2 isolada de paciente com FD e manifestações neurológicas.

3.2 - ESPECÍFICOS

3.2.1- Caracterização Genotípica

Analisar a variabilidade genética ao nível dos genes prM/E de vírus dos sorotipos 2 e 3 isoladas em surtos ocorridos no Brasil, comparando com aquela já estudada no mundo, inclusive a detectada em amostras de *Ae. aegypti*;

Correlacionar a gravidade da doença com a circulação dos genótipos, analisando seu grau de virulência.

3.2.2- Caracterizar genética e biologicamente a amostra de vírus dengue tipo 2 BEL61082, isolada de paciente com quadro clínico de mielite transversa.

Identificação de aminoácidos variáveis possivelmente associados ao neurotropismo;

Estudo de Infecção experimental em camundongos albinos suíços;

Estudo de Infecção experimental *in vitro* em cultura de células primárias neurais de camundongos e ratos;

Estudo de Infecção experimental *in vitro* em cultura de linhagem contínua obtida de glioma humano.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - AMOSTRAS DO ESTUDO:

Em nosso estudo as amostras virais foram cedidas pela seção de Arbovirus do IEC/SVS/MS (tabelas 04 e 05). Para contemplar os objetivos tivemos que estabelecer alguns critérios, de acordo com o número de amostra disponível no banco de vírus. Como há várias apresentações clínicas do VDEN, selecionadas da seguinte forma: 1) quadro clínico da doença – neste item utilizamos aqueles que representassem uma variedade de manifestação clínica; 2) data do isolamento – foram utilizadas as amostras virais de VDEN2 isoladas no período de 11 anos e para VDEN3 desde sua introdução até 2003 ; 3) área geográfica no Brasil – foram selecionadas as que representavam a maioria das regiões do país seguindo os critérios anteriores. Para não selecionarmos mutações no processamento da amostra, os fluídos provenientes de isolamento viral foram utilizados no máximo na segunda passagem da cultura celular.

Tabela 04 - Amostras de VDEN2 dos casos clínicos estudados.

Amostra	Ano do Isolamento	Espécime	Quadro Clínico	Procedência	Número de acesso GenBank
BEL61082/ H623360	2001	Fluído de cultura celular # 1 e 2 /Soro	Mielite Transversa	Pará	AY644452
BEL63650/ H628243	2000	Fluído de cultura celular #1	FD	Pará	AY775307
CEA2440/ H527541	1994	Fluído de cultura celular #2	FHD	Ceará	AY775303
CEA2462/ H527821	1994	Fluído de cultura celular #2	FD	Ceará	AY775304
CEA2463/ H527822	1994	Fluído de cultura celular #1	FD	Ceará	AY775305
GOI4191/ H666426	2002	Fluído de cultura celular #1	FD	Góias	AY775306
MIG1269/ H533198	1995	Fluído de cultura celular #2	FD	Minas Gerais	AY714061
RGN53/ H506347	1991	Fluído de cultura celular #2	FD	Rio Grande do Norte	AY778960
ROR1811/ H547176	1996	Fluído de cultura celular #2	FD	Roraima	AY778961
ROR1812/ H547177	1996	Fluído de cultura celular #2	FD	Roraima	AY714062
TOC2016/ H508744	1991	Fluído de cultura celular #2	FD	Tocantins	AY642588

Legenda: FD – Febre de dengue; FHD – Febre Hemorrágica de dengue;

Tabela 05 - Amostras de VDEN3 dos casos clínicos estudados.

Amostra	Ano do Isolamento	Espécime	Quadro Clínico	Procedência	Número de acesso Genbank
*AM2394/ H657637	2002	Soro	FD	Amazonas	AY632355
Be70617 H652477	2002	Soro	FD	Pará	AY96025
Be73318 H668518	2003	Fluido de cultura celular #1	FD	Pará	AY960628
CE4739/ H656814	2002	Soro	FD	Ceará	AY960629
Goi1099 H666425	2003	Fluido de cultura celular #1	FHD	Góias	AY960630
Goi1100 H666426	2003	Fluido de cultura celular #1	FHD	Góias	AY960631
MTO3103 H650477	2002	Fluido de cultura celular #1	FD	Mato Grosso	AY960632
RGN576 H665993	2003	Fluido de cultura celular #1	FD	Rio Grande do Norte	AY960633
ROR3832 H651502	2002	Soro	FD	Roraima	AY960634
ROR3845 H651515	2002	Fluido de cultura celular #1	FD	Roraima	AY960635

Legenda: FD – Febre de dengue; FHD – Febre Hemorrágica de dengue; *= caso importado do Estado da Bahia.

4.2 - CEPAS DOS VÍRUS CONTROLES

4.2.1 - Vírus VDEN2 44/2

O vírus VDEN2 44/2 foi preparado pela propagação em células Vero de um vírus isolado (56344) derivado de três passagens em células C6/36 a partir de soro de paciente proveniente da cidade do Rio de Janeiro. Três placas purificadas foram passadas em células Vero e um lote semente primário foi preparado por amplificação em células Vero (Caufour *et al.*, 2001).

4.2.2 - Vírus VFA vacinal 17DD

Vírus vacinal VFA 17DD usado neste estudo foi cedida por Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz. Esta cepa foi produzida no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) em células Vero a partir da inoculação de um estoque 17DD102/84.

4.2.3 - Vírus quimérico 17D/D2

O vírus quimérico 17D/D2 usado no estudo foi construído por engenharia genética dos genes prM/E do vírus 17D pelo equivalente do VDEN2 44/2 (Caufour *et al.*, 2001).

4.2.4 - Seqüências do Genbank para análise

Para análise filogenética utilizamos seqüências disponíveis no Genbank que correspondem aos principais genótipos dos vírus VDEN2 e VDEN3 e estão demonstradas na tabela 06.

Tabela 06: Seqüências retiradas do Genbank ([genbank/ncbi/nlm/nih/gov](http://genbank.ncbi.nlm.nih.gov))

Vírus	Ano do Isolamento	Procedência	Número de acesso GenBank
VDEN2	1944	Nova Guine C	M32941
VDEN2	1964	Tailândia	U87411
VDEN2	1980	Tailândia	D00345
VDEN2	1983	Mexico	L04561
VDEN2	1983	Jamaica	M20558
VDEN2	1990	Venezuela	AF100466
VDEN2	1992	Mexico	AF100469
VDEN2	1993	Tailândia	U31951
VDEN2	1994	Tailândia	AF100459
VDEN2	1994	Tailândia	AF100460
VDEN2	1995	Tailândia	AF100461
VDEN2	1995	Tailândia	AF100462
VDEN2	1995	Peru	AF100467
VDEN2	1996	Tailândia	AF100463
VDEN2	1996	Tailândia	AF100464
VDEN2	1996	Peru	AF100468
VDEN3	1956	H87-Filipinas	M93130
VDEN3	1956	Filipinas	L11423
VDEN3	1962	Tailândia	L11440
VDEN3	1963	Porto Rico	L11433
VDEN3	1965	Tahiti	L11439
VDEN3	1973	Tailândia	L11620
VDEN3	1973	Indonésia	L11425
VDEN3	1974	Malásia	L11429
VDEN3	1978	Indonésia	L11426
VDEN3	1978	Indonésia	L11427
VDEN3	1981	SriLanka	L11431
VDEN3	1983	Filipinas	L11432
VDEN3	1984	Índia	L11424

Virus	Ano do Isolamento	Procedência	Número de acesso GenBank
VDEN3	1985	Moçambique	L11430
VDEN3	1985	SriLanka	L11436
VDEN3	1986	Samoa	L11435
VDEN3	1986	Tailândia	L11441
VDEN3	1987	Tailândia	L11442
VDEN3	1989	Tahiti	L11619
VDEN3	1989	SriLanka	L11437
VDEN3	1991	SriLanka	L11438
VDEN3	1992	Fiji	L11422
VDEN3	1998	Indonésia	AB189126
VDEN3	1998	Indonésia	AB189127
VDEN3	2001	RJ-BR	AY038605
VDEN3	2001	RJ-BR	AY679147

4.3 - MANUTENÇÃO DE CULTURA DE CÉLULAS

4.3.1 - Cultura de células da linhagem de *Ae. albopictus* clone C6/36.

Na propagação e manutenção das células C6/36, utilizou-se o meio Leibowitz (L-15) modificado com glutamina (Invitrogen/San Diego/USA), acrescido de triptose (Difco), aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL) (Invitrogen/San Diego/USA), estreptomicina (100 µg/mL) (Invitrogen/San Diego/USA), soro bovino fetal (SBF) (Invitrogen/San Diego/USA) a 5% para meio de crescimento e 2% para o de manutenção. As células foram mantidas em torno de 28° C, com passagens semanais das células confluentes que estavam em garrafas plásticas de 25 cm² com 10 mL de meio de crescimento. Para a preparação dos tubos e garrafas usados na inoculação foram adicionados 2 mL de meio na garrafa apenas para lavar a monocamada celular, desprezou-o em seguida e acrescentaram-se 5 mL de meio L15 de crescimento. Posteriormente, as células foram ressuspensas e diluídas na proporção de 1:30 de meio de crescimento, sendo distribuídos 10 mL por garrafa de 25 cm² e 1 mL por tubo de 16 X 125 mm que se deseje preparar para inoculação.

4.3.2- Cultura de células Vero

Vero é uma linhagem certificada (CCL – Certified Cell Line) de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto. Foram

obtidas da Coleção Americana de Culturas (ATCC, 1994) e pertencem à linhagem CCL-81.

A manutenção e estoque de células Vero são de responsabilidade de técnicos do (LATEV/Bio-Manguinhos). Para a manutenção de células Vero foram utilizados frascos descartáveis de 175 cm² em meio de manutenção 199/Earle completadas e mantidas em estufa a 37 °C. As culturas são submetidas a passagens semanais e uma parte dessas culturas era destinada ao nosso trabalho.

As células Vero foram estocadas em ampolas mantidas congeladas em nitrogênio líquido. Quando necessário, as ampolas foram descongeladas e as células mantidas em cultura para uso diário. Nas condições definidas previamente, os lotes de células foram utilizados a partir da 8^o passagem após descongelamento, e mantidos até a 15^a a 19^a passagem, quando era descartado e um novo lote era iniciado.

As células foram preparadas para os ensaios com 24 h de antecedência para todos os procedimentos. As monocamadas confluentes em frascos de manutenção de 175 cm² foram lavadas levemente duas vezes com 5 mL de verseno/tripsina e dissociadas com 0,5 mL dessa solução, após incubação a 37 °C por 3 a 5 min. As células foram então ressuspensas em 5 a 10 mL de meio de cultura 199/Earle completo e o número de células estimado por contagem em câmara de Neubauer. A densidade celular, o meio de cultura, e o tipo de suporte foram definidos pela necessidade de cada experimento. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ para a manutenção do pH do meio nas culturas em sistema aberto (placas).

4.3.3 - Cultura primária de Neurônio

A cultura de neurônios de córtex cerebral de ratos E16 foi realizada com a retirada da meninge e, logo depois, dissecação das estruturas, que foram mantidas em PBS-glicose. O córtex cerebral foi cortado em pequenos pedaços, e colocados com o auxílio de uma pipeta Pasteur num tubo de centrifuga contendo 3 mL de PBS-glicose. Foram adicionados 30 µl de tripsina (0,25%) colocou-se em estufa de CO₂, a 37 °C, com leve agitação manual. Após centrifugação por 30 s a 1500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado dissociado com pipeta Pasteur. Após a decantação foi recolhido o sobrenadante e feito a centrifugação

das células livres em suspensão, em centrífuga clínica, a 1500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado adicionado 3 mL de meio Neurobasal/B27 (Gibco) acrescido de glicose (35 mM, Merck), glutamina (1 mM, Calbiochem), bicarbonato de sódio (3 mM, Merck), penicilina/estreptomicina (25U/mL/0,5 mg/mL, Invitrogen/San Diego/USA) e fungizona (2,5 µg/ml, Squibb). As células foram contadas na câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 3×10^5 células/poço, em placas de cultura de 24 poços (Nunc, Naperville, USA) contendo lamínulas para imunofluorescência, previamente tratadas com poli-ornitina (Sigma, St Louis, USA). A cultura de célula foi mantida em estufa a 37 °C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. A observação foi feita em microscópio de contraste de fase Axovert S100 (Carl Zeiss, Germany), havendo a troca do meio a cada 3 dias até que a monocamada estivesse semi-confluyente aproximadamente com 7 dias.

As lamínulas utilizadas na preparação das células foram tratadas com poli-ornitina (1,5 µ/mL, PM 1400/Sigma, St Louis, USA), durante a noite, para melhorar a adsorção e crescimento das células, esse procedimento foi feito para todos os experimentos que envolveram cultura de células primárias.

4.3.4 - Cultura primária de Astrócito

Para a preparação e manutenção de células primárias de astrócitos foi utilizada a técnica desenvolvida por Moura Neto *et al.* (1983), com algumas modificações. Os animais sacrificados tiveram o cérebro dissecado, as meninges retiradas, o material cefálico picotado em PBS/glicose e os fragmentos dissociados com pipeta Pasteur (em PBS/glicose + tripsina 0,25%). Depois, as células dissociadas foram incubadas em estufa a 37 °C/5 min. Após incubação foram colocadas em meio Dulbeco's Modified Eagle Medium (D-MEM/F12, Gibco) com 10% de SBF e homogeneizadas. A seguir as células foram centrifugadas 3000 rpm/3 min e o sobrenadante desprezado, este processo de lavagem foi repetido. As células foram ressuspensas em meio D-MEM/F12 com 10% de SBF. Após dissociação, as células foram contadas em câmara de Neubauer e distribuiu-se 10^5 células/poço nas placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas para imunofluorescência e garrafas de cultura 25 cm² (Nunc, Naperville, USA), previamente tratadas com poli-ornitina (1,5 µ/mL, PM 1400/Sigma, St Louis, USA). Manteve-se a cultura em estufa a 37 °C (atmosfera úmida) e 5% de CO₂,

até a formação da monocamada celular e posterior infecção com o vírus em estudo.

4.3.5- Cultura de Glioma Humana linhagem U87

O astrocitoma humano de grau III, U87 MG, oriundo do American Type culture Collection (ATCC HTB 14/Maryland/USA) foi cedido pelo Dr. Vivaldo Moura Neto e mantido em meio de cultura como descrito abaixo.

As células U87 foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e após adição de meio MEM F-12. As células foram centrifugadas a 3000 rpm/2 min. O precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de MCS e as células foram dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur e transferidas para uma garrafa de cultura. Quando as células atingiram 80% de confluência foram tratadas com tripsina 0,25% a 37 °C. Após 5 min a tripsina foi inativada com MCS e as células passadas para outras garrafas e/ou placas de cultura com lamínula em MCS, de acordo com o experimento programado. As culturas celulares foram mantidas em estufa sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ e uma temperatura de 37 °C.

4.4 - ISOLAMENTO VIRAL DAS AMOSTRAS DO ESTUDO E PREPARAÇÃO DE ESTOQUE.

Os soros ou plasmas dos pacientes diluídos 1:100, em solução de PBS pH7,0 com penicilina e estreptomicina, foram inoculados em tubos de 16 x 125 mm contendo monocamadas de células C6/36 confluentes, 3 a 4 dias após a passagem. Os tubos foram incubados à TA e observados diariamente em microscópio óptico invertido até a verificação de ECP ou até o 10º dia. Nesse ponto as suspensões de células foram coletadas, e utilizadas para confirmação do sorotipo por imunofluorescência indireta (IF) e/ou teste da reação de transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) ou armazenada em freezer – 80 °C até o uso.

4.5- TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI):

O método utilizado foi o descrito previamente por Gubler *et al.* (1984). Foram usadas células C6/36 inoculadas com soro ou plasma e como controle

negativo foi usado células não infectadas. As células foram distribuídas nas lâminas (20 μ L em cada orifício) secas a TA e em seguida fixadas com acetona PA durante 15 min à -20 °C, sendo, depois as lâminas secas à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 10 μ L de anticorpos monoclonais (CDC/Atlanta/USA) para VDEN1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4 individualmente na diluição de 1:40 em PBS (pH 7,4) e as lâminas incubadas a 37 °C em câmara úmida durante 30 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos, e uma vez, rapidamente, em água destilada e, seca à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 μ L do conjugado anti-anticorpo de camundongo ligado a isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St Louis, USA) na diluição de 1:60 em PBS pH 7,4 sendo então, as lâminas incubadas à 37 °C em câmara úmida durante 30 min. Repetiu-se, então o mesmo processo de lavagem com PBS e água destilada como descrito anteriormente. Finalmente, as lâminas foram secas a TA, adicionada glicerina pH 8,2 e lamínulas de vidro. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (CARL ZEISS/GERMANY), com epi-iluminação, aumento final de 400 vezes.

4.6- INFECÇÃO DAS CULTURAS CELULARES (PRIMÁRIAS – NEURÔNIOS E ASTRÓCITO/CONTÍNUAS – U87)

As inoculações foram feitas pela infecção de monocamadas de células em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas, acrescentou-se o inóculo no volume de 200 μ L ($moi= 1$) e foi deixado para adsorção por 1 hora em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C, em seguida foi retirado o inóculo, acrescentado 1 mL de meio e levado para incubação a 37 °C, 5% de CO_2 . Durante 4 dias foi observada a presença de ECP a cada 24 horas e coletados os sobrenadantes das células (24, 48, 72 e 96 h). Os sobrenadantes foram colocados em microtubos 1,5 mL e armazenados em freezer -70 °C, para posterior uso. A fixação das lamínulas consistiu na adição de paraformaldeído 4% nos poços e incubação por 5 min a temperatura ambiente, seguiu-se 5 lavagens com PBS pH 7,0. As lamínulas foram imersas em PBS à temperatura de 8 °C até o momento do uso.

4.7- TITULAÇÃO VIRAL

A titulação viral foi realizada pela contagem do número de placas de lise produzidas em monocamadas de células Vero, sob meio de crescimento 199/Earle/CMC. Foram usadas placas de 24 poços, com células Vero semeadas à densidade de 10^5 células/cm², 24 horas antes do uso. Para a infecção, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) da suspensão viral e inoculação da monocamada com 0,1 mL de cada diluição, com incubação de 1 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, com agitação periódica. Em seguida, o inóculo foi retirado e adicionamos 1 mL de meio 199 Earle/CMC para uma incubação de 7 dias em estufa à 37 °C com 5% de CO₂. Após esse período, as monocamadas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,04%. As placas de lise presentes em cada diluição foram contadas e o número de unidades formadoras de placas (PFU) por mL de amostra foi calculado.

O cálculo do título viral foi feito segundo a fórmula: nº de placas de lise x diluição correspondente x 10 (acerto do volume para 1mL uma vez que 0,1 mL foi usado como inóculo) seguindo-se o cálculo do logaritmo na base 10 desse valor. Os valores foram expressos em log₁₀ pfu/mL.

O estoque viral do vírus da febre amarela, linhagem 17DD, titulado anteriormente, foi utilizado como referência para as titulações.

4.8- IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA COM DUPLA MARCAÇÃO

Antes de iniciar a primeira marcação foi feito um processo de permeabilização da membrana celular, colocou-se 50 µL de PBS + triton 0,2% e incubou-se 5 min a temperatura ambiente. Em seguida fez-se uma fase de bloqueio com 50 µL de BSA 5% por 30 min. Na cultura primária de neurônio de rato foi feito um bloqueio, para evitar reações inespecíficas, com 30 µL de soro de rato normal diluído 1:100 em PBS + BSA 1% por 30 min a temperatura ambiente, em seguida foi lavada 3 vezes com PBS, 5 minutos cada. A marcação com anticorpo primário foi feito com 30 µL de fluido ascítico hiperimune para VDEN2 (IEC/SVS/MS, Belém, Pará, Brasil), diluído 1:100 em PBS + BSA 1% e incubou-se em câmara úmida durante a noite a 4 °C. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com rodamina foi diluído 1:5000 e distribuíram-se 30 µL

em cada lamínula, e foi incubado por 1 h a TA, protegido da luz, após esse passo lavam-se as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS, 5 min cada.

A segunda marcação foi feita com anticorpos contra marcadores celulares, no caso de neurônio foi usado anti β tubulina (Sigma, St Louis, USA) e para astrocitoma anticorpos monoclonais anti-vimentina (DAKO). O anticorpo anti- β tubulina foi diluído 1:400 e anticorpos anti-vimentina na diluição 1:25 (DAKO) em PBS + BSA 1% e colocado 30 μ L em cada lamínula e deixado incubando 1 h e 30 min em cuba úmida em estufa a 37 °C. Em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS, 5 min cada. Posteriormente distribuiu-se 30 μ L do anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com a fluoresceína (FITC) (Sigma, St Louis, USA), diluído 1:500 em PBS + BSA 1% e deixado 1 h a 4 °C. A seguir foi lavado 3 vezes com PBS, 5 min cada. Ao término adicionou-se 30 μ L do marcador de núcleo DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (Sigma, St Louis, USA) por 10 min. Após as últimas lavagens com PBS, as lamínulas foram passadas rapidamente na água destilada e montadas sobre lâminas com N-Propil-galacto/PBS (0,2 M). As células foram observadas pelo microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 em fluorescência, equipado com câmera digital (CoolSNAP-Pro_{cf} color, ROPER SCIENTIFICTM Photometrics) acoplada a um computador com o software Image Pro Express.

4.9 - EXTRAÇÃO DE RNA

O método usado foi o do reagente Trizol LS (Invitrogen/San Diego/USA), seguindo orientações do fabricante. A técnica consistiu que para cada 0,25 mL de amostra foi adicionado 0,75 mL de Trizol LS. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 0,75 mL de TRizol LS, após centrifugação a fase aquosa foi retirada cuidadosamente evitando perturbar as outras fases e colocadas em microtubos novos. Para precipitação do RNA, foram acrescida 0,5 mL de álcool isopropílico (essa quantidade é para cada 0,75 mL de Trizol LS), seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Após o sobrenadante ser desprezado e o microtubo seco a TA, adicionou-se ao precipitado de RNA total 20 μ L de água livre de RNase, incubou-se 5 min a 65 °C e resfriado por 5 min a temperatura ambiente. O RNA foi utilizado imediatamente, ou estocado a -70 °C até o momento do uso.

4.10- TESTE DE REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA –SEMI-“NESTED” – REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-SEMI-“NESTED”-PCR) PARA SOROTIPAGEM DE VDEN DA AMOSTRA DE PACIENTE.

O teste de RT-Semi-“Nested”-PCR para sorotipagem de VDEN (Lanciotti *et al.*, 1992), a região amplificada neste teste corresponde ao gene da proteína prM/M. Iniciou-se com a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral extraído. O RNA viral passou por um processo de desnaturação inicial (90 °C/2 min + 5 min no gelo), depois foi adicionada uma mistura de reação do RT-PCR contendo Tampão 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 1 mM, DTT 0,02 mM, oligonuclotídeo 0,2 µM (D1/positivo + D2/negativo, Tabela 07) Inibidor de Ribonuclease 5 U, enzima RT - MMLV 1,125 U, TAQ DNA polimerase 1,25 U e Água livre de RNase e DNase para um volume final de 50 µL por reação (todos os reativos usados foram da Invitrogen/San Diego/USA) e amplificado com o seguinte programa: 1 ciclo 45 °C/65 min (síntese de cDNA); 94 °C/2 min; Primeiro PCR foram de 35 ciclos com oscilação de tempo e temperatura: 94 °C/60 s, 55 °C/2 min, 72 °C/3 min; 72 °C/10 min.

A partir do produto do primeiro PCR, realizou-se o segundo PCR diluindo-o em água livre de RNase e DNase (1:100). Em seguida, retirou-se uma alíquota de 5 µL e adicionou-se uma mistura de reação do PCR contendo tampão 1X, MgCl₂ 2mM, dNTPs 1 mM, DTT 0,02 mM, oligonuclotídeo 0,2 µM (D1/positivo + TS1-4/negativo, Tabela 07) Inibidor de Ribonuclease 5 U, enzima RT - MMLV 1,125 U, TAQ DNA polimerase 1,25 U e Água livre de RNase e DNase para o volume final de 50 µL (todos os reativos usados foram da Invitrogen/San Diego/USA) e em seguida amplificado com o seguinte programa: 18 ciclos com oscilação de tempo e temperatura: 94 °C/30 s; 55 °C/1 min; 72 °C/2 min. O produto final foi analisado em gel de agarose 2% (Invitrogen/San Diego/USA), após coloração com brometo de etídio.

Tabela 07: Oligonucleotídeos usados no RT-Semi-“Nested”-PCR

Nome do Primer	Sequência	Posição no genoma
D1	5' -TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG -3'	134-161
D2	5' -TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC -3'	616-644
TS1	5' -CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586
TS2	5' -CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252
TS3	5' -TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421
TS4	5' -CTCTGTTGTCTAAAACAAGAGA-3'	506-527

4.11 - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PCR PARA PREPARAÇÃO DE CDNA PARA O SEQUENCIAMENTO.

O cDNA foi obtido diretamente do RNA viral pela transcrição reversa *in vitro*. Inicialmente, tubos de 0,2 mL contendo 7 μ L do RNA e 1 μ L de oligonucleotídeo negativo (0,2 μ M/cada) (tabelas 08 e 09), foram incubados para desnaturação da molécula de RNA a 90 °C por 2 min e deixados à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foram acrescentados 12 μ L da mistura da reação de RT contendo tampão 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTPs 1 mM, inibidor de ribonuclease 40 U e transcriptase reversa 1,5 U (todos os reativos usados foram da Invitrogen/San Diego/USA). A síntese de cDNA foi feita a 45 °C por 1 h, foi em seguida aquecida a 94 °C por 10 min e deixada a 4 °C até a adição da mistura do PCR.

Ao volume final de 20 μ L da RT foram acrescentados 30 μ L da mistura de PCR contendo tampão 1X, MgCl₂ 2 mM, platinum TAQ DNA polimerase 2,5 U, oligonucleotídeos positivo e negativo (0,2 μ M/cada) (todos os reativos usados foram da Invitrogen/San Diego/USA). Os oligonucleotídeos (tabelas 08 e 09) não foram adicionados à mistura por ocasião de sua preparação, mas a cada tubo de PCR após a adição da mistura e imediatamente antes de serem colocados no termociclador. O programa para amplificação consistiu de uma desnaturação prévia de 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 94 °C/30 s, hibridização a 55 °C/30 s e extensão a 72 °C/2,5 min, seguido de um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 min.

Tabela 08: Oligonucleotídeos usados na preparação dos fragmentos de DNA para seqüenciamento para VDEN2

Nome do Oligonucleotídeo	Sequência	Posição no genoma
RG5 (positivo)	5' -TTCAGGAAAGAGGCTAGGAGGATGCTGAATATC-3'	339-371 Capsídeo
RG125 (negativo)	5' -CTCATTGAAGTCGAGGCCCG-3'	1514-1495 Envelope
RG124 (positivo)	5' -TGTGCTATGTTACATGC-3'	1275-1292 Envelope
RG32 (negativo)	5' -AGTCTTGTTACTGAGCGGATTCCAC-3'	2602-2578 NS1

Tabela 09: Oligonucleotídeos usados na preparação dos fragmentos de DNA para seqüenciamento para VDEN3.

Nome do Oligonucleotídeo	Sequência	Posição no genoma
P278 (positivo)	5' -CGCGGATCCACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGG -3'	278-303
CP1559 (negativo)	5' -TGGTAACGGCAGGTCTAGGAACCATTG -3'	1585-1559
P992 (positivo)	5' -TGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACGG -3'	992-1017
CP2550 (nega)	5' -CGCGGATCCATGGCTGTTGCCACTCTTTTGGGGGA -3'	2550-2525

4.12- ISOLAMENTO DE DNA DO GEL DE AGAROSE

Utilizamos para a purificação de DNA do gel de agarose o sistema comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, USA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA contido no gel de agarose, após eletroforese, foi corado com brometo de etídio e visualizado sob a luz ultravioleta (360 nm). Com o auxílio de um estilete o pedaço de agarose com o DNA foi separado e colocado em um tubo de 1,5 mL juntamente com 3 volumes da solução QG para 1 volume do fragmento de gel (100 mg ~ 100 µL) e mantido a 50 °C por 10 min, após total dissolução do fragmento do gel foi adicionado 1 volume de isopropanol correspondente ao volume da amostra e agitada. A amostra foi colocada na coluna e centrifugada por 1 min a 14000 x g, descartou-se o fluido retirado da coluna, para lavagem da coluna foi colocado 0,75 mL da solução PE, e levado para centrifugação como anteriormente e o DNA eluído com 40 µl da solução EB. A passagem pela coluna foi facilitada por centrifugação a 14.000 x g (micro centrifuga Eppendorf) por 1 min.

4.13- SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

O cDNA foi seqüenciado em ciclos com o *Kit ABI PRISM Dye Terminator versão 3.0* (Applied Biosystems), que emprega o método de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977) marcados com diferentes fluoróforos para cada nucleotídeo na extremidade 3'.

Na mistura para cada reação de seqüenciamento continha 8 μL de *Terminator ready reaction mix*, 2 μL (100 ng) do produto de PCR, 3,5 pmoles de oligonucleotídeos (tabelas 10 e 11) e quantidade suficiente de água para um volume final de 20 μL . A amplificação foi realizada usando o programa que consistiu de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 min. O produto final foi precipitado com adição de 80 μL de isopropanol 75% (álcool isopropílico) (Merck). A mistura foi agitada, incubada por 20 min a temperatura ambiente e centrifugada a 14.000g por 25 min ao final retirar e desprezar o sobrenadante, e em seguida o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol a 70% e centrifugado a 12.000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e mantido à temperatura ambiente até o etanol evaporar por completo. O precipitado foi reconstituído em 5 μL de solução de formamida (Amresco) deionizada 5:1 com azul dextran/EDTA (Applied Biosystem), aquecido a 95 °C por 2 min e submetido à eletroforese no seqüenciador automático *ABI PRISM 377* (Applied Biosystems).

Tabela 10: Oligonucleotídeos usados no seqüenciamento de nucleotídeos para VDEN2

Nome do Primer	Sequência	Posição no genoma
RG5 (positivo)	5'-TTCAGGAAAGAGGCTAGGAGGATGCTGAATATC-3'	339-371 Capsídeo
RG118 (negativo)	5'-GCTTCCTCCTGAAACCC-3'	986-970 Envelope
BF8 (positivo)	5'-CTGTGTGACGACGATGGC-3'	1016-1033 Envelope
RG117 (negativo)	5'-GCATGTGAACATAGCACAGG-3'	1292-1273 Envelope
RG120 (negativo)	5'-CTCAGCCTGCACTTGAG-3'	1792-1776 Envelope
RG124 (positivo)	5'-TGTGCTATGTTACATGC-3'	1275-1292 Envelope
RG125 (negativo)	5'-CTCATTGAAGTCGAGGCCCG-3'	1514-1495 Envelope
RG122 (positivo)	5'-AAGGGCCATGCATACAGCACTC-3'	1699-1721 Envelope
RG119 (negativo)	5'-GCTCCCCCTCATTGTTG-3'	2155-2140 Envelope
BF12 (positivo)	5'-GCAGAACCTCCATTCCG-3'	2034-2050 Envelope
RG32 (negativo)	5'-AGTCTTGTTACTGAGCGGATTCCAC-3'	2602-2578 NS1

Tabela 11: Oligonucleotídeos usados no seqüenciamento de nucleotídeos para VDEN3

Nome do Primer	Sequência	Posição no genoma
P278 (positivo)	5'-CGCGGATCCACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGG-3'	278-303
CP788 (negativo)	5'-TCCAAGCTCCTTCAGATGACATCCA-3'	788-764
P722 (positivo)	5'-GCTCCCCATGTGGCATGGGACTGG-3'	722-746
P992 (positivo)	5'-TGGGTTGACGTGGTCTCGAGCACGG-3'	992-1017
CP1072 (negativo)	5'-CTGAAGCTCTATGTCCAGCGTGGG-3'	1072-1049
P1259 (positivo)	5'-GGCAAGGGAAGCTTGGTGACATGCGC-3'	1259-1284
CP1559 (negativo)	5'-TGGTAACGGCAGGTCTAGGAACCATG-3'	1585-1559
P1685 (positivo)	5'-CTAGGATCTCAAGAAGGAGCAATGCA-3'	1685-1710
CP1819 (negativo)	5'-CATCCCTTTGAGTTTCAATTTGTCCAT-3'	1819-1793
P1908 (positivo)	5'-AAGGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCC-3'	1908-1935
CP2190 (negativo)	5'-TCCAAGCTGTGTCTCCAGAATGGCCAT-3'	2190-2162
CP2550 (negativo)	5'-CGCGGATCCATGGCTGTTGCCACTCTTTTGGGGGA-3'	2550-2525

4.14 - ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS

Para montagem, alinhamento e análise de homologia foram utilizados os programas SEQMAN II, EDITSEQ e MEGALIGN do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTAR). Para análise de saturação de seqüência foi utilizado o programa DAMBE. Na montagem dos dendogramas e árvores filogenéticas foi

utilizado o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA, versão 2.1 – 2001 (Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. e Nei M.) usando o método de agrupamentos de vizinhos e PAUP, método da máxima parcimônia. Na análise foi colocada uma seqüência de um grupo externo para permitir o enraizamento da árvore, sendo que para VDEN2 usamos uma seqüência de VDEN3 e para VDEN3 usamos uma seqüência de VDEN2.

4.15 - QUANTIFICAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

As imagens capturadas foram analisadas pelo software Image Pro Plus (Nikon/Kodak) para quantificar o número de partículas fluorescentes por rodamina e DAPI. As imagens foram feitas usando objetiva de aumento 20X, para que pudéssemos ter um campo maior com células marcadas.

4.16 - ANÁLISE DE TAMANHO DE NÚCLEO

Os núcleos das células marcadas com DAPI foram medidos usando imagens capturadas com objetiva 60X e o programa de computador Kaleidagraph (www.sinergy.com) foi utilizado para medir o tamanho dos núcleos (anexo). Para análise de freqüências aplicamos o programa de computador ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Os parâmetros utilizados foram determinados pelo programa para objetiva de aumento 60x.

4.17 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Os meios 10X concentrado MEM/Earle, 199/Earles, 199/Hank (GIBCO), PBS (10X), tripsina solução estoque, Hepes 1M, fungizona (500 mg/mL), Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab) não inativado e glutamina 2% foram produzidos pela estrutura do Laboratório de Sarampo (LASA/BioManguinhos), seguindo as normas de controle de qualidade já estabelecidos pela instituição. No LATEV os reagentes de cultura celular eram aliquotados e estocados, prontos para o uso.

4.17.1- Meios para cultura de células

Meio 199 com sais de Earle completo (199/Earle completo)

Meio 199 com sais de Earle 10X (Invitrogen)	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0) (Merck)	2,5 mL ou 5 mL *
SFB inativado (Cultilab)	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml) (Schering)	1 mL
Fungizona (500mg/ml) (Invitrogen)	0,1 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

* Depende do tipo de sistema de cultura: 2,5 mL para sistema aberto (placas de cultura) ou sistema fechado (frascos de cultura).

Meio 199 com sais de Earle 2X concentrado (199/Earle 2X)

Meio 199 com sais de Earle 10X (Invitrogen)	20 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0) (Merck)	10 mL
SFB inativado (Cultilab)	10 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml) (Schering)	2 mL
Fungizona (500mg/ml) (Invitrogen)	0,2 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 com sais de Earle /CMC (199Earle/CMC)

Meio 199 com sais de Earle 10X (Invitrogen)	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0) (Merck)	5 mL
SFB inativado (Cultilab)	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml) (Schering)	1 mL
Fungizona (500mg/ml) (Invitrogen)	0,1 mL
CMC 3% (Sigma, St Louis, USA) q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Homogeneizar vigorosamente.

Meio 199 com sais de Earle / Hepes (199/Earle/Hepes)

Meio 199 com sais de Earle 10X (Invitrogen)	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0) (Merck)	0,5 mL
SFB inativado (Cultilab)	5 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1 mL
Fungizona (500mg/ml)	0,1 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio 199 com sais de Hanks completo (199/Hanks)

Meio 199 com sais de Hanks 10X (Invitrogen)	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	0,8 mL
SFB inativado (Cultilab)	2 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml) (Schering)	1 mL
Fungizona (500mg/ml) (Invitrogen))	0,1 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparar no momento do uso.

Meio MEM com sais de Earle completo (MEM/Earle completo)

Meio MEM com sais de Earle 10X (Invitrogen)	10 mL
NaHCO ₃ 4,4% (pH 7,0)	2,5 mL
SFB inativado (Cultilab)	10 mL
Sulfato de gentamicina (4 mg/ml)	1 mL
Glutamina (2%)	1 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Todo material estéril; preparo no momento do uso.

Meio L-15 (Leibovitz) completo (Invitrogen)

L-glutamina 2% (Invitrogen)	1 mL
Triptose fosfato 2% (Difco)	10 mL
SFB inativado (Cultilab)	10 mL
Solução de aminoácidos não essenciais (Cultilab)	1 mL
Penicilina/estreptomicina (10.000U/ml /10mg/ml) (Invitrogen)	1,5 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Bicarbonato de sódio 4,4% gaseificado (NaHCO₃)

NaHCO ₃ (Merck)	44 g
Vermelho de fenol 1% (1 mL
Água bidestilada q.s.p.	1000 mL

Instruções: Adição de gelo seco com agitação até a solução atingir pH 7,0 – 7,2; aliquotar em 20 ml e esterilizar por autoclave 121°C 15 min.

Verseno

Solução estoque 5%

EDTA (Sigma)	50 g
Vermelho de fenol 1% (Sigma)	0,1 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Instruções: Misturar e acertar o pH para 7,6 com NaOH 1N.

Solução de trabalho

Solução estoque de verseno	20 mL
Vermelho de fenol 1%	0,1 mL
PBS pH 7,6 q.s.p.	1000 mL

Instruções: Homogeneizar, ajustar pH para 7,6 com NaOH 1N. autoclavar 121°C /20 min.

Tripsina/verseno

Tripsina estoque (Invitrogen)	0,5 mL
Verseno	50 mL

Tripsina/PBS

Tripsina estoque (Invitrogen)	0,5 mL
PBS 1 X	50 mL

Soro Fetal Bovino (Cultilab)

Inativado a 56°C por 30 minutos. Aliquotado (50 mL) e armazenado à 4°C.

Sulfato de gentamicina (Garamicina, Schering)

1 ampola de Garamicina (2 mL) para 18 mL de água bidestilada estéril.

PBS (salina tamponada com fosfato)

NaCl 5M (Merck)	30 mL
Na ₂ HPO (Merck)	32 mL
NaH ₂ PO (Merck)	8 mL
Água bidestilada q.s.p.	1000 mL

Carboximetilcelulose (CMC) 3%

CMC (Sigma)	3 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: homogeneização por agitação vigorosa. Autoclavar 121°C /20 min;

Agarose 1%

Agarose (Tipo I-Sigma, St Louis, USA)	1 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Instruções: Misturar, autoclavar (121°C por 20 min) e estocar a 4°C.

Formaldeído 10%

Formaldeído 37% (Merck)	1000 mL
Água destilada	2700 mL
Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.	

Cristal Violeta**Solução Estoque (2%)**

Cristal Violeta (Sigma)	10 g
Metanol (Merck)	100 mL
Água destilada q.s.p.	500mL

Solução de Uso (0,04%)

Cristal Violeta estoque	20 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Instruções: Preparar e estocar a temperatura ambiente.	

Cloreto de Sódio (NaCl) 5M

Cloreto de sódio (Sigma)	292 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL
Instruções: Preparar e estocar a 4°C.	

BSA 40 mg/mL

Soro albumina bovina (Sigma, St Louis, USA)	400 mg
Água deionizada estéril q.s.p.	10 mL
Instruções: Preparar e estocar a 4°C.	

Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Tris (Sigma)	27,23 g
Água bidestilada q.s.p.	150 mL
Instruções: Ajustar com HCl 1N até pH 8,8. Estocar a 4°C.	

Glicose 30%

Glicose (Merck)	30 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL
Filtrar	

PBS 10X

NaCl (Merck)	40 g
Na ₂ HPO ₄ (Merck)	15 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	2 g
KCl (Merck)	0,45 g
Água bidestilada q.s.p.	1000 mL
Autoclavar ou filtrar.	

DMEM F-12 (Completo)

DMEM F-12	
Glicose 30%	20 mL
Glutamina 200 mM	100 mL
Penicilina/Estreptomicina (10^4 U/L)	1 mL
Fungizona (2,5 mg/mL)	1 mL
bicarbonato de sódio NaHCO ₃	1,2 g
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL
Filtrar e Guardar na geladeira.	
Obs.: Se o DMEM-F12 não tiver Hepes, acrescentar em 1 litro de meio 3,6 g/l.	

Meio DMEM-F12 com 10% SFB

DMEM F-12 completo	90 mL
SFB	10 mL

Meio Neurobasal/B27 (Completo)

Meio Neurobasal	10 mL
Suplemento B-27	50 mL
Fungizona (2,5 mg/mL)	10 μ L
Penicilina/Estreptomicina (10^4 U/L)	10 μ L
Glutamina 200 mM	100 μ L

N-propil galacto

N-propil (Sigma)	5 g
Tampão fosfato 0,1 M pH 8,0	20 mL
Glicerol (Sigma)	80 mL
Aquecer a +/- 40 °C de 10 – 15 min. Adicionar gradativamente o glicerol.	

PBS/Glicose

PBS 10X	10 mL
Glicose 30%	3 mL
Água MilliQ q.s.p.	100 mL

Poli-ornitina 1x:

Poli-ornitina (Sigma)	120 μ L
Água	12 mL

Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído	2 g
Sacarose	2 g
PBS q.s.p.	50 mL
Aqueça o PBS até 50°C no máximo.	

Soro Albumina Bovina (BSA 5%)

BSA (Sigma)	1,25 g
PBS	25 mL

PBS triton 0.2%

Triton X 100	0,1 g
PBS	50 mL

PBS/BSA 5%

BSA	2,5 g
PBS	50 mL

PBS/BSA 1%

BSA	0,5 g
PBS	50 mL

4.17.2 - Soluções para Biologia Molecular

Gel de Agarose 0.8%:

TAE 1X	20 mL
Agarose	0,8 g
Água milliq q.s.p.	100 mL

Gel de Agarose 2%:

TBE 10X	10 mL
Agarose	2 g
Água milliq q.s.p.	100 mL

Tampão TAE 50x

	Para 1 litro
Tris.Base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M	100 ml
Água destilada q.s.p.	

TBE 10 x

TBE	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA	7,44 g
Água milliq q.s.p.	1000 mL

Tampão de Reação de Sequenciamento 5X

Tris.HCl	400 mM
MgCl ₂	10 mM
Água milliq q.s.p.	100 mL
Diluir o tampão para 2,5X antes de usá-lo.	

Reação de Sequenciamento

Mistura de Reação <i>Terminator Ready</i>	4 µL
Tampão de reação de Sequenciamento 2,5X	4 µL
DNA - Produto de PCR	1 -100 ng
Primer	3,2 pmol
Água milliq q.s.p.	20 µL

5- RESULTADOS

Parte I – Caracterização Molecular do VDEN

5.1 - AMOSTRAS DOS VÍRUS VDEN USADOS NO ESTUDO.

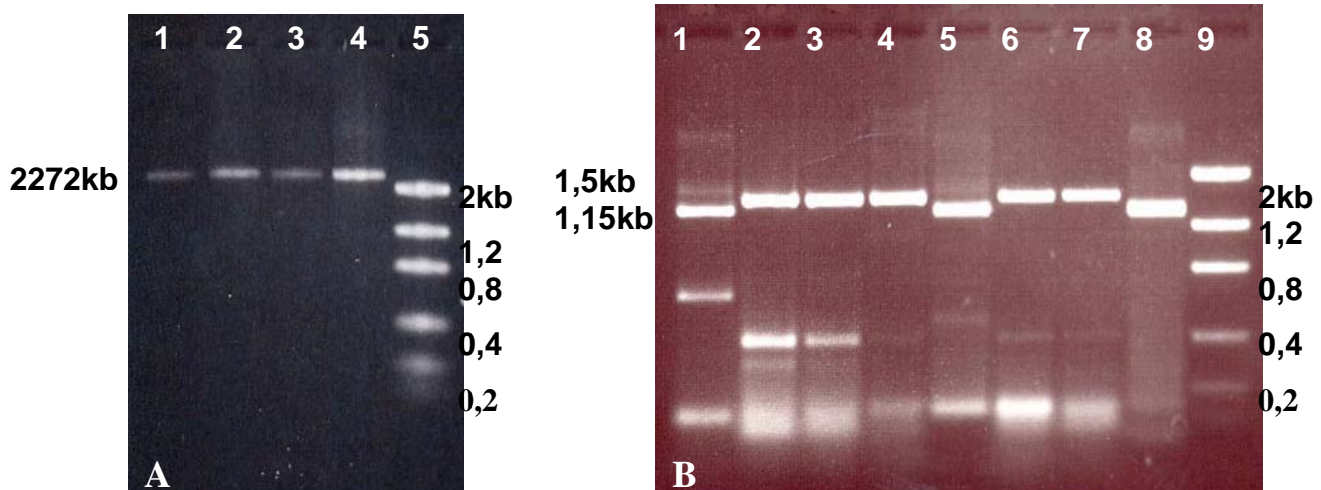
As amostras do estudo foram isoladas em células C6/36 de *Aedes albopictus* e sua identidade confirmada por IFI, utilizando anticorpos monoclonais para os quatro sorotipos de VDEN. Os resultados mostraram que os vírus isolados pertenciam aos sorotipos VDEN 2 e 3. Todas elas foram submetidas a RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 1992) para confirmação dos resultados do teste de IFI (tabela 12).

Tabela 12: Resultados de IFI e RT-PCR para caracterização do sorotipo das amostras isoladas no estudo.

Amostra	Cultura celular	IFI	RT-PCR
Bel61082 (H623360)	Fluído de cultura celular Soro	VDEN2	VDEN2 VDEN2
Bel63650 (H628243)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
Cea2440 (H527541)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
Cea2462 (H527821)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
Cea2463 (H527822)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
GOI4191 (H666426)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
MIG1269 (H533198)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
RGN53 (H506347)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
ROR1811 (H547176)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
ROR1812 (H547177)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
TOC2016 (H508744)	Fluído de cultura celular	VDEN2	VDEN2
AM2394 (H657637)	Soro	VDEN3	VDEN3
Bel70617 (H652477)	Soro	VDEN3	VDEN3
Bel73316 (H668518)	Fluido de cultura celular	VDEN3	VDEN3
CEA4739 (H656814)	Soro	VDEN3	VDEN3
GOI099 (H666425)	Fluído de cultura celular	VDEN3	VDEN3
GOI100 (H666426)	Fluído de cultura celular	VDEN3	VDEN3
MTO3103 (H650477)	Fluído de cultura celular	VDEN3	VDEN3
RGN576 (H665993)	Fluído de cultura celular	VDEN3	VDEN3
ROR3832 (H651502)	Soro	VDEN3	VDEN3
ROR3845 (H651515)	Fluído de cultura celular	VDEN3	VDEN3

5.2- SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO DA REGIÃO ESTRUTURAL DOS VÍRUS VDEN2 E VDEN3 .

As amostras do estudo foram submetidas a RT-PCR para amplificação de fragmentos correspondentes à região estrutural do genoma viral. Na figura 10A e B vemos exemplos dos fragmentos amplificados para as amostras VDEN3 e VDEN2 e 3, respectivamente. Para as amostras de VDEN2 foram produzidos dois fragmentos, um de 1149 correspondente ao gene da proteína C/prM/M/E que podem ser observados na Figura 10B (Faixas 1,5 e 8) e outro de 1303 kb que corresponde ao gene da proteína na E/NS1 (dados não mostrados). Os fragmento amplificados para VDEN2 mostrados na figura 10B possuem pesos moleculares com cerca de 1,15 kb e foram sintetizados com os oligonucleotídeos RG5 (positivo) e RG125 (negativo). Os fragmentos de 1,5 kb do vírus VDEN3 (faixas 2, 3, 4, 6 e 7) foram sintetizados com os oligonucleotídeos P992 (positivo) e CP2550 (negativo), este fragmento foi usado para completarmos o sequenciamento de algumas amostras virais, que não poderam ser totalmente sequenciadas utilizando o fragmento de 2,2 kb (Figura 10B).



Figuras 10. A - gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com amostras de VDEN3. Faixa: 1- GOI5100, 2- GOI5099, 3- MTO3103, 4- AM2394 e 5- Peso molecular "Low DNA mass" B- gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com amostras de VDEN2 e 3, faixas: 1- RGN53 (VDEN2), 2- GOI5100 (VDEN3), 3- ROR3832 (VDEN3), 4- ROR3845 (VDEN3), 5-CEA2440 (VDEN2), 6- RGN576 (VDEN3), 7- Bel70617 (VDEN3), 7- Bel73316 (VDEN3), 8- MIG1269 (VDEN2) e 9- Padrão de peso molecular "Low DNA mass" (Invitrogen).

As amostras VDEN2 e VDEN3 foram seqüenciadas utilizando conjuntos de 13 e 10 oligonucleotídeos, respectivamente. Os cromatogramas gerados foram analisados com o uso do programa SEQMAN (DNASTAR). A análise baseou-se

na formação de fragmentos contíguos, que se sobrepuseram através dos oligonucleotídeos específicos para cada vírus gerando a partir desta análise uma seqüência consenso para cada uma das amostras. Em seguida as seqüências obtidas foram traduzidas utilizando o programa EDITSEQ (DNASTAR) e submetidas ao banco de dados GENBANK ([genbank/ncbi.nlm.nih.gov](http://genbank.ncbi.nlm.nih.gov)).

5.3- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E ANÁLISE DE IDENTIDADE

O alinhamento das seqüências foi feito no programa Megalign (DNASTAR) usando o método Clustal W que possibilitou a análise de homologia e do percentual de identidade e divergência entre as amostras analisadas. As análises de DENV2 apresentaram percentual de identidade nucleotídica que variou de 89,0 a 99,9% quando comparados entre si e com 16 seqüências já registradas no banco de dados genbank/ncbi.nlm.nih.gov (Tabela 13).

A figura 11 e tabela 14 mostram que encontramos substituições de aminoácidos nas amostras estudadas em relação ao protótipo, vírus Jamaica (Jam83). Quando comparamos as 11 sequencias brasileiras com a do genótipo Jam83 foram encontradas 12 alterações de aminoácidos no gene prM/M/E, ocorrendo seis mudanças de aminoácidos no gene prM, sendo os resíduos 58 (P→Q) e 68 (C→R) os que apresentaram alterações significativas em seu caráter bioquímico, e conseqüentemente em sua atividade biológica. No gene E ocorreram 12 alterações de aminoácidos e destas apenas cinco substituições foram significativas, com mudança de caráter e carga, encontradas nas posições E208 (V→E), 262 (T→K), 273 (S→L), 274 (S→A) e 405 (T→P). Os resíduos E262, 273 e 274 estão localizados no domínio II envolvidos na dimerização dessa proteína e rearranjo estruturais quando em pH ácido. O resíduo 405 está localizado na região seguinte ao domínio III e não faz parte do ectodomínio desta proteína (Rey *et al.*, 1995) (Figura 11 e tabela 14).

Na tabela 15 observamos que há uma maior taxa de transição (97 pares de nucleotídeos) do que transversão (15 pares de nucleotídeos) e que a relação entre essas duas taxas se apresenta mais elevada na primeira posição do códon (15 pares de nucleotídeos). A média de transição entre os vírus VDENV2 analisados na 1ª base do códon foi de 15 pares de nucleotídeos e na 3ª base foi

de 78 pares de nucleotídeos mostrando que ocorreu uma elevada taxa de substituição sinônima, levando uma alta taxa de mutações silenciosas.

	C	prM	10	20	30	40
M20558-Jamaica-1983	IMLIPTAMAF	HLTTRNGEPH	MIVGRQEKGK	SLLFKTEDGV	NMCTLMAIDL	
44-2_-_Brasil_-_1990K...
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994G.....
cea2463-BR-1994	...T.....G.....
GOI4191-BR-2002G.....
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994G.....
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996V...S.....M..
toc2016-BRASIL-1991	..Q.....
AF100466_-_VenezuelaV..SI.....M..
M32941-Nova_Guine_C-1944V...S.....M..
af100464-Tailandia-1996V...SI.....M..
AF100459_-_Tailandia-1994V...SI.....M..
AF100460_-_Tailandia-1994V...SI.....M..
AF100461_-_Tailandia-1995V...SI.....M..
af100462-Tailandia-1995V...S.....M..
af100463-Tailandia-1996V...SI.....M..
AF100469_-_Mexico-1992V...S.....K..TM..
af100467-Peru-1995	?...V...S.....K..TM..
af100468-Peru-1996V...S.....K..TM..
L04561_-_Mexico_-_1983	..I...V.P.I.E...K..TM..
D00345_-_Tailandia_-_1980V...S.....M..
U3195_1_-_Tailandia_-_1993V...SI.....M..
		50	60	70	80	90
M20558-Jamaica-1983	GELCEDTITY	KCPLLRQNEP	EDIDWCNST	STWVTYGTCA	TTGEHRREKR	
44-2_-_Brasil_-_1990T
bel61082-Brasil-2001T
bel63650-Brasil-2002T
cea2440-BR-1994T
cea2462-BR-1994R...T
cea2463-BR-1994P.D.T
GOI4191-BR-2002T
MIG1269-Brasil-1995T
RGN53-BR-1994T
ROR1811-BR-1996T
ror1812-BR-1996F.K.T
toc2016-BRASIL-1991T
AF100466_-_VenezuelaT
M32941-Nova_Guine_C-1944FT
af100464-Tailandia-1996T
AF100459_-_Tailandia-1994T
AF100460_-_Tailandia-1994T
AF100461_-_Tailandia-1995T
af100462-Tailandia-1995T
af100463-Tailandia-1996T
AF100469_-_Mexico-1992F.K.T
af100467-Peru-1995F.K.T
af100468-Peru-1996F.K.T
L04561_-_Mexico_-_1983F.K.H...S...T
D00345_-_Tailandia_-_1980T
U3195_1_-_Tailandia_-_1993
		100	110	120	140	
M20558-Jamaica-1983	SVALVPHVGM	GLETRTETWM	SSEGAWKHVQ	RIETWILRHP	GFTIMAAILA	
44-2_-_Brasil_-_1990A.....
bel61082-Brasil-2001A.....
bel63650-Brasil-2002A.....
cea2440-BR-1994A.....
cea2462-BR-1994A.....
cea2463-BR-1994A.....
GOI4191-BR-2002A.....

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

```

MIG1269-Brasil-1995      ..... A.....
RGN53-BR-1994           ..... P..... A.....
ROR1811-BR-1996        .G..... A.....
ror1812-BR-1996        ..... A.....
toc2016-BRASIL-1991    ..... A.....
AF100466_-Venezuela    ..... A.....
M32941-Nova_Guine_C-1944 ..... A.....
af100464-Tailandia-1996 ..... A.....
AF100459_-Tailandia-1994 ..... A.....
AF100460_-Tailandia-1994 ..... A.....
AF100461_-Tailandia-1995 ..... A.....
af100462-Tailandia-1995 ..... A.....
af100463-Tailandia-1996 ..... A.....
AF100469_-Mexico-1992  ..... A.....
af100467-Peru-1995     ..... A.....
af100468-Peru-1996     ..... A.....
L04561_-Mexico_-1983   ..... F.....
D00345_-Tailandia_-1980 ..... A..... I.....
U3195_1_-Tailandia_-1993 ..... A.....

```

```

                                ENV
                                ↑
                                10
                                20
M20558-Jamaica-1983      YTIGTTHFQR ALIFILLTAV APSMTMRCIG ISNRDFVEGV SGGSWVDIVL
44-2_-Brasil_-1990     .....
bel61082-Brasil-2001    .....
bel63650-Brasil-2002    ..... M.....
cea2440-BR-1994         .....
cea2462-BR-1994         .....
cea2463-BR-1994         .....
GOI4191-BR-2002         .....
MIG1269-Brasil-1995     .....
RGN53-BR-1994           .....
ROR1811-BR-1996        .....
ror1812-BR-1996        .....
toc2016-BRASIL-1991    .....
AF100466_-Venezuela    .....
M32941-Nova_Guine_C-1944 .....
af100464-Tailandia-1996 .....
AF100459_-Tailandia-1994 .....
AF100460_-Tailandia-1994 .....
AF100461_-Tailandia-1995 .....
af100462-Tailandia-1995 .....
af100463-Tailandia-1996 .....
AF100469_-Mexico-1992  ..... V..... I.....
af100467-Peru-1995     ..... V..... I.....
af100468-Peru-1996     ..... V..... I.....
L04561_-Mexico_-1983   ..... V..... I.....
D00345_-Tailandia_-1980 .....
U3195_1_-Tailandia_-1993 .....

```

```

                                30          40          50          60          70
M20558-Jamaica-1983      EHGSCVTMA KNKPTLDFEL IKTEAKQPAT LRKYCIEAKL TTTTESRCP
44-2_-Brasil_-1990     .....
bel61082-Brasil-2001    .....
bel63650-Brasil-2002    .....
cea2440-BR-1994         .....
cea2462-BR-1994         ..... L.....
cea2463-BR-1994         ..... L.....
GOI4191-BR-2002         .....
MIG1269-Brasil-1995     .....
RGN53-BR-1994           .....
ROR1811-BR-1996        ..... G..... LG.....
ror1812-BR-1996        ..... L.....
toc2016-BRASIL-1991    .....
AF100466_-Venezuela    .....
M32941-Nova_Guine_C-1944 .....
af100464-Tailandia-1996 ..... D.....

```

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

AF100459_-Tailandia-1994
AF100460_-Tailandia-1994
AF100461_-Tailandia-1995
af100462-Tailandia-1995
af100463-Tailandia-1996
AF100469_-Mexico-1992D...
af100467-Peru-1995D...
af100468-Peru-1996D...
L04561_-Mexico_-1983S.D...
D00345_-Tailandia_-1980
U3195_1_-Tailandia_-1993
	80	90	100	110	120
M20558-Jamaica-1983	TQGEPSLNEE	QDKRFLCKHS	MVDRGWGNGC	GLFGKGGIVT	CAMFTCKKNM
44-2_-Brasil_-1990I...
bel61082-Brasil-2001I...
bel63650-Brasil-2002I...
cea2440-BR-1994I...
cea2462-BR-1994I...
cea2463-BR-1994I...
GOI4191-BR-2002I...
MIG1269-Brasil-1995I...
RGN53-BR-1994I...
ROR1811-BR-1996I...
ror1812-BR-1996I...
toc2016-BRASIL-1991I...
AF100466_-VenezuelaI...
M32941-Nova_Guine_C-1944V...
af100464-Tailandia-1996K..	...V...
AF100459_-Tailandia-1994K..	...V...
AF100460_-Tailandia-1994K..	...V...
AF100461_-Tailandia-1995K..	...V...
af100462-Tailandia-1995K..	...V...
af100463-Tailandia-1996K..	...V...
AF100469_-Mexico-1992T...	...V...
af100467-Peru-1995T...	...V...
af100468-Peru-1996T...	...V...
L04561_-Mexico_-1983T...	...V...I...
D00345_-Tailandia_-1980V...
U3195_1_-Tailandia_-1993K..	...V...
	130	140	150	160	170
M20558-Jamaica-1983	EGKVVLPENL	EYTIIVITPHS	GEEHAVGNDT	GKHGKEIKIT	PQSSITEAEL
44-2_-Brasil_-1990E...
bel61082-Brasil-2001E...
bel63650-Brasil-2002E...
cea2440-BR-1994E...
cea2462-BR-1994E...
cea2463-BR-1994E...
GOI4191-BR-2002	K...Q...E...
MIG1269-Brasil-1995E...
RGN53-BR-1994E...
ROR1811-BR-1996E...
ror1812-BR-1996E...
toc2016-BRASIL-1991	K...Q...F
AF100466_-Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944	K...Q...
af100464-Tailandia-1996	...I.Q...	...V...V...
AF100459_-Tailandia-1994	...I.Q...	...V...V...
AF100460_-Tailandia-1994	...I.Q...	...V...V...
AF100461_-Tailandia-1995	...I.Q...	...V...V...
af100462-Tailandia-1995	...I.Q...	...V...V...
af100463-Tailandia-1996	...I.Q...	...V...V...
AF100469_-Mexico-1992	...I.Q...	...V...V...
af100467-Peru-1995	...I.Q...	...V...V...
af100468-Peru-1996	...I.Q...	...V...V...

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

L04561_-_Mexico_-_1983QK..W K.....I..V...D...
D00345_-_Tailandia_-_1980Q.....V.....V.....V.....
U3195_1_-_Tailandia_-_1993	...I.Q.....V.....V.....V.....
	180	190	200	210
M20558-Jamaica-1983	TGYGTVTMEC	SPRTGLDFNE	MVLLQMEDKA	WLVHRQWFLD
44-2_-_Brasil_-_1990E..
bel61082-Brasil-2001E..
bel63650-Brasil-2002E..
cea2440-BR-1994E..
cea2462-BR-1994E..
cea2463-BR-1994E..E.....
GOI4191-BR-2002GE..
MIG1269-Brasil-1995E..
RGN53-BR-1994E..
ROR1811-BR-1996	I.....N..
ror1812-BR-1996	I.....N..
toc2016-BRASIL-1991E..
AF100466_-_VenezuelaE..
M32941-Nova_Guine_C-1944N..
af100464-Tailandia-1996N..
AF100459_-_Tailandia-1994N..
AF100460_-_Tailandia-1994N..
AF100461_-_Tailandia-1995N..
af100462-Tailandia-1995N..
af100463-Tailandia-1996N..
AF100469_-_Mexico-1992
af100467-Peru-1995
af100468-Peru-1996
L04561_-_Mexico_-_1983N..	R.....
D00345_-_Tailandia_-_1980N..
U3195_1_-_Tailandia_-_1993N..
	230	240	250	260
M20558-Jamaica-1983	TQGSNWIQKE	TLVTFKNPHA	KKQDVVVLGS	QEGAMHTALT
44-2_-_Brasil_-_1990A.....
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994K.....
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994A..
GOI4191-BR-2002L..
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996K.F.
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944
af100464-Tailandia-1996
AF100459_-_Tailandia-1994
AF100460_-_Tailandia-1994
AF100461_-_Tailandia-1995
af100462-Tailandia-1995
af100463-Tailandia-1996
AF100469_-_Mexico-1992
af100467-Peru-1995
af100468-Peru-1996
L04561_-_Mexico_-_1983	...RK.....R..T.....
D00345_-_Tailandia_-_1980
U3195_1_-_Tailandia_-_1993R.....

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

	280	290	300	310	320
M20558-Jamaica-1983	NLLFTGHLK	RLRMDKLQLK	GMSYSM	CTGK	FKIVKEIAET QHGTIVIRVQ
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994R.....
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002S.....
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944V.....
af100464-Tailandia-1996V.....
AF100459_-_Tailandia-1994V.....
AF100460_-_Tailandia-1994V.....
AF100461_-_Tailandia-1995V.....
af100462-Tailandia-1995V.....
af100463-Tailandia-1996V.....
AF100469_-_Mexico-1992
af100467-Peru-1995
af100468-Peru-1996
L04561_-_Mexico_-_1983K.....V.....K
D00345_-_Tailandia_-_1980V.....
U3195_1_-_Tailandia_-_1993V.....

	330	340	350	360	370
M20558-Jamaica-1983	YEGDGSCKI	PFEIMDLKLR	HVLGRLITVN	PIVTEKDSPV	NIEAEPFPGD
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944
af100464-Tailandia-1996V.....Y.....V.....
AF100459_-_Tailandia-1994V.....Y.....
AF100460_-_Tailandia-1994V.....Y.....
AF100461_-_Tailandia-1995Y.....
af100462-Tailandia-1995Y.....
af100463-Tailandia-1996V.....Y.....V.....
AF100469_-_Mexico-1992
af100467-Peru-1995
af100468-Peru-1996
L04561_-_Mexico_-_1983T.....T.....L.....
D00345_-_Tailandia_-_1980
U3195_1_-_Tailandia_-_1993R.....Y.....

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

	380	390	400	410	420
M20558-Jamaica-1983	SYIIIGVEPG	QLKLNWFKKG	SSIGQMFETT	MRGAKRMAIL	GDTAWDFGSL
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002	P
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944	I
af100464-Tailandia-1996
AF100459_-_Tailandia-1994
AF100460_-_Tailandia-1994
AF100461_-_Tailandia-1995
af100462-Tailandia-1995
af100463-Tailandia-1996
AF100469_-_Mexico-1992	D
af100467-Peru-1995	D
af100468-Peru-1996	A	D
L04561_-_Mexico_-_1983	D	A
D00345_-_Tailandia_-_1980
U3195_1_-_Tailandia_-_1993

	430	440	450	460	470
M20558-Jamaica-1983	GGVFTSIGKA	LHQVFGAIYG	AAFSGVSWTM	KILIGVIITW	IGMNSRSTSL
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944
af100464-Tailandia-1996
AF100459_-_Tailandia-1994
AF100460_-_Tailandia-1994
AF100461_-_Tailandia-1995
af100462-Tailandia-1995
af100463-Tailandia-1996
AF100469_-_Mexico-1992	M
af100467-Peru-1995
af100468-Peru-1996
L04561_-_Mexico_-_1983
D00345_-_Tailandia_-_1980
U3195_1_-_Tailandia_-_1993

	480	490
M20558-Jamaica-1983	SVSLVLVGVV	TLYLGAMV
44-2_-_Brasil_-_1990	V
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Continua→

```

MIG1269-Brasil-1995      .....
RGN53-BR-1994           .....
ROR1811-BR-1996         .....
ror1812-BR-1996         .....
toc2016-BRASIL-1991     .....
AF100466_-Venezuela     .....
M32941-Nova_Guine_C-1944 .....V..
af100464-Tailandia-1996 .....I. ....V..
AF100459_-Tailandia-1994 .....I. ....V..
AF100460_-Tailandia-1994 .....I. ....V..
AF100461_-Tailandia-1995 .....I. ....V..
af100462-Tailandia-1995 .....I. ....V..
af100463-Tailandia-1996 .....I. ....V..
AF100469_-Mexico-1992   .....I. ....V..
af100467-Peru-1995     .....I. ....V..
af100468-Peru-1996     .....I. ....V..
L04561_-Mexico_-1983    .....?...
D00345_-Tailandia_-1980 .....I. ....V..
U3195_1_-Tailandia_-1993 .....I. ....V..

```

Figura 11: Alinhamento de 27 seqüências de aminoácidos (AA) do gene C/prM/M/E do vírus VDEN2. Os aminoácidos destacados em cores correspondem aos domínios I, II e III da proteína E. A marcação verde corresponde ao domínio I, em amarelo domínio II e em cinza domínio III.

Tabela 13: Análise de Identidade e Divergência nucleotídica das seqüências parciais da prM/E de VDEN2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1		92.7	92.8	92.8	92.4	93.1	92.7	90.4	90.5	90.5	89.8	99.1	98.8	98.5	98.7	98.4	93.7	98.1	95.5	98.4	97.6	99.1	98.6	97.7	93.1	97.9	94.2	1
2	7.9		99.6	99.6	98.7	98.5	100.0	90.5	90.5	90.5	89.0	92.9	92.8	92.3	92.8	92.4	97.5	93.1	94.8	93.0	93.3	92.9	92.8	92.4	98.5	93.4	96.2	2
3	7.8	0.4		100.0	98.7	98.6	99.6	90.3	90.5	90.5	88.9	93.0	92.9	92.4	92.9	92.5	97.6	93.2	94.9	93.1	93.4	93.0	92.8	92.5	98.6	93.5	96.3	3
4	7.7	0.5	0.0		98.6	98.6	99.6	90.3	90.5	90.5	88.9	93.1	93.0	92.5	92.9	92.5	97.5	93.2	94.9	93.1	93.4	93.0	92.9	92.5	98.6	93.5	96.3	4
5	8.2	1.4	1.4	1.4		98.3	98.7	90.3	90.4	90.4	88.9	92.7	92.6	92.1	92.5	92.1	97.0	92.8	94.4	92.7	92.9	92.6	92.5	92.0	98.5	93.1	95.8	5
6	7.4	1.5	1.4	1.5	1.8		98.5	90.6	90.7	90.7	89.3	93.3	93.2	92.7	93.1	92.8	97.9	93.5	95.3	93.5	93.8	93.3	93.1	92.8	98.7	93.8	96.7	6
7	7.9	0.0	0.4	0.5	1.4	1.5		90.5	90.5	90.5	89.0	92.9	92.8	92.3	92.8	92.4	97.5	93.1	94.8	93.0	93.3	92.9	92.8	92.4	98.5	93.4	96.2	7
8	10.5	10.5	10.7	10.6	10.7	10.3	10.5		98.1	98.1	95.2	90.3	90.2	89.7	90.0	89.6	90.6	90.2	92.0	90.5	91.2	90.2	89.9	89.8	90.3	90.5	91.1	8
9	10.4	10.4	10.4	10.4	10.5	10.2	10.4	1.9		99.9	94.7	90.4	90.2	89.8	90.0	89.7	90.6	90.3	91.9	90.4	91.1	90.2	90.0	89.9	90.3	90.6	91.0	9
10	10.4	10.5	10.5	10.5	10.6	10.2	10.5	2.0	0.0		94.7	90.4	90.2	89.8	90.0	89.7	90.6	90.3	91.9	90.4	91.1	90.2	90.0	89.9	90.3	90.6	91.0	10
11	11.1	12.1	12.2	12.2	12.3	11.7	12.1	4.9	5.5	5.5		89.9	89.8	89.3	89.6	89.2	89.5	89.8	91.1	90.2	90.8	89.7	89.5	89.5	89.2	90.2	90.2	11
12	0.9	7.6	7.5	7.4	7.9	7.1	7.6	10.6	10.5	10.6	11.0		99.6	99.2	99.3	99.2	93.9	98.9	95.7	99.0	98.0	99.8	99.4	98.1	93.4	98.7	94.4	12
13	1.2	7.7	7.6	7.5	8.0	7.2	7.7	10.8	10.7	10.8	11.1	0.4		99.0	99.0	98.9	93.8	98.8	95.7	98.8	97.7	99.5	99.1	97.8	93.3	98.9	94.4	13
14	1.5	8.2	8.1	8.1	8.5	7.8	8.2	11.3	11.2	11.3	11.7	0.8	1.1		99.0	99.3	93.3	98.4	95.1	98.5	97.4	99.1	99.1	97.5	92.8	98.0	93.9	14
15	1.4	7.7	7.6	7.6	8.0	7.3	7.7	11.0	10.9	11.0	11.3	0.8	1.1	1.1		99.2	93.8	98.6	95.5	98.9	97.8	99.1	99.7	97.9	93.2	98.1	94.4	15
16	1.7	8.2	8.1	8.0	8.5	7.7	8.2	11.4	11.3	11.4	11.8	0.9	1.2	0.8	0.8		93.3	98.4	95.1	98.4	97.5	99.0	99.3	97.6	92.8	97.9	93.9	16
17	6.7	2.6	2.5	2.6	3.1	2.2	2.6	10.3	10.2	10.3	11.5	6.5	6.6	7.2	6.6	7.1		93.9	95.9	94.0	94.3	93.8	93.6	93.4	97.6	94.2	97.4	17
18	1.9	7.4	7.3	7.2	7.7	6.9	7.4	10.7	10.6	10.7	11.1	1.1	1.2	1.6	1.5	1.7	6.4		96.1	98.2	97.8	98.8	98.6	97.7	93.5	99.1	94.6	18
19	4.7	5.4	5.3	5.3	5.9	4.9	5.4	8.7	8.7	8.8	9.5	4.5	4.5	5.1	4.7	5.1	4.3	4.0		96.0	97.1	95.7	95.4	95.6	95.1	96.4	96.8	19
20	1.7	7.5	7.4	7.4	7.8	7.0	7.5	10.5	10.5	10.5	10.6	1.1	1.3	1.6	1.1	1.6	6.3	1.9	4.2		97.5	98.8	98.9	97.4	93.6	98.0	94.8	20
21	2.5	7.2	7.1	7.0	7.6	6.6	7.2	9.6	9.6	9.7	9.9	2.0	2.3	2.6	2.2	2.5	6.0	2.3	3.0	2.6		98.0	97.7	98.4	93.8	97.7	95.1	21
22	1.0	7.6	7.5	7.5	7.9	7.2	7.6	10.8	10.7	10.8	11.2	0.2	0.6	1.0	0.9	1.0	6.6	1.2	4.5	1.2	2.1		99.3	98.0	93.3	98.5	94.4	22
23	1.4	7.7	7.7	7.6	8.1	7.4	7.7	11.1	11.0	11.0	11.5	0.6	0.9	0.9	0.4	0.8	6.8	1.4	4.8	1.2	2.4	0.8		97.7	93.2	98.2	94.2	23
24	2.4	8.2	8.1	8.0	8.6	7.7	8.2	11.2	11.1	11.1	11.4	2.0	2.3	2.5	2.2	2.5	7.0	2.3	4.5	2.7	1.6	2.0	2.3		92.8	97.5	93.9	24
25	7.3	1.5	1.4	1.5	1.6	1.3	1.5	10.7	10.6	10.7	11.8	7.1	7.2	7.7	7.2	7.7	2.5	6.9	5.1	6.8	6.6	7.1	7.3	7.7		93.8	96.5	25
26	2.2	7.1	7.0	6.9	7.4	6.6	7.1	10.4	10.3	10.3	10.6	1.4	1.2	2.1	1.9	2.1	6.1	1.0	3.8	2.0	2.4	1.5	1.9	2.5	6.6		94.8	26
27	6.2	3.9	3.8	3.8	4.4	3.4	3.9	9.7	9.8	9.8	10.6	5.9	5.9	6.4	5.9	6.4	2.7	5.7	3.3	5.5	5.1	5.9	6.1	6.4	3.6	5.5		27

Legenda: 1- 44/2, 2- AF100464 Tailândia, 3- AF100459 Tailândia, 4- AF100460 Tailândia, 5- AF100461 Tailândia, 6- AF100462 Tailândia, 7- AF100463 Tailândia, 8- AF100469 México, 9- Af100467 Peru, 10- AF100468 Peru, 11- LO4561 México, 12- Bel61082 Brasil, 13- Bel63650 Brasil, 14- Cea2440 Brasil, 15- Cea2462 Brasil, 16- Cea2463 Brasil, 17- D00345 Tailândia, 18- GoI4191 Brasil, 19- M32941 NGC, 20- M20558 Jamaica, 21- ROR1812 Brasil, 22- MIG1269 Brasil, 23- RGN53 Brasil, 24- ROR1811 Brasil, 25- U31951 Tailândia, 26- TOC2016 Brasil, 27- U87411 Tailândia.

Tabela 14: Diferenças de aminoácidos entre as seqüências prM/E do vírus VDEN2 brasileiras comparadas com a cepa Jam83

Gene	Posição ^a	AMOSTRAS DE VDEN2											Jam83 ^c	
		44/2 ^b (FD)	Bel61082 (Encefalite)	Bel63650 (FD)	Cea2440 (FHD)	Cea2462 (FD)	Cea2463 (FD)	Goi4191 (FD)	Ror1811 (FD)	Ror1812 (FD)	Mig1269 (FD)	RGN53 (FD)		Toc2016 (FD)
prM	14	V	V	V	V	G	G	G	V	V	V	G	V	V
	28	K	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	58	Q	Q	Q	Q	Q	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	60	E	E	E	E	E	D	E	E	E	E	E	E	E
	68	C	C	C	C	R	C	C	C	C	C	C	C	C
	93	V	V	V	V	V	V	V	V	G	V	V	V	V
E	6	I	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	53	P	P	P	P	L	L	P	L	L	P	P	P	P
	54	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A
	185	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C
	208	V	V	V	V	V	V	V	E	V	V	V	V	V
	262	T	T	T	T	T	T	T	T	K	T	T	T	T
	264	L	L	L	L	L	L	L	L	F	L	L	L	L
	269	E	E	E	K	E	K	E	E	E	E	E	E	E
	273	S	S	S	S	S	S	A	S	S	S	S	S	S
	274	S	S	S	S	S	S	S	L	S	S	S	S	S
	303	T	T	T	T	T	T	T	S	T	T	T	T	T
	405	T	T	T	T	T	T	T	P	T	T	T	T	T

Legenda: a – número da posição do AA na respectiva proteína; b- código amostra; c- amostra protótipo e em vermelho os AA diferentes.

Tabela 15: Freqüências dos pares de nucleotídeos do vírus VDEN2

Domínio	Pares idênticos	Tr	Tv	R
Média	1894	97	15	6,4
1 ^a Posição do códon	653	15	1	15
2 ^a Posição do códon	663	3	3	1
3 ^a Posição do códon	579	78	11	7,1

Legenda: ii= pares idênticos; Tr= transição; Tv= transversão; R= Tr/Tv

Todas as freqüências estão apresentadas na forma da média de todos os vírus.

Seqüências usadas: 27

44-2 - Brasil – 1990; af100464-Tailandia-1996; AF100459 -Tailandia-1994; AF100460 -Tailandia-1994; AF100461 -Tailandia-1995; af100462-Tailandia-1995; af100463-Tailandia-1996; AF100469 -Mexico-1992; af100467-Peru-1995; af100468-Peru-1996; L04561 - Mexico – 1983; bel61082-Brasil-2001; bel63650-Brasil-2002; cea2440-Brasil-1994; cea2462-Brasil-1994; cea2463-Brasil-1994; D00345 - Tailandia – 1980; GOI4191-Brasil-2002; M32941-Nova Guine C-1944; M20558-Jamaica-1983; ror1812-Brasi-1996; MIG1269-Brasil-1995; RGN53-Brasil-1994; ROR1811-Brasil-1996; U3195 1 - Tailandia – 1993; toc2016-BRASIL-1991; U87411-Tailandia-1964.

As 10 sequências de VDEN3 de nosso estudo apresentaram um percentual de identidade nucleotídica que variou de 89,6 a 100% quando comparadas entre si e com 28 sequências já registrada no banco de dados genbank/ncbi/nlm/nih/gov (figura 12). Na tabela 16 podemos ver a correlação de divergência e identidade entre as seqüências analisadas.

Na tabela 17 podemos ver a presença de mudanças de aminoácidos entre as seqüências de VDEN3 estudadas e o protótipo H87 1956, incluindo também seqüências de vírus que fazem parte de um grupo de cepas do SriLanka do qual deve ter se originado a cepa circulante no Brasil AY038605-RJ, que já está caracterizada geneticamente (Miagostovich *et al.*, 2003) (figura 12).

O gene prM/M apresentou pouca variabilidade, com alteração apenas na posição 86 (H→R). No gene E encontramos mudanças significativas, dentre essas alterações podemos destacar no resíduo de aminoácido E251 a presença do aminoácido K em dois vírus brasileiros analisados (AM2394 e RGN576), e o aminoácido E no restante incluindo o protótipo. Outro fato importante foi encontrado quando comparamos as seqüências brasileiras do estudo com o vírus VDEN3 protótipo H87, onde podemos observar nos resíduos de aminoácidos E321 e 325 que os aminoácidos foram iguais ao vírus protótipo que tem nessas posições o aminoácido K diferente do representante do SriLanka que tem nessas posições o aminoácido R. Apenas um vírus brasileiro (AM2394) diferiu na posição E321, K→R, no entanto é semelhante ao vírus que representa o SriLanka, como pode ser visto na referida tabela 17 e figura 12.

A seqüência do ácido nucléico do vírus protótipo H-87 (número de acesso M93130), usado neste estudo, e o vírus Porto Rico 63 (número de acesso L11433) mostraram uma elevada diferença de aminoácidos quando comparados as demais seqüências, principalmente do genótipo III. Estas alterações se devem ao elevado número de história de passagens quando do seu sequenciamento (Lanciotti *et al.*, 1994). As 10 sequências brasileiras mostraram também os 12 resíduos de cisteínas e os dois sítios de *N*-glicosilação identificados em estudos anteriores (Figura 12) (Lanciotti *et al.*, 1994). O domínio de fusão encontrado nas seqüências de aminoácidos (97-111) dos VDEN3 brasileiros parecem ser conservados, mesmo com manifestações diferenciadas.

Análise da taxa de transição e transversão de acordo com a posição no códon apresentaram uma elevada taxa de transição (64) na terceira posição do códon e maior taxa na primeira posição do códon como (11) quando comparamos ao protótipo H87, como podemos ver na tabela 18, sugerindo baixa ocorrência de mutações com menor probabilidade de alterações de aminoácidos.

	prM	10	20	30	40	50
M93130-H87-Filipinas-1956	FHLTSRDGEP	RMIVGKNERG	KSLLFKTASG	INMCTLIAMD	LGEMCDDTVT	
AM2394-BR-2002	
bel70617-BR-2002	
BEL73318-BR-2003	
CEA4739-BR-2002	
GOI099-BR-2003	
GOI100-BR-2003	
MTO3103-BR-2001	
RGN576-BR-2003	
ror3832-BR-2002	
ROR3845-BR-2002	
AY038605-RJ-BR-2001	
AY679147-RJ-BR	
L11438_-SriLanka_-1991	
AB189126_-Indonesia-1998	
AB189127-Indonesia-1998	
L11433_-Porto_Rico_-1963	T.....	
L11423_-Filipinas_-1956	
L11424_-India_-1984	
L11425_-Indonesia_-1973	
L11426_-Indonesia_-1978	
L11427_-Indonesia_-1978	
L11428_-Indonesia_-1985	
L11429_-Malasia_-1974	
L11430_-Mocambique_-1985	
L11431_-SriLanka_-1981	
L11432_-Filipinas_-1983	
L11422_-Fiji_-1992	
L11436_-SriLanka_-1985	
L11437_-SriLanka_-1989	
L11439_-Tahiti_-1965	T.....	
L11440_-Tailandia_-1962	
L11441_-Tailandia_-1986	
L11442_-Tailandia_-1987	
L11619_-Tahiti_-1989	
L11620_-Tailandia_-1973	
L11435_-Samoa_-1986	
		60	70	80	90	M 100
M93130-H87-Filipinas-1956	YKCPHITEVE	PEDIDCWCNL	TSTWVTYGTC	NQAGEHRRDK	RSVALAPHVG	
AM2394-BR-2002	
bel70617-BR-2002R.....	
BEL73318-BR-2003R.....	
CEA4739-BR-2002R.....	
GOI099-BR-2003R.....	
GOI100-BR-2003R.....	
MTO3103-BR-2001R.....	
RGN576-BR-2003R.....	
ror3832-BR-2002R.....	
ROR3845-BR-2002R.....	
AY038605-RJ-BR-2001R.....	
AY679147-RJ-BRR.....	
L11438_-SriLanka_-1991R.....	
AB189126_-Indonesia-1998L.....R.....	
AB189127-Indonesia-1998L.....R.....	
L11433_-Porto_Rico_-1963	H.....R.....	
L11423_-Filipinas_-1956R.....	
L11424_-India_-1984R.....	
L11425_-Indonesia_-1973L.....R.....	
L11426_-Indonesia_-1978L.....R.....	
L11427_-Indonesia_-1978L.....R.....	
L11428_-Indonesia_-1985L.....R.....	
L11429_-Malasia_-1974L.....R.....	
L11430_-Mocambique_-1985R.....	
L11431_-SriLanka_-1981D.....	
L11432_-Filipinas_-1983L.....R.....	
L11422_-Fiji_-1992L.....R.....	

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

L11436_-SriLanka_-1985
L11437_-SriLanka_-1989
L11439_-Tahiti_-1965R
L11440_-Tailandia_-1962A
L11441_-Tailandia_-1986L.A
L11442_-Tailandia_-1987L.A
L11619_-Tahiti_-1989L
L11620_-Tailandia_-1973A
L11435_-Samoa_-1986
	110	120	130	140	150
M93130-H87-Filipinas-1956	MGLDTRTQTW	MSAEGAWRQV	EKVETWALRH	PGFTILALFL	AHYIGTSLTQ
AM2394-BR-2002
bel70617-BR-2002
BEL73318-BR-2003
CEA4739-BR-2002
GOI099-BR-2003
GOI100-BR-2003
MTO3103-BR-2001
RGN576-BR-2003
ror3832-BR-2002
ROR3845-BR-2002
AY038605-RJ-BR-2001
AY679147-RJ-BR
L11438_-SriLanka_-1991
AB189126_-Indonesia-1998AF
AB189127-Indonesia-1998AF
L11433_-Porto_Rico_-1963FLM
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984V
L11425_-Indonesia_-1973F
L11426_-Indonesia_-1978F
L11427_-Indonesia_-1978F
L11428_-Indonesia_-1985F
L11429_-Malasia_-1974F
L11430_-Mocambique_-1985
L11431_-SriLanka_-1981
L11432_-Filipinas_-1983RF
L11422_-Fiji_-1992F
L11436_-SriLanka_-1985
L11437_-SriLanka_-1989
L11439_-Tahiti_-1965FLF
L11440_-Tailandia_-1962IW
L11441_-Tailandia_-1986
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989F
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986
	160	ENV 04	10	20	30
M93130-H87-Filipinas-1956	KVVIFILLML	VTPSMTMRCV	GVGNRDFVEG	LSGATWVDV	LEHGGCVTTM
AM2394-BR-2002I
bel70617-BR-2002
BEL73318-BR-2003?
CEA4739-BR-2002I
GOI099-BR-2003
GOI100-BR-2003
MTO3103-BR-2001I
RGN576-BR-2003I
ror3832-BR-2002I
ROR3845-BR-2002I
AY038605-RJ-BR-2001?
AY679147-RJ-BR
L11438_-SriLanka_-1991I
AB189126_-Indonesia-1998

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

AB189127-Indonesia-1998
L11433_-Porto_Rico_-1963T.....E.....
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978T.....
L11428_-Indonesia_-1985
L11429_-Malasia_-1974
L11430_-Mocambique_-1985
L11431_-SriLanka_-1981V.....
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992
L11436_-SriLanka_-1985
L11437_-SriLanka_-1989
L11439_-Tahiti_-1965E.....
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986A.....
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989
L11620_-Tailandia_-1973I.....A.....
L11435_-Samoa_-1986
	40	50	60	70	80
M93130-H87-Filipinas-1956	AKNKPTLDIE	LQKTEATQLA	TLRKLCIEGK	ITNITTTDSRC	PTQGEAILPE
AM2394-BR-2002V.....
bel70617-BR-2002V.....
BEL73318-BR-2003V.....
CEA4739-BR-2002M.....V.....
GOI099-BR-2003V.....
GOI100-BR-2003V.....
MTO3103-BR-2001V.....
RGN576-BR-2003M.....V.....
ror3832-BR-2002V.....
ROR3845-BR-2002V.....
AY038605-RJ-BR-2001V.....
AY679147-RJ-BRV.....
L11438_-SriLanka_-1991V.....
AB189126_-Indonesia-1998V.....
AB189127-Indonesia-1998V.....
L11433_-Porto_Rico_-1963V.....GA.....T.....T.....
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984V.....
L11425_-Indonesia_-1973V.....
L11426_-Indonesia_-1978V.....
L11427_-Indonesia_-1978R.....V.....
L11428_-Indonesia_-1985V.....
L11429_-Malasia_-1974V.....
L11430_-Mocambique_-1985V.....
L11431_-SriLanka_-1981V.....
L11432_-Filipinas_-1983V.....
L11422_-Fiji_-1992V.....
L11436_-SriLanka_-1985V.....
L11437_-SriLanka_-1989R.....V.....
L11439_-Tahiti_-1965
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989V.....
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986V.....

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

	90	100	110	120	130
M93130-H87-Filipinas-1956	EQDQNYVCKH	TYVDRGWGNG	CGLFGKGSV	TCAKFOCLES	IEGKVVQHEN
AM2394-BR-2002PY..
bel70617-BR-2002	...P.....PY..
BEL73318-BR-2003PY..
CEA4739-BR-2002PY..
GOI099-BR-2003	...P.....PY..
GOI100-BR-2003PY..
MTO3103-BR-2001	...P.....PY..
RGN576-BR-2003PY..
ror3832-BR-2002PY..
ROR3845-BR-2002PY..
AY038605-RJ-BR-2001	...P.....PY..
AY679147-RJ-BRPY..
L11438_-SriLanka_-1991PY..
AB189126_-Indonesia-1998L
AB189127-Indonesia-1998L
L11433_-Porto_Rico_-1963H..L
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984PY..
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978
L11428_-Indonesia_-1985
L11429_-Malasia_-1974
L11430_-Mocambique_-1985Y..
L11431_-SriLanka_-1981Y..
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992A..
L11436_-SriLanka_-1985Y..
L11437_-SriLanka_-1989PY..
L11439_-Tahiti_-1965
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986
L11442_-Tailandia_-1987P
L11619_-Tahiti_-1989A..
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986
	140	150 *	160	170	1800
M93130-H87-Filipinas-1956	LKYTVIITVH	TGDQHQVGNE	TQGVTAEITS	QASTAEAILP	EYGLGLECS
AM2394-BR-2002PT.....
bel70617-BR-2002PT.....
BEL73318-BR-2003PT.....
CEA4739-BR-2002PT.....
GOI099-BR-2003PT.....
GOI100-BR-2003PT.....
MTO3103-BR-2001PT.....
RGN576-BR-2003PT.....
ror3832-BR-2002PT.....
ROR3845-BR-2002PT.....
AY038605-RJ-BR-2001PT.....
AY679147-RJ-BRPT.....
L11438_-SriLanka_-1991PT.....
AB189126_-Indonesia-1998PV.....
AB189127-Indonesia-1998PV.....
L11433_-Porto_Rico_-1963	...I.....KPVT..
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984PT.....
L11425_-Indonesia_-1973PV.....
L11426_-Indonesia_-1978PV.....
L11427_-Indonesia_-1978PV.....
L11428_-Indonesia_-1985PV.....
L11429_-Malasia_-1974PV.....
L11430_-Mocambique_-1985PT.....
L11431_-SriLanka_-1981PT.....

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

L11432_-Filipinas_-1983PV
L11422_-Fiji_-1992PV
L11436_-SriLanka_-1985PT
L11437_-SriLanka_-1989PT
L11439_-Tahiti_-1965PT
L11440_-Tailandia_-1962	.R.....PT
L11441_-Tailandia_-1986DVPV
L11442_-Tailandia_-1987DVPV
L11619_-Tahiti_-1989PV
L11620_-Tailandia_-1973PV
L11435_-Samoa_-1986PTT

	1900	200	210	220	2300
M93130-H87-Filipinas-1956	PRTGLDFNEM	ILLTMKNKAW	MVHRQWFFDL	PLPWTSGATT	KTPTWNRKEL
AM2394-BR-2002	E.....
bel70617-BR-2002	E.....
BEL73318-BR-2003	E.....
CEA4739-BR-2002	E.....
GOI099-BR-2003	E.....
GOI100-BR-2003	E.....
MTO3103-BR-2001	E.....
RGN576-BR-2003	E.....
ror3832-BR-2002	E.....
ROR3845-BR-2002	E.....
AY038605-RJ-BR-2001	E.....
AY679147-RJ-BR	E.....
L11438_-SriLanka_-1991	E.....
AB189126_-Indonesia-1998	E.....K...
AB189127-Indonesia-1998	E.....K...
L11433_-Porto_Rico_-1963A	EV.....
L11423_-Filipinas_-1956	E.....
L11424_-India_-1984	E..P.....
L11425_-Indonesia_-1973	E.....K...
L11426_-Indonesia_-1978	E.....K...
L11427_-Indonesia_-1978	E.....K...
L11428_-Indonesia_-1985	E.....K...
L11429_-Malasia_-1974	E.....K...
L11430_-Mocambique_-1985	E.....
L11431_-SriLanka_-1981	E.....
L11432_-Filipinas_-1983	??	E.....K...
L11422_-Fiji_-1992	E.....K...
L11436_-SriLanka_-1985	E.....
L11437_-SriLanka_-1989	E.....
L11439_-Tahiti_-1965	E.....
L11440_-Tailandia_-1962	E.....
L11441_-Tailandia_-1986	E.....
L11442_-Tailandia_-1987S	E.....
L11619_-Tahiti_-1989	E.....K...
L11620_-Tailandia_-1973	E.....
L11435_-Samoa_-1986	E.....

	240	250	260	270	280
M93130-H87-Filipinas-1956	LVTFKNAHAK	KQEVVVLGSQ	EGAMHTALTG	ATEIQTSGGT	SIFAGHLKCR
AM2394-BR-2002	K.....N
bel70617-BR-2002P.....N
BEL73318-BR-2003P.....N
CEA4739-BR-2002N
GOI099-BR-2003P.....N
GOI100-BR-2003N
MTO3103-BR-2001P.....N
RGN576-BR-2003	K.....N
ror3832-BR-2002P.....PN
ROR3845-BR-2002P.....N
AY038605-RJ-BR-2001P.....N
AY679147-RJ-BRN
L11438_-SriLanka_-1991N

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

AB189126_-Indonesia-1998
AB189127-Indonesia-1998
L11433_-Porto_Rico_-1963	I.....
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984R.....N.....
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978
L11428_-Indonesia_-1985
L11429_-Malasia_-1974
L11430_-Mocambique_-1985N.....
L11431_-SriLanka_-1981
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992
L11436_-SriLanka_-1985
L11437_-SriLanka_-1989N.....
L11439_-Tahiti_-1965I.....
L11440_-Tailandia_-1962N.....
L11441_-Tailandia_-1986N.....
L11442_-Tailandia_-1987N.....
L11619_-Tahiti_-1989
L11620_-Tailandia_-1973N.....
L11435_-Samoa_-1986N.....

	290	300	310	320	330
M93130-H87-Filipinas-1956	LKMDKCLKLKG	MSYAMCLNTF	VLKKEVSETQ	HGTILIKVEY	KGEDAPCKIP
AM2394-BR-2002E.....T.....
bel70617-BR-2002E.....T.....
BEL73318-BR-2003E.....T.....
CEA4739-BR-2002E.....T.....
GOI099-BR-2003E.....T.....
GOI100-BR-2003E.....T.....
MTO3103-BR-2001E.....T.....
RGN576-BR-2003E.....T.....
ror3832-BR-2002E.....T.....
ROR3845-BR-2002E.....T.....	I.....
AY038605-RJ-BR-2001E.....T.....V.....
AY679147-RJ-BRE.....T.....
L11438_-SriLanka_-1991E.....T.....R.....	R.....
AB189126_-Indonesia-1998E.....S.A.....
AB189127-Indonesia-1998E.....S.A.....
L11433_-Porto_Rico_-1963E.....SG.....
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984E.....T.....
L11425_-Indonesia_-1973E.....A.....
L11426_-Indonesia_-1978E.....A.....
L11427_-Indonesia_-1978E.....A.....
L11428_-Indonesia_-1985E.....A.....
L11429_-Malasia_-1974E.....A.....
L11430_-Mocambique_-1985E.....T.....
L11431_-SriLanka_-1981E.....T.....V.....
L11432_-Filipinas_-1983E.....A.....
L11422_-Fiji_-1992E.....A.....
L11436_-SriLanka_-1985E.....T.....
L11437_-SriLanka_-1989E.....T.....
L11439_-Tahiti_-1965E.....SG.....
L11440_-Tailandia_-1962E.....
L11441_-Tailandia_-1986E.....
L11442_-Tailandia_-1987E.....
L11619_-Tahiti_-1989E.....A.....
L11620_-Tailandia_-1973E.....
L11435_-Samoa_-1986E.....T.....V.....

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

	340	350	360	370	3800
M93130-H87-Filipinas-1956	FSTEDGQGKA	HNGRLITANP	VVTKKEEPVN	IEAEPPFGES	NIVIGIGDKA
AM2394-BR-2002N.
bel70617-BR-2002N.
BEL73318-BR-2003N.
CEA4739-BR-2002N.
GOI099-BR-2003N.
GOI100-BR-2003N.
MTO3103-BR-2001N.
RGN576-BR-2003N.
ror3832-BR-2002N.
ROR3845-BR-2002N.
AY038605-RJ-BR-2001N.
AY679147-RJ-BRN.
L11438_-SriLanka_-1991N.
AB189126_-Indonesia-1998I.
AB189127-Indonesia-1998I.
L11433_-Porto_Rico_-1963T.
L11423_-Filipinas_-1956T.
L11424_-India_-1984N.
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978
L11428_-Indonesia_-1985T.
L11429_-Malasia_-1974S
L11430_-Mocambique_-1985N.
L11431_-SriLanka_-1981N.
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992I
L11436_-SriLanka_-1985T.N.
L11437_-SriLanka_-1989N.
L11439_-Tahiti_-1965T.
L11440_-Tailandia_-1962D.
L11441_-Tailandia_-1986
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989I
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986T.N.
	390	400	410	420	430
M93130-H87-Filipinas-1956	LKINWYRKGS	SIGKMFEATA	RGARRMAILG	DTAWDFGSVG	GVLNSLGKMV
AM2394-BR-2002K
bel70617-BR-2002K
BEL73318-BR-2003K
CEA4739-BR-2002K
GOI099-BR-2003K
GOI100-BR-2003K
MTO3103-BR-2001K
RGN576-BR-2003K
ror3832-BR-2002K
ROR3845-BR-2002K
AY038605-RJ-BR-2001K
AY679147-RJ-BR
L11438_-SriLanka_-1991K
AB189126_-Indonesia-1998K
AB189127-Indonesia-1998K
L11433_-Porto_Rico_-1963RF
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984K
L11425_-Indonesia_-1973K
L11426_-Indonesia_-1978K
L11427_-Indonesia_-1978K
L11428_-Indonesia_-1985K
L11429_-Malasia_-1974K
L11430_-Mocambique_-1985K
L11431_-SriLanka_-1981K
L11432_-Filipinas_-1983K

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

L11422_-Fiji_-1992K...E..
L11436_-SriLanka_-1985K...
L11437_-SriLanka_-1989K...
L11439_-Tahiti_-1965	.R...K...F....
L11440_-Tailandia_-1962K...
L11441_-Tailandia_-1986K...
L11442_-Tailandia_-1987K...
L11619_-Tahiti_-1989K...
L11620_-Tailandia_-1973K...
L11435_-Samoa_-1986K...I....

	440	450	460	470	480
M93130-H87-Filipinas-1956	HQIFGSAYTA	LFSGVSWIMK	IGIGVLLTWI	GLNSKNTSMS	FSCIAIGIIT
AM2394-BR-2002V..
bel70617-BR-2002V..
BEL73318-BR-2003V..
CEA4739-BR-2002V..
GOI099-BR-2003V..
GOI100-BR-2003V..
MTO3103-BR-2001V..
RGN576-BR-2003V..
ror3832-BR-2002V..
ROR3845-BR-2002V..
AY038605-RJ-BR-2001V..
AY679147-RJ-BRV..
L11438_-SriLanka_-1991V..
AB189126_-Indonesia-1998V....
AB189127-Indonesia-1998V....
L11433_-Porto Rico_-1963I..V....
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984V..
L11425_-Indonesia_-1973V....
L11426_-Indonesia_-1978V....
L11427_-Indonesia_-1978V....
L11428_-Indonesia_-1985V....
L11429_-Malasia_-1974V....
L11430_-Mocambique_-1985V..V....
L11431_-SriLanka_-1981V..
L11432_-Filipinas_-1983V....
L11422_-Fiji_-1992V....
L11436_-SriLanka_-1985V..
L11437_-SriLanka_-1989V..
L11439_-Tahiti_-1965I..V....
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986D..
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989D..V....
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986V..

490

M93130-H87-Filipinas-1956	LYLGVVVQA
AM2394-BR-2002A....
bel70617-BR-2002A....
BEL73318-BR-2003A....
CEA4739-BR-2002A....
GOI099-BR-2003A....
GOI100-BR-2003A....
MTO3103-BR-2001A....
RGN576-BR-2003A....
ror3832-BR-2002A....
ROR3845-BR-2002A....
AY038605-RJ-BR-2001A....
AY679147-RJ-BRA....
L11438_-SriLanka_-1991A....
AB189126_-Indonesia-1998A....

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Continua→

```

AB189127-Indonesia-1998      ....A....
L11433_-_Porto_Rico_-_1963  ....A....
L11423_-_Filipinas_-_1956   .....
L11424_-_India_-_1984       ....A....
L11425_-_Indonesia_-_1973   ....A....
L11426_-_Indonesia_-_1978   ....A....
L11427_-_Indonesia_-_1978   ....A....
L11428_-_Indonesia_-_1985   ....A....
L11429_-_Malasia_-_1974     ....A....
L11430_-_Mocambique_-_1985  ....A....
L11431_-_SriLanka_-_1981    ....A.A..
L11432_-_Filipinas_-_1983   ....A....
L11422_-_Fiji_-_1992        ....A....
L11436_-_SriLanka_-_1985    ....A....
L11437_-_SriLanka_-_1989    ....A....
L11439_-_Tahiti_-_1965      ....A....
L11440_-_Tailandia_-_1962   ....A....
L11441_-_Tailandia_-_1986   ....A....
L11442_-_Tailandia_-_1987   ....A....
L11619_-_Tahiti_-_1989      ....A....
L11620_-_Tailandia_-_1973   ....A....
L11435_-_Samoa_-_1986       ....A....

```

Figura 12: Alinhamento de 37 seqüências de aminoácidos (AA) do gene prM/M/E do vírus VDEN3. O provável sitio de N-glicosilação está indicado em vermelho. A marcação em cinza corresponde ao domínio de fusão e em amarelo ao domínio de ancoragem da membrana (Laciotti *et al.*, 1994).

Tabela 16: Análise de Identidade e Divergência nucleotídica das seqüências parciais prM/E de VDEN3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
1		98.1	98.3	98.2	98.1	99.0	99.4	99.3	99.3	99.2	93.1	93.1	98.1	98.1	90.5	94.7	98.4	94.2	94.0	93.4	93.7	94.2	97.9	97.9	93.8	93.7	94.4	97.7	98.9	99.1	92.8	95.3	94.3	94.3	93.5	94.9	97.3	1
2	1.9		98.1	98.6	100	99.2	97.8	97.7	98.2	98.1	92.4	92.4	98.8	98.1	89.6	94.0	97.3	93.5	93.3	92.7	93.0	93.5	96.8	96.8	93.2	93.0	93.7	96.6	97.4	97.6	91.8	94.3	93.3	93.3	92.9	93.8	96.2	2
3	1.8	2.0		98.2	98.1	98.6	98.2	98.0	98.3	98.2	93.0	92.9	98.9	98.9	90.2	94.3	97.9	94.3	94.1	93.3	93.7	94.1	97.4	97.5	93.8	93.7	94.0	97.2	97.8	98.0	92.4	94.9	93.9	93.9	93.6	94.5	97.0	3
4	1.8	1.5	1.8		98.6	98.9	97.9	97.7	98.3	98.0	92.4	92.3	98.9	98.2	89.8	93.9	97.3	93.6	93.4	92.7	93.2	93.5	96.8	96.7	93.2	93.0	93.6	96.6	97.3	97.5	92.0	94.4	93.3	93.3	92.9	93.8	96.3	4
5	1.9	0.0	2.0	1.5		99.2	97.8	97.7	98.2	98.1	92.4	92.4	98.8	98.1	89.6	94.0	97.3	93.5	93.3	92.7	93.0	93.5	96.8	96.8	93.2	93.0	93.7	96.6	97.4	97.6	91.8	94.3	93.3	93.3	92.9	93.8	96.2	5
6	1.0	0.9	1.4	1.1	0.9		98.7	98.5	98.8	98.7	93.0	92.9	99.0	98.5	90.2	94.5	97.9	94.1	93.9	93.2	93.6	94.0	97.4	97.5	93.8	93.5	94.2	97.2	98.1	98.2	92.4	95.0	93.9	93.9	93.4	94.5	96.9	6
7	0.4	2.0	1.5	1.9	2.0	1.1		99.5	98.9	98.9	93.2	93.1	97.9	97.9	90.5	94.7	98.2	94.2	94.1	93.4	93.7	94.1	97.8	97.9	93.8	93.7	94.4	97.7	98.8	99.1	92.8	95.3	94.3	94.3	93.5	94.9	97.2	7
8	0.7	2.3	2.0	2.3	2.3	1.4	0.3		98.7	98.7	93.1	93.0	97.8	97.8	90.4	94.6	98.0	94.1	93.9	93.4	93.6	94.0	97.6	97.7	93.7	93.7	94.3	97.5	98.6	99.0	92.7	95.1	94.2	94.2	93.5	94.7	97.0	8
9	0.8	1.8	1.7	1.7	1.8	1.2	0.9	1.3		99.3	93.0	93.0	98.4	98.3	90.3	94.5	98.0	94.2	93.9	93.3	93.6	94.1	97.4	97.5	93.7	93.7	94.2	97.2	98.2	98.4	92.5	95.0	94.0	94.0	93.5	94.6	96.9	9
10	0.8	1.9	1.8	2.0	1.9	1.3	0.9	1.2	0.7		92.9	92.9	98.1	98.1	90.2	94.4	97.9	94.1	93.8	93.2	93.5	94.0	97.4	97.4	93.6	93.6	94.1	97.2	98.2	98.5	92.4	94.9	93.9	93.9	93.4	94.5	96.8	10
11	7.5	8.2	7.6	8.2	8.2	7.6	7.1	7.5	7.5	7.6		100	92.8	93.5	90.4	95.3	93.9	97.7	97.5	97.0	98.3	98.0	94.6	94.1	96.6	95.9	95.0	94.2	93.6	93.6	92.2	94.6	94.0	94.0	96.8	94.5	94.1	11
12	7.5	8.2	7.7	8.3	8.2	7.6	7.2	7.5	7.6	7.7	0.0		92.7	93.4	90.4	95.3	93.9	97.7	97.5	96.9	98.2	97.9	94.5	94.0	96.5	96.9	95.0	94.1	93.5	93.5	92.1	94.5	94.0	93.9	96.8	94.4	94.0	12
13	2.0	1.3	1.1	1.1	1.3	1.0	1.9	2.2	1.6	1.8	7.8	7.8		99.0	90.0	94.2	97.5	94.1	93.8	93.1	93.5	93.9	97.0	97.1	93.5	93.7	93.9	96.7	97.3	97.3	92.1	94.6	93.5	93.5	93.5	94.1	96.6	13
14	2.0	2.0	1.1	1.8	2.0	1.5	1.9	2.2	1.8	2.0	7.0	7.1	1.0		90.7	94.9	97.9	94.7	94.4	93.8	94.1	94.5	97.4	97.5	94.0	94.1	94.6	97.2	97.7	97.8	92.7	95.2	94.2	94.2	94.0	94.8	97.0	14
15	10.5	11.7	11.0	11.4	11.7	11.0	10.3	10.7	10.8	10.9	10.8	10.8	11.2	10.4		91.6	90.8	91.0	90.8	90.4	90.6	91.0	91.0	90.6	91.0	90.8	91.4	90.7	90.4	90.6	96.6	91.0	91.0	91.1	90.8	91.4	90.6	15
16	5.6	6.4	6.1	6.5	6.4	5.9	5.4	5.7	5.8	5.9	5.0	5.0	6.2	5.4	9.3		95.5	96.6	96.1	95.7	95.9	96.4	95.6	95.6	95.9	95.7	99.7	95.4	94.9	95.1	93.7	96.8	95.9	95.8	95.8	96.5	95.3	16
17	1.7	2.8	2.2	2.8	2.8	2.1	1.6	2.1	2.1	2.2	6.5	6.6	2.5	2.2	10.3	4.7		95.1	94.9	94.1	94.5	95.1	98.2	98.9	94.6	94.5	95.2	98.6	98.5	98.7	93.3	96.2	95.1	95.1	94.5	95.8	98.3	17
18	6.2	6.9	6.1	6.8	6.9	6.3	5.9	6.3	6.2	6.2	2.4	2.4	6.3	5.7	10.1	3.6	5.2		98.9	98.4	98.4	99.2	96.0	95.2	98.0	98.8	96.3	95.3	94.8	94.7	93.1	95.9	95.0	95.0	98.8	95.6	95.1	18
19	6.4	7.1	6.4	7.0	7.1	6.5	6.0	6.5	6.5	6.6	2.6	2.6	6.6	6.0	10.3	4.1	5.4	1.1		97.9	98.2	99.0	95.7	95.1	97.7	98.0	95.8	95.2	94.5	94.5	92.8	95.6	94.8	94.8	97.9	95.3	94.9	19
20	7.2	7.8	7.2	7.8	7.8	7.3	6.8	7.1	7.3	7.3	3.2	3.2	7.4	6.6	10.8	4.6	6.4	1.7	2.2		97.3	98.1	94.9	94.4	97.0	97.4	95.4	94.3	93.7	93.7	92.1	95.0	94.1	94.2	97.4	94.7	94.0	20
21	6.8	7.5	6.8	7.3	7.5	6.9	6.5	6.8	6.9	6.9	1.8	1.9	7.0	6.4	10.5	4.4	5.9	1.7	1.9	2.8		98.7	95.1	94.7	97.2	97.5	95.6	94.8	94.1	94.1	92.6	95.2	94.3	94.4	97.5	94.9	94.7	21
22	6.2	7.0	6.3	6.9	7.0	6.4	6.1	6.4	6.3	6.4	2.1	2.2	6.5	5.9	10.1	3.8	5.2	0.9	1.1	2.0	1.3		95.7	95.1	97.9	98.3	96.1	95.1	94.5	94.5	93.0	95.6	94.7	94.8	98.2	95.3	95.1	22
23	2.2	3.3	2.7	3.3	3.3	2.6	2.1	2.5	2.7	2.7	5.8	5.9	3.1	2.7	10.1	4.6	1.9	4.2	4.6	5.4	5.2	4.5		98.1	95.2	95.2	95.3	97.9	98.2	98.3	93.5	96.3	95.2	95.1	95.1	95.7	97.6	23
24	2.2	3.3	2.6	3.4	3.3	2.6	2.0	2.4	2.6	2.6	6.4	6.4	3.0	2.6	10.5	4.6	1.2	5.1	5.2	6.0	5.7	5.2	2.0		94.7	94.4	95.3	99.0	98.4	98.5	93.3	96.2	95.2	95.1	94.4	95.9	98.5	24
25	6.5	7.1	6.5	7.1	7.1	6.5	6.2	6.5	6.6	6.6	3.5	3.5	6.8	6.3	9.9	4.2	5.6	1.9	2.3	3.0	2.8	2.1	5.0	5.5		97.0	95.6	94.8	94.0	94.1	92.9	95.5	94.6	94.6	97.2	95.2	94.7	25
26	6.8	7.5	6.8	7.5	7.5	6.9	6.5	6.8	6.8	6.9	3.2	3.3	6.7	6.3	10.3	4.5	5.9	1.2	2.1	2.8	2.6	1.8	5.1	6.0	3.0		95.4	94.5	94.1	94.0	92.8	95.2	94.3	94.3	99.6	94.8	94.4	26
27	6.0	6.7	6.4	6.9	6.7	6.2	5.7	6.0	6.2	6.2	5.3	5.4	6.5	5.7	9.5	0.3	5.1	3.9	4.4	4.9	4.7	4.2	5.0	5.0	4.5	4.9		95.1	94.6	94.8	93.4	95.5	95.7	95.5	95.5	96.2	95.0	27
28	2.4	3.5	2.9	3.5	3.5	2.8	2.2	2.6	2.9	2.9	6.3	6.3	3.4	2.9	10.4	4.9	1.4	5.0	5.1	6.1	5.6	5.2	2.2	1.0	5.4	5.9	5.2		98.2	98.3	93.3	96.0	94.9	94.9	94.5	95.7	98.5	28
29	1.2	2.7	2.3	2.8	2.7	1.9	1.0	1.4	1.8	1.8	6.9	7.0	2.7	2.4	10.8	5.4	1.5	5.6	5.9	6.8	6.4	5.9	1.9	1.7	6.3	6.3	5.8	1.9		99.4	92.8	95.6	94.7	94.7	93.9	95.4	97.7	29
30	1.0	2.5	2.1	2.6	2.5	1.8	0.7	1.0	1.6	1.5	6.9	7.0	2.7	2.3	10.6	5.2	1.3	5.7	5.9	6.8	6.4	5.9	1.7	1.5	6.2	6.4	5.5	1.7	0.6		93.0	95.8	94.8	94.8	93.9	95.4	97.9	30
31	7.8	8.9	8.2	8.7	8.9	8.2	7.5	7.9	8.1	8.2	8.6	8.6	8.5	7.9	3.6	6.8	7.2	7.5	7.8	8.7	8.1	7.6	7.0	7.3	7.6	7.8	7.2	7.2	7.8	7.6		93.7	93.0	92.8	92.9	93.4	93.0	31
32	5.0	6.0	5.4	5.9	6.0	5.3	4.7	5.1	5.3	5.4	5.8	5.9	5.7	5.1	10.0	3.4	4.0	4.4	4.7	5.3	5.1	4.6	3.9	4.0	4.6	5.1	3.7	4.3	4.7	4.5	6.8		96.5	96.4	95.2	97.2	95.8	32
33	6.1	7.2	6.6	7.2	7.2	6.5	5.8	6.2	6.5	6.5	6.4	6.5	6.9	6.2	10.0	4.4	5.2	5.4	5.6	6.3	6.1	5.6	5.1	5.1	5.6	6.1	4.6	5.5	5.7	5.6	7.6	3.7		98.9	94.5	98.6	94.7	33
34	6.1	7.2	6.6	7.2	7.2	6.5	5.8	6.2	6.5	6.5	6.5	6.6	6.9	6.2	10.0	4.4	5.2	5.3	5.5	6.3	6.0	5.6	5.2	5.2	5.6	6.2	4.8	5.5	5.7	5.6	7.8	3.8	1.2		94.4	98.4	94.7	34
35	7.1	7.7	6.9	7.6	7.7	7.0	6.7	7.0	7.1	3.3	3.4	6.9	6.4	10.3	4.4	5.9	1.2	2.2	2.8	2.6	1.9	5.2	6.0	2.8	0.4	4.8	5.9	6.5	6.5	7.7	5.1	5.9	6.0		94.9	94.7	35	
36	5.4	6.6	5.9	6.6	6.6	5.9	5.2	5.6	5.8	5.9	6.0	6.3	5.6	9.6	3.7	4.5	4.6	5.0	5.7	5.5	5.0	4.6	4.4	5.0	5.5	4.0	4.6	4.9	4.9	7.1	3.0	1.5	1.6	5.4		95.5	36	
37	2.8	3.9	3.2	3.8	3.9	3.2	2.6	3.1	3.3	3.3	6.4	6.4	3.5	3.2	10.6	5.0	1.8	5.3																				

Tabela 17: Diferenças de aminoácidos das seqüências da prM/E dos vírus VDEN3 comparados ao vírus Sri Lanka 1991.

Gene	Posição	AMOSTRAS DE VDEN3											SriLanka ^c 1991
		AM2394 (FD)	GOI099 (FHD)	GOI100 (FHD)	MT03103 (FHD)	Cea4739 (FD)	Bel70617 (FD)	RGN576 (FD)	Ror3832 (FD)	Ror3845 (FD)	Bel73318 (FD)	AY038605 RJ (FD)	
M	86	H	R	H	R	H	R	H	H	H	R	R	H
E	6	I	V	V	I	I	V	I	I	I	V	V	I
	53	L	L	L	L	M	L	M	L	L	L	L	L
	89	Q	P	Q	P	Q	Q	Q	P	P	P	P	Q
	246	Q	P	Q	P	Q	P	Q	P	P	P	P	Q
	251	K	E	E	E	E	E	K	E	E	E	E	E
	320	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	V	I
	321	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R
	325	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R

Legenda: a – posição do aa; b- código amostra; c- amostra protótipo, os aa em vermelho são os que alteraram quando comprados com o protótipo do genótipo III de VDEN3

Tabela 18: Freqüências dos pares de nucleotídeos do vírus VDEN3

Domínio	Pares idênticos	Tr	Tv	R
Média	1884	80	13	6,3
1ª Posição do códon	646	11	1	11
2ª Posição do códon	653	5	2	2,5
3ª Posição do códon	585	64	10	6,4

Legenda: Tr= transição; Tv= transversão; R= si/sv

Todas a freqüências estão apresentadas na forma da média de todos os táxons.

Número de seqüências: 37

AM2394-BR-2002; GOI099-BR-2003; GOI100-BR-2003; MTO3103-BR-2001; bel70617-BR-2002; BEL73318-BR-2003; CEA4739-BR-2002; RGN576-BR-2003; ROR3832-BR-2002; ROR3845-BR-2002; AB189126 - Indonésia-1998; AB189127- Indonésia-1998 AY038605-RJ-BR-2001; AY679147-RJ-BR; L11433 - Porto Rico – 1963; L11423 - Filipinas – 1956; L11424 - Índia – 1984; L11425 - Indonésia – 1973; L11426 - Indonésia – 1978; L11427 - Indonésia – 1978; L11428 - Indonésia – 1985; L11429 - Malásia – 1974; L11430 - Moçambique – 1985; L11431 - SriLanka – 1981; L11432 - Filipinas – 1983; L11422 - Fiji – 1992; M93130-H87-Filipinas-1956; L11436 - SriLanka – 1985; L11437 - SriLanka – 1989; L11438 - SriLanka – 1991; L11439 - Tahiti – 1965; L11440 - Tailândia – 1962; L11441 - Tailândia – 1986; L11442 - Tailândia – 1987; L11619 - Tahiti – 1989; L11620- Tailândia – 1973; L11435 - Samoa – 1986.

5.4- Análise de Saturação

Antes de iniciarmos a análise dos dados verificamos a qualidade da informação filogenética disponível. Para isso escolhemos um teste onde se agrupam dois conjuntos: um visando verificar a presença de saturação e outro visando identificar se os dados contêm estrutura genética ou sinal filogenético.

Na verificação de saturação, devemos observar se a taxa de transição é maior que a de transversão. Entretanto, à medida que aumenta a divergência entre duas seqüências, o número de transições observadas em relação ao das transversões decresce em função da saturação. Para isso usamos o programa DAMBE que é capaz de verificar se há ou não saturação nos dados.

As seqüências obtidas em nosso trabalho, quando analisadas pelo DAMBE, apresentaram baixo índice de saturação como pode ser visto nos gráficos pelas retas de transição e transversão, indicando excelente sinal filogenético (figura 13 e 14).

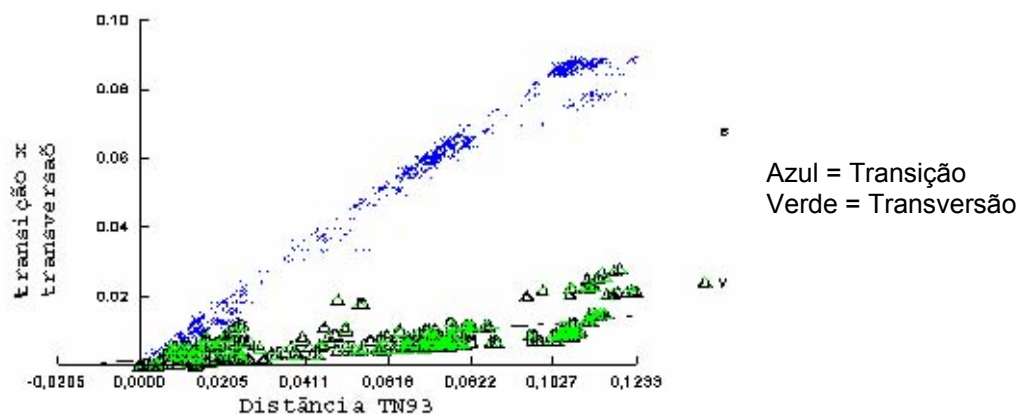


Figura 13: Análise de saturação nos genes prM/M/E/NS1 VDEN 2

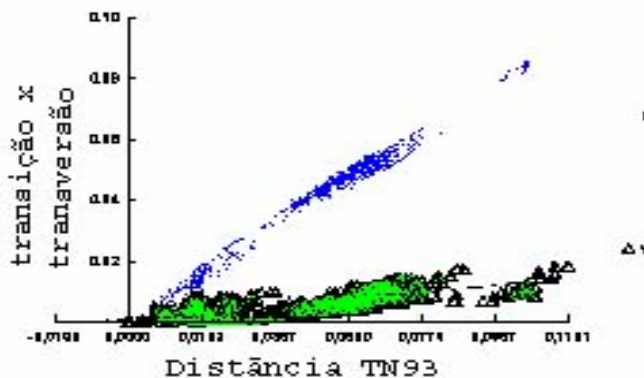


Figura 14: Análise de saturação no gene E do VDEN 3

5.5- Análise Filogenética

5.5.1 - Análise filogenética do vírus VDEN2

A seqüência dos genes da poliproteína prM/M/E/NS1 de 11 amostras isoladas no Brasil, entre os anos de 1991 e 2002 (tabela 05) foram comparadas com 16 seqüências retiradas do genbank/ncbi/nlm/nih/gov de seqüências dos vírus das principais epidemias ocorridas no mundo. Foram realizadas análises usando os métodos de máxima parcimônia (MP) e agrupamentos de vizinhos (NJ, neighbour-joining) usando os programas, PAUP e MEGA.

Os resultados obtidos com os métodos citados não diferiram, mas apresentamos graficamente os resultados dos dois modelos usados. Nas figuras 15 e 16 vemos as árvores filogenéticas com as 11 seqüências obtidas em nosso estudo de VDEN2 e as 16 retiradas do banco de dados (genbank/ncbi/nlm/nih/gov). Estas foram analisadas pelos métodos citados acima e nos ramos principais podemos ver o agrupamento de nove seqüências brasileiras (Cea2440, Cea2462, Cea2463, RGN53, MIG1269, Bel63650, Bel61082, GOI4191, Toc 2016) com elevado grau de afinidade com o vírus Jam83 (sustentado por 99% do valor de bootstrap), representando o genótipo III. As amostras do Estado de Roraima se agruparam um pouco mais distante, mas correspondendo ao mesmo genótipo, e estão mais próximos aos vírus isolados no Centro-Oeste brasileiro e da Venezuela.

Com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados analisados, foi aplicado um outro teste de análise filogenética denominado de máxima parcimônia. Nesse teste (figura 16) avaliamos se haveria alguma alteração nos agrupamentos obtidos anteriormente. Os resultados obtidos foram semelhantes ao anterior com valores de “bootstrap” aproximados (Figuras 15 e 16).

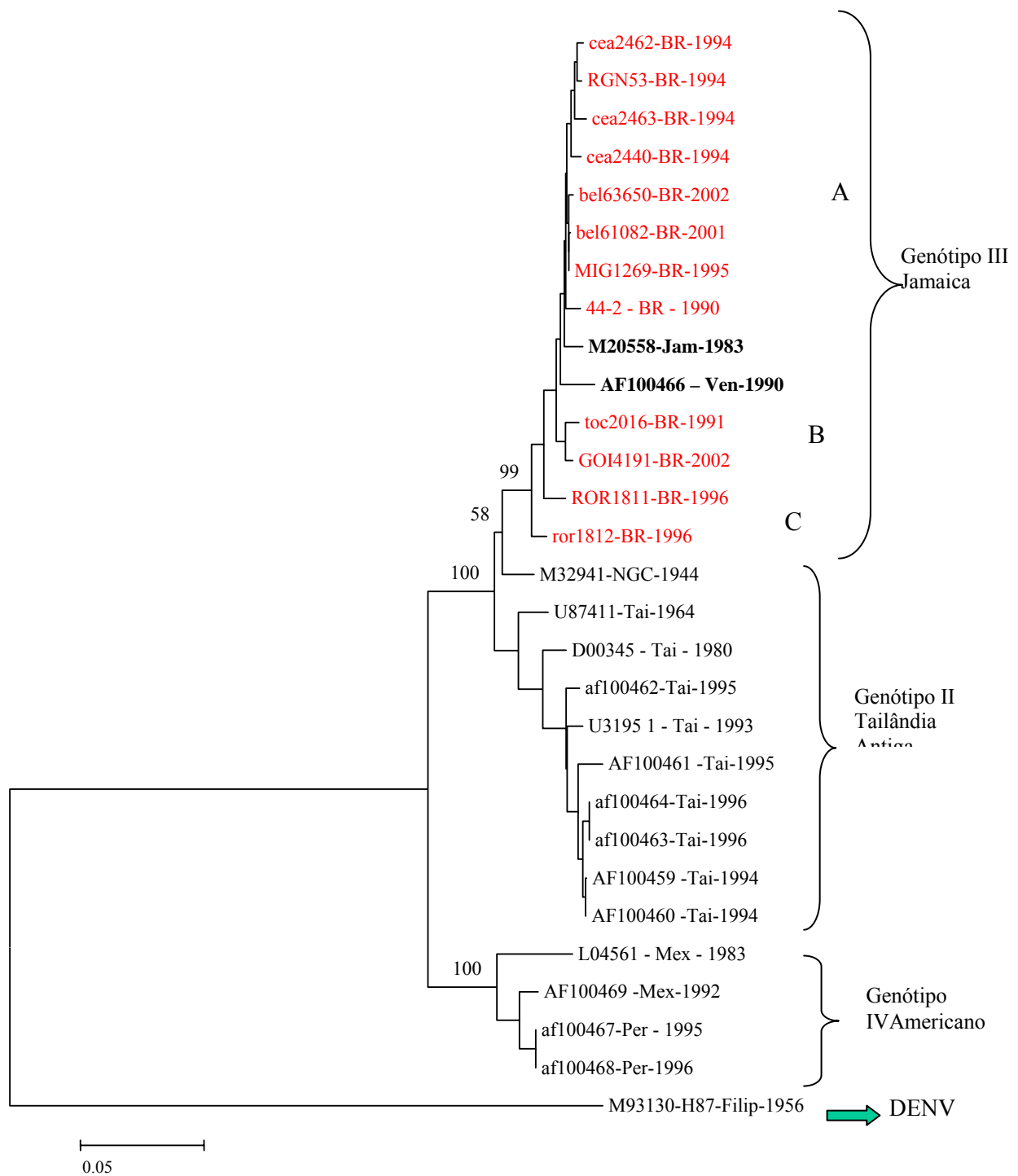


Figura 15 - Análise filogenética dos genes C/prME dos vírus VDENV2. Dezesesseis seqüências referências dos genótipos de II, III e VI obtidas no Genebank (número de acesso tabela 03). A análise foi realizada utilizando o método de agrupamentos de vizinhos e a distância nucleotídica calculada pelo método kimura 2 parametros. Os valores de "bootstrap" foram calculados após 1.000 pseudoreplicas e estão listados apenas nos ramos principais. A seqüência de VDENV3 M93130 foi usada como grupo externo ("out-group") durante a análise. Os isolados brasileiros analisados neste trabalho estão marcados em vermelho. A barra de escala corresponde a razão de substituição nucleotídica. A distância vertical é apenas ilustrativa. .

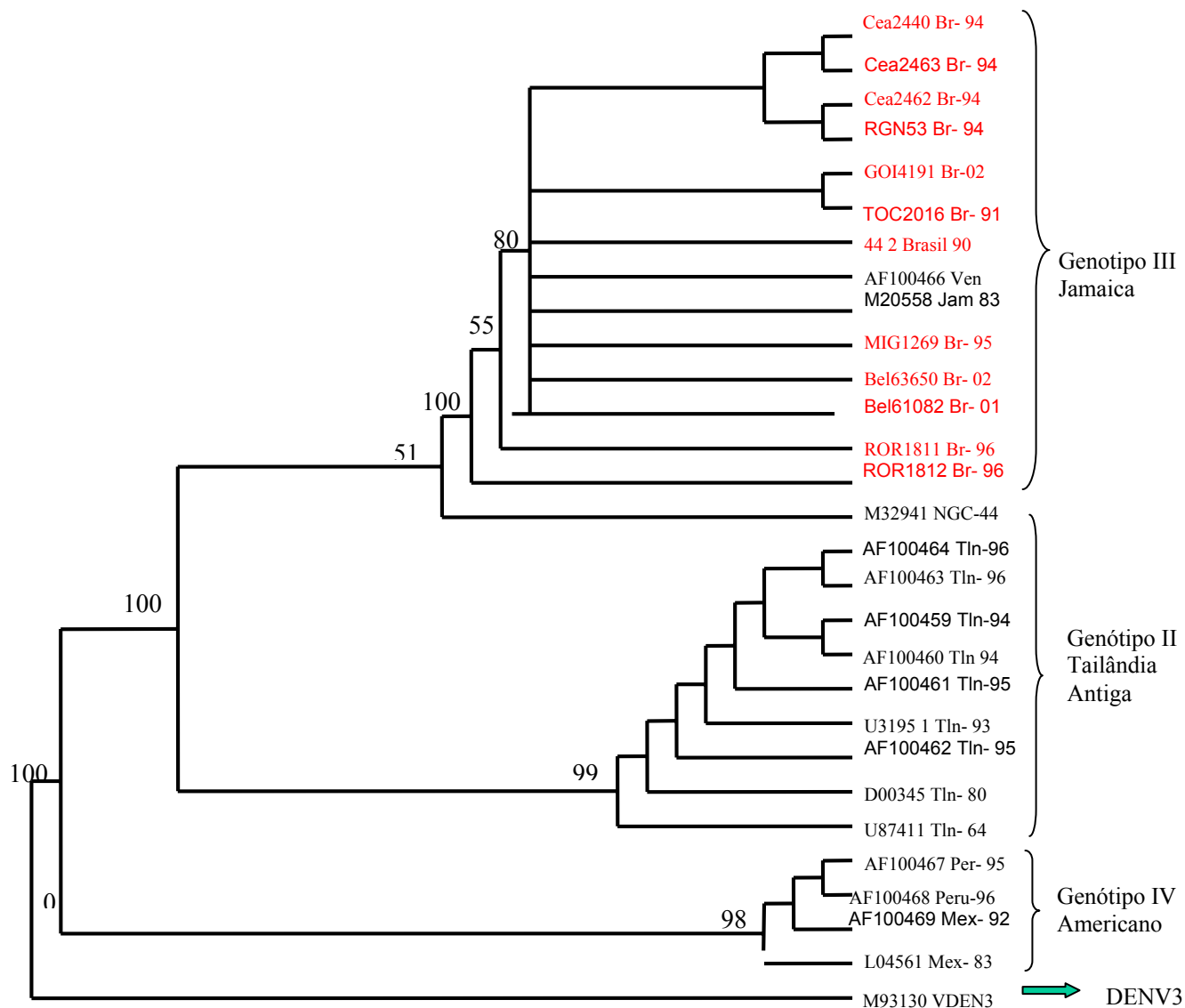


Figura 16: Análise filogenética parcimoniosa dos genes prM/E das amostras virais de VDENV2. Dezesesseis seqüências referências dos genótipos de II, III e IV obtidas no genbank/ncbi/nlm/nih/gov (número de acesso tabela 03). A análise heurística foi realizada no PAUP, baseada em 2006 nucleotídeos (comprimento da árvore = 1299, índice de consistência = 0.77, índice de retenção= 0.84, gap tratado como dado extraviado). Numeros acima dos ramos correspondem ao valor de "bootstrap" (após 1000 pseudoreplicas). A seqüência de VDENV3 M93130 foi usada como grupo externo ("out-group") durante a análise. Os isolados brasileiros analisados neste trabalho estão marcados em vermelho. A barra de escala corresponde a razão de substituição nucleotídica. A distância vertical é apenas ilustrativa.

5.5.2 - Análise filogenética do vírus DENV3

As seqüências do gene da poliproteína prM/M/E de 10 amostras de VDEN3 isoladas no Brasil, entre os anos de 2001 e 2003 foram comparados com sequencias de VDEN3 disponíveis no Genbank de vírus representantes dos genótipos circulantes no mundo. Foram realizadas análises usando os métodos da máxima parcimônia (MP), e agrupamentos de vizinhos (NJ, neighbour-joining) usando dois programas, PAUP e MEGA.

Os resultados obtidos com os métodos citados não diferiram, e estão representados em forma de árvore filogenética. A árvore apresentada na figura 17 com 10 seqüências de nossos estudos, 27 seqüências representando os genótipos de I a IV e uma seqüência de VDEN2 representando o grupo externo foram analisadas pelo método de agrupamentos de vizinhos, formaram subgrupos (clades) dentro do grupo do genotipo III que é representado por seqüências do SriLanka. Estes resultados estão sustentados por 88% do valor de “bootstrap”, que estão listados nos ramos. Na análise de máxima parcimônia obtivemos resultados semelhantes com valores de “bootstrap” de 99%, como pode ser visto na figura 18.

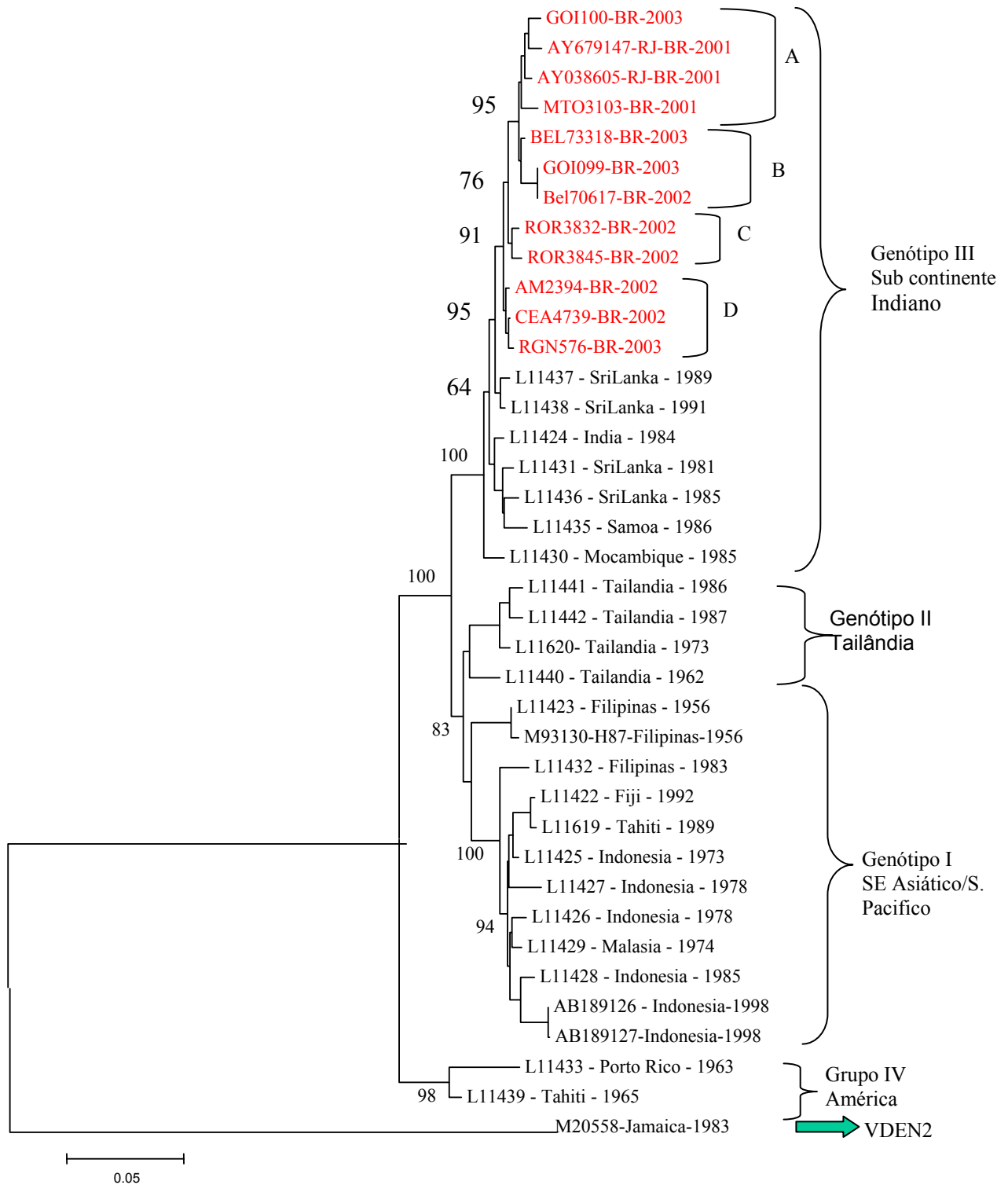


Figura 17 - Análise filogenética dos genes E/NS1 das seqüências de VDEN3. Comparação com 27 seqüências referências dos genótipos de I a IV obtidas no Genbank (número de acesso tabela 04). A análise foi realizada utilizando o método de agrupamentos de vizinhos e a distância nucleotídica calculada pelo método kimura 2 parâmetros. Os valores de "bootstrap" foram calculados após 1.000 pseudoreplicas e estão listados apenas nos ramos principais. A seqüência de VDEN2 M20558 foi usada como grupo externo ("out-group") durante a análise. Os isolados brasileiros analisados neste trabalho estão marcados em vermelho. A barra de escala corresponde a razão de substituição nucleotídica. A distância vertical é apenas ilustrativa. .

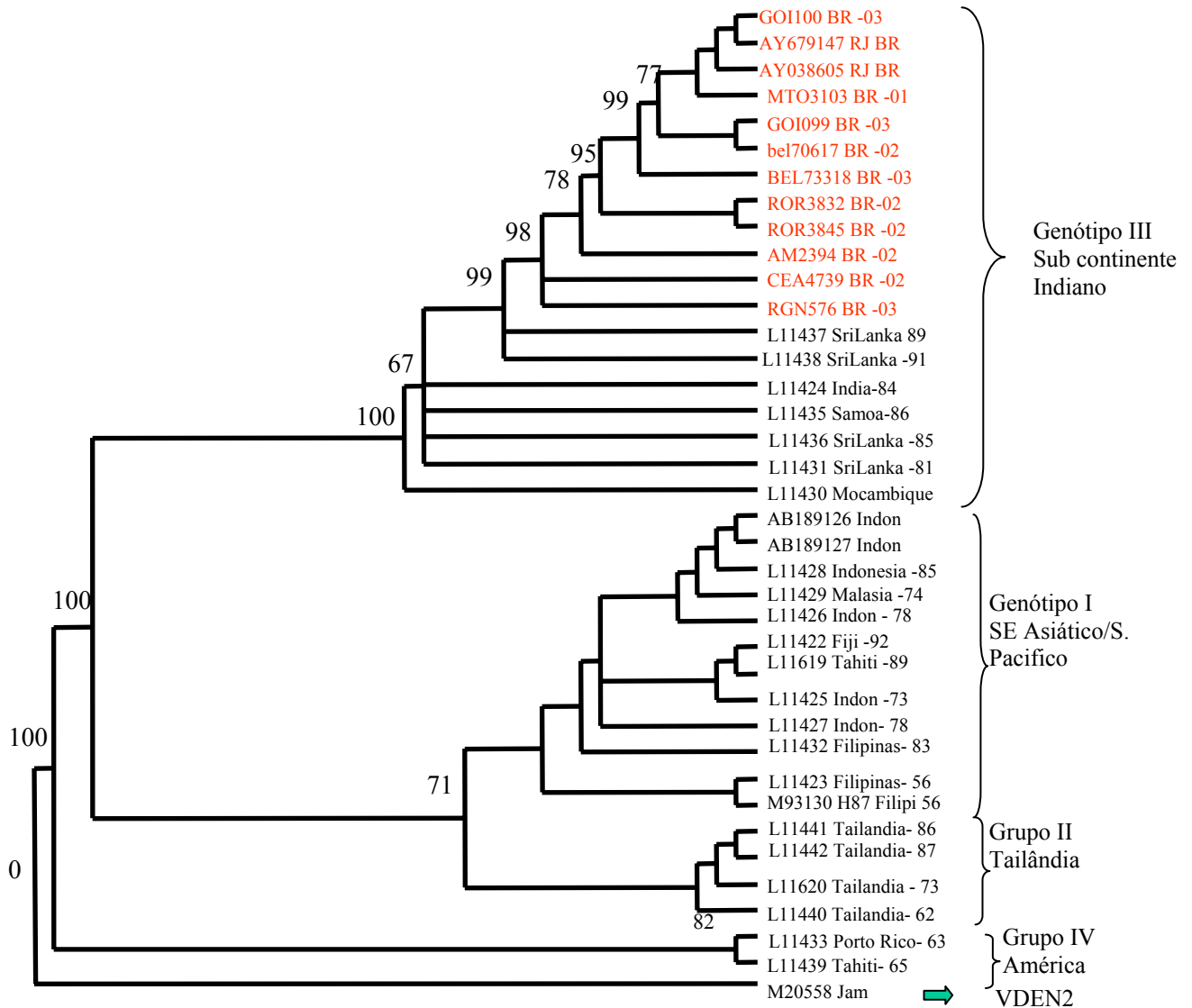


Figura 18: Análise filogenética parcimoniosa dos genes prM/E/NS1 das amostras de VDEN3. Comparação com 27 seqüências referências dos genótipos de I a IV obtidas no genbank/ncbi/nlm/nih/gov (número de acesso tabela X). A análise heurística foi realizada no PAUP, baseada em 1977 nucleotídeos (comprimento da árvore = 1402, índice de consistência = 0.71, índice de retenção= 0.80, (gap tratado como dado extraviado). Numeros acima dos ramos correspondem ao valor de "bootstrap" (após 1000 pseudoreplicas). A seqüência de VDEN2 M20558 foi usada como grupo externo ("out-group") durante a análise. Os isolados brasileiros analisados neste trabalho estão marcados em vermelho. A barra de escala corresponde a razão de substituição nucleotídica. A distância vertical é apenas ilustrativa.

6- RESULTADOS

Parte II - Estudo de neurovirulência do VDEN 2 isolado de paciente com mielite transversa.

6.1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DO CASO CLÍNICO

Um caso de febre clássica de dengue foi descrito em paciente masculino de 58 anos de idade que desenvolveu quadro febril acompanhado de trombocitopenia complicado com envolvimento neurológico caracterizado por mielite transversa, à qual se seguiu de fraqueza em ambos os membros inferiores e paralisia flácida. A força muscular do paciente ficou bastante diminuída e arreflexia bilateral também foi observada. Tal quadro sugere um efeito do vírus no sistema nervoso e mais diretamente no sistema neuro-motor. O vírus de sorotipo dengue 2 (VDEN2), Bel61082 foi isolado do soro e o paciente apresentou soro-conversão em testes de inibição de hemaglutinação e IgM-ELISA. Da mesma amostra de soro da fase aguda da qual o vírus foi isolado, teste de RT-PCR foi positivo para VDEN2. O teste de detecção do RNA viral por RT-PCR foi igualmente positivo utilizando o sobrenadante da cultura de C6/36 positiva para VDEN2 por IFI, mas foi negativo usando-se o líquido cefalo-raquidiano (LCR) obtido com 12 dias de doença. Nenhum outro agente infeccioso foi isolado ou identificado em testes sorológicos utilizando as amostras séricas e o LCR. O paciente foi hospitalizado por três semanas, tendo recebido alta do quadro de dengue ainda com problemas da paralisia que foi sanada após seis meses do início da infecção pelo VDEN2 (Leão *et al.*, 2002). Não foi determinado se o quadro clínico refere-se a uma alteração das propriedades biológicas do vírus, ou se as características genéticas do indivíduo conferiram uma susceptibilidade incomum, como sugerido para as reações adversas graves com vírus vacinal da FA, cepa 17DD (Galler *et al.*, 2001). No que se refere às características virais verificamos sua capacidade de replicação em diversos sistemas experimentais que poderiam evidenciar seu neurotropismo acentuado. Realizamos também o sequenciamento nucleotídico de parte do genoma viral codificando as proteínas do envelope viral, as quais são responsáveis pelo tropismo do vírus.

6.1.1- Infecção experimental em camundongos.

Praticamente, todos os arbovírus mostram-se patogênicos para camundongos recém-nascidos, quando inoculados pela via intracerebral, ocasionando principalmente um quadro de encefalite. Depois do sistema nervoso, o fígado é comumente o segundo alvo de agressões desses vírus (Dias, 1986). Inúmeros vírus são letais para camundongos adultos, podendo sê-los também para hamsters e cobaias. Variantes de um mesmo tipo de vírus podem exibir diferentes graus de virulência para os animais de laboratório (Travassos da Rosa *et al.*, 1997; Beaty *et al.*, 1989). Dessa forma iniciamos nossos estudos utilizando camundongos albinos suíços recém-nascidos (3-4 dias) como modelo experimental animal, para verificarmos se a amostra viral em estudo apresentava grau acentuado de neurovirulência quando comparado à amostra selvagem de VDEN2.

Foram realizados quatro experimentos com infecções em momentos distintos, utilizando-se suspensão com as amostras virais BEL61082, 44/2 e NGC. Nestes experimentos os animais foram observados por 21 dias para sinais de paralisia ou morte. À medida que os animais adoeceram ou ao final do período de observação de 21 dias, os cérebros e fígados foram utilizados individualmente para a preparação de suspensão cerebral. Já no quarto e último experimento os animais foram sacrificados diariamente nos 8 primeiros dias com uma última coleta no 21º dia p.i. para acompanharmos à cinética da replicação viral. A detecção de vírus foi realizada por RT-PCR na suspensão cerebral e hepática.

Os camundongos infectados com o vírus BEL61082 e 44/2 não apresentaram sinal aparente de doença; aqueles infectados com o vírus controle (vírus VDEN2 NGC neuro adaptado) apresentaram sinais de distúrbios neurológicos, paresia (paralisia dos membros superiores e inferiores) e encefalite a partir do quarto dia da inoculação. Os animais que foram inoculados com o diluente PBS+BSA não mostraram quaisquer sinais de alterações neurológicas (Tabela 19).

Ao final dos experimentos, os animais restantes foram sacrificados para a retirada do cérebro e do fígado para preparo de suspensões, os RNAs

extraídos e realizados os testes de RT-PCR para os quatro sorotipos de VDEN. As amostras provenientes de fígado dos animais inoculados foram todas negativas.

No entanto, foi detectado RNA viral nas amostras de cérebro dos animais que foram inoculadas com os vírus BEL61082 e NGC, a partir de 96 h (quarto dia) pós-infecção (p.i.). Nos grupos inoculados com o vírus VDEN2 44-2 e diluente (PBS+BSA) não foi detectado ácido nucléico (Figura 19).

Tabela 19: Análise de amostras de cérebro de camundongo inoculadas com variantes do VDEN2

Amostras analisadas								
	Nova Guiné C		Bel61082		44/2		Controle negativo camundongo	
Dia	Sinais clínicos	RT-PCR	Sinais Clínicos	RT-PCR	Sinais Clínicos	RT-PCR	Sinais Clínicos	RT-PCR
1	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo
2	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo
3	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo
4	+	VDEN2	0	VDEN2	0	Negativo	0	Negativo
5	+	VDEN2	0	VDEN2	0	Negativo	0	Negativo
6	+	VDEN2	0	VDEN2	0	Negativo	0	Negativo
7	-	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo
8	-	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo
21	-	Negativo	0	Negativo	0	Negativo	0	Negativo

Legenda: 0= sem sinal de doença; += sinais de distúrbios neurológicos; -= encerrado; Negativo= sem amplificação genômica.

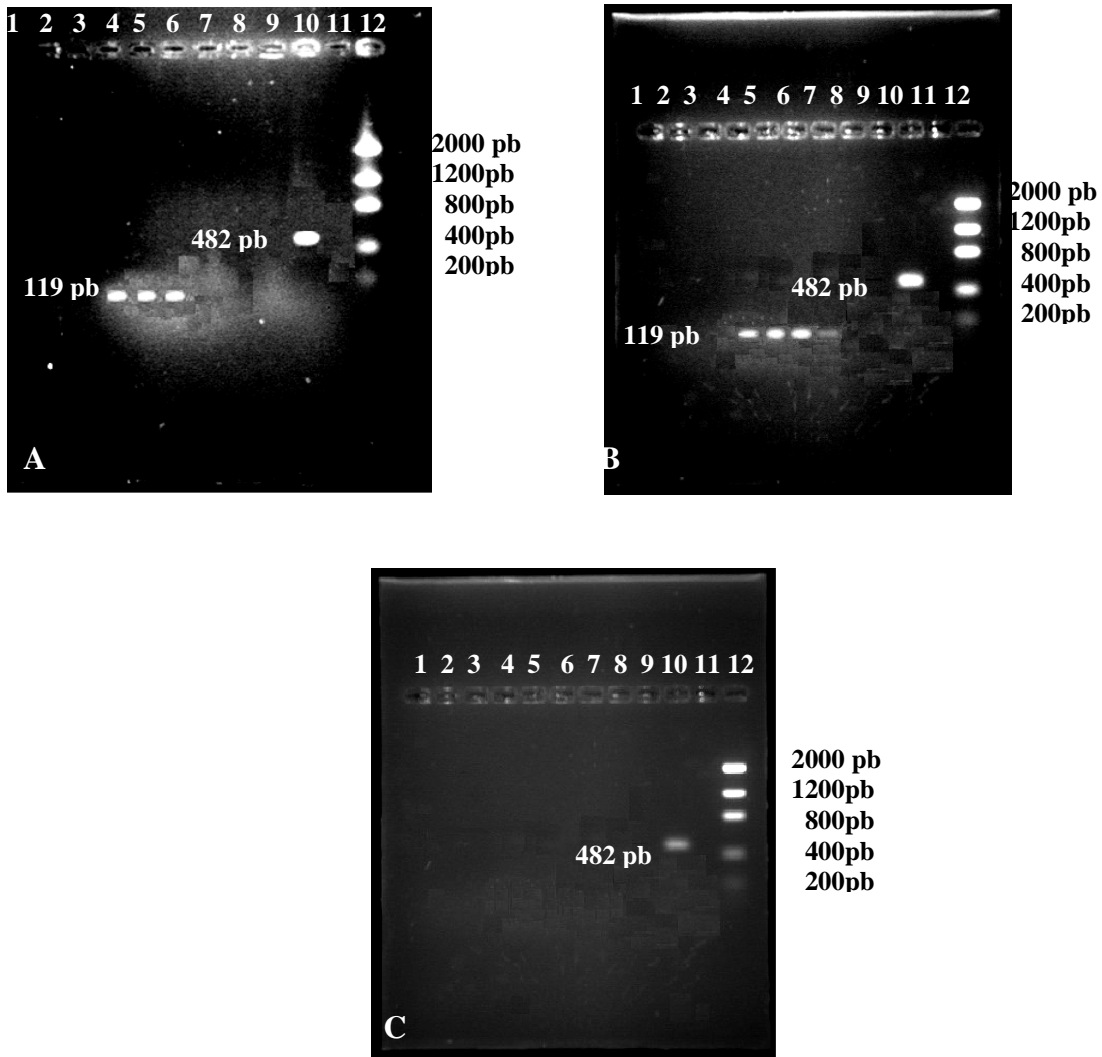


Figura 19- Análise por RT-PCR das suspensões de cérebro inoculados com VDEN2. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. A- Amplicons obtidos da cinética de suspensão de cérebros de camundongos albinos suíços, infectados com o vírus BEL 61082 (DENV 2). Os resultados estão distribuídos como segue: Faixas 1- 24 h; 2- 48 h; 3- 72 h; 4- 96 h; 5- 120 h; 6- 144 h; 7- 168 h; 8- 192 h; 9- 508 h; 10- Controle VDEN1 (Mochizuki 96 h p.i.); 11- controle negativo 24h e 12- Peso molecular/Low DNA mass. B- Amplicons obtidos da cinética de suspensão de cérebros de camundongos albinos suíços, infectados com o vírus NGC (VDEN2). Os resultados estão distribuídos como segue: Faixas 1- 24 h; 2- 48 h; 3- 72 h; 4- 96 h; 5- 120 h; 6- 144 h; 7- 168 h; 8- 192 h; 9- 508 h; 10- Controle VDEN1 (Mochizuki 96 h p.i.); 11- Mock 24h e 12- Peso molecular/Low DNA mass. C- Amplicons obtidos da cinética de suspensão de cérebros de camundongos albinos suíços, infectados com o vírus 44/2 (VDEN2). Os resultados estão distribuídos como segue: Faixas 1- 24 h; 2- 48 h; 3- 72 h; 4- 96 h; 5- 120 h; 6- 144 h; 7- 168 h; 8- 192 h; 9- 508 h; 10- Controle VDEN1 (Mochizuki 96 h p.i.); 11- Mock 24h e 12- Peso molecular/Low DNA mass.

6.1.2- Infecção em cultura primária de astrócito de camundongo recém nascido

Os resultados de nossos experimentos indicaram a capacidade do vírus Bel61082 de replicar-se no SNC de camundongo após a inoculação IC, embora sem causar encefalite como a cepa NGC neuro adaptada. Utilizamos este mesmo painel de vírus VDEN2 para estudarmos sua replicação em células neuronais e gliais mantidas em cultura, para evidenciarmos o neurotropismo acentuado do vírus Bel61082. As culturas usadas foram de neurônios e astrócitos de rato ou camundongo em cultura primária, e como representante de células da glia humana uma linhagem de glioblastoma humano U87 (ATCC).

Culturas primárias de astrócitos de camundongos foram infectadas e observadas diariamente por um período de 12 dias para verificação da presença ou ausência de efeito citopático (ECP). Foram realizados quatro experimentos utilizando-se as amostras virais BEL61082, 44/2 e NGC. A fixação de células de cada experimento foi realizada 5, 7, 9 e 12 dias p.i. e em seguida preparadas lâminas para teste de IFI. A presença de ECP causado pelos vírus BEL61082 pode ser observada na figura 20, caracterizada pela destruição de astrócitos e conseqüente proliferação da microglia; os demais vírus tiveram resultados semelhantes (dados não mostrados). O efeito citopático já era evidente a partir do quinto dia p.i.. A principal característica das células infectadas é a intensa proliferação de microglia (marcada pelo quadrado) como se recrutada devido a infecção das culturas de astrócitos. Os outros 3 experimentos deram resultados semelhantes (dados não mostrados).

Dada a observação da afinidade BEL61082 por astrócitos partimos para o estudo de infectividade viral para cultura primária de neurônios de rato. Essa decisão foi tomada em função da diversidade celular do SNC e que deveríamos analisar um segundo tipo celular para confirmarmos esse neurotropismo.

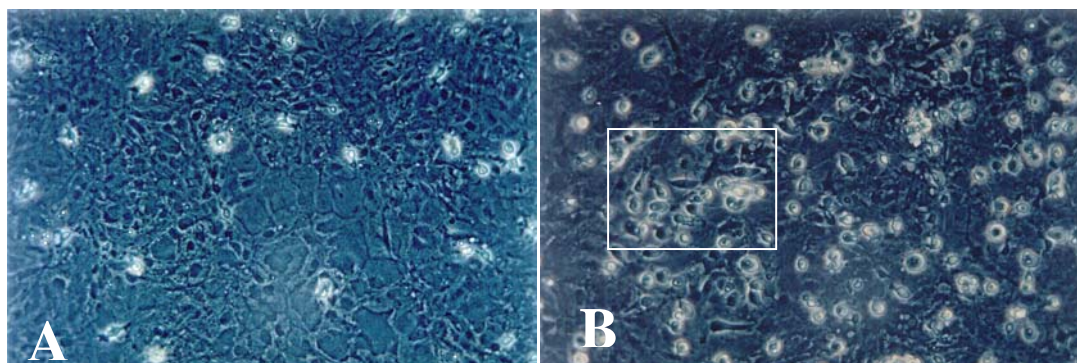


Figura 20 : Fotomicrografia de cultura primária de astrócito de rato infectado e não infectado observadas em microscopia óptica de contraste de fase, o quadrado mostra a intensa proliferação de microglia. A) células não infectadas; B) células infectadas com BEL61082. Objetiva 20X.

6.1.3- Infecção em cultura primária de neurônio de embrião de rato para observação de Efeito Citopático (ECP).

As culturas celulares primárias de neurônios de rato foram infectadas como descrito anteriormente, observadas diariamente por um período de 4 dias para verificação da presença ou ausência de efeito citopático (ECP). O período limite de quatro dias deve-se ao fato que após esse tempo há intensa destruição celular pelo vírus. Foram realizados dois experimentos com infecções em momentos distintos, utilizando-se suspensão com as amostras virais BEL61082, 44/2 e NGC. A fixação de células em cada ponto de cada experimento foi feita após 72 e 96 horas p.i. Em seguida foram preparadas lâminas para teste de imunocitoquímica por IFI e os resultados quantitativos da mesma serão apresentados posteriormente. A presença de ECP pode ser observada na figura 21B, C e D.

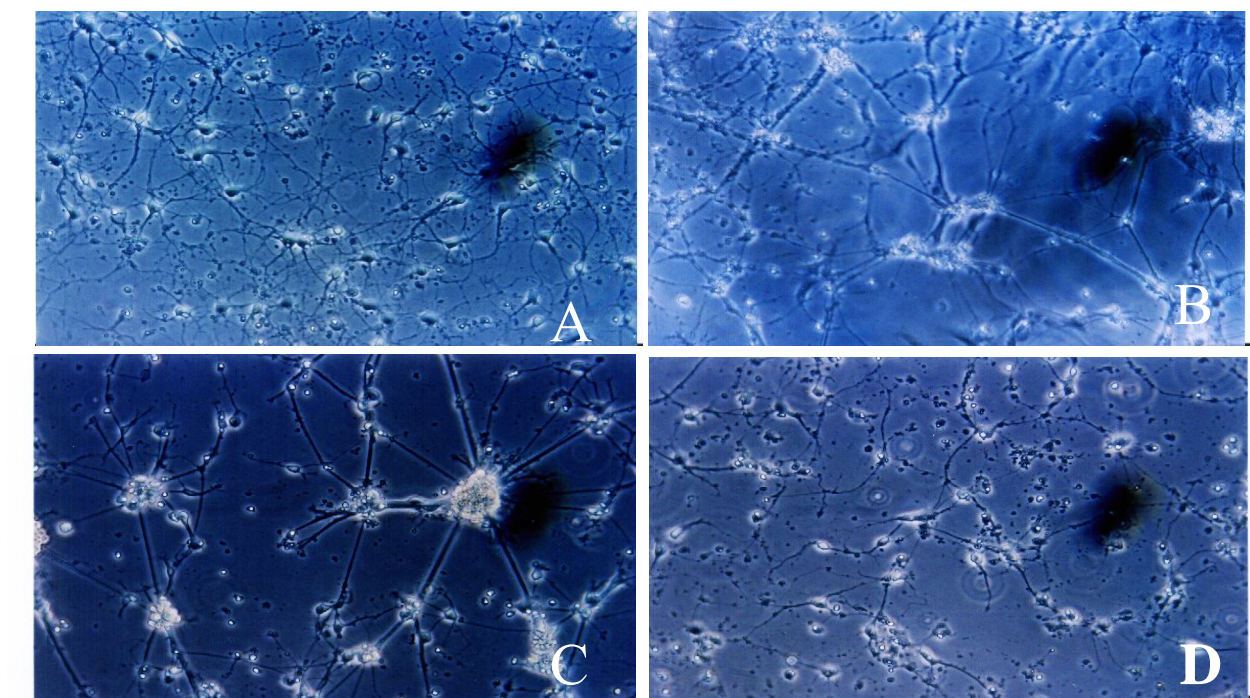


Figura 21 : Fotomicrografia de cultura primária de neurônio de rato infectado e não infectado observadas por microscopia óptica de contraste de fase. A) células não infectadas; B) células infectadas com vírus BEL61082; C) células infectadas com vírus DENV2 NGC; e D) células infectadas com o vírus 44/2 (objetiva 20x).

6.1.4- Análise de imunocitoquímica por IFI das culturas primárias de neurônios de ratos infectados com *Flavivirus*.

Como marcador de células neuronais nas culturas primárias foi utilizado anticorpo específico para beta tubulina III (Gomes *et al* 1999), uma proteína de microtúbulos presente somente em neurônios (Moura Neto *et al.*, 1983), a qual sustenta os prolongamentos neuronais (neuritos). Os antígenos foram detectados com anticorpo policlonal específico para VDEN2 ou febre amarela. Os núcleos neuronais foram contra corados com DAPI e as células foram examinadas por microscopia óptica de contraste de fase. Na Figura 22B vemos os controles de células não infectadas 72 H p.i., que mostram a imunomarcação de neurônios com fluoresceína acoplada ao anticorpo secundário, enquanto que a Fig 22C mostra os núcleos neuronais revelados por DAPI. Como se pode ver em Fig.22A a cultura de células não infectada não apresentou marcação com o fluorocromo da rodamina, acoplado ao anticorpo secundário usado contra o vírus. As células não infectadas 96 H p.i., não estão mostradas.

Nossas culturas também aparecem virtualmente puras para neurônios, uma vez que não há a presença de células gliais do tipo astrócito, considerando-se a ausência de marcação para GFAP (“glial fibrillary acidic protein”), ou ainda a ausência de marcação imunocitoquímica para vimentina que poderia indicar outro tipo celular contaminante (dados não apresentados). Observa-se facilmente que os núcleos neuronais são efetivamente grandes (Fig.22B) de formas ligeiramente elipsóides, circundados por citoplasma, este nem sempre de grande volume. Observa-se ainda que os neurônios estejam formando pequenos agregados celulares, dos quais partem longos neuritos que tanto poderiam ser axônios como dendritos os quais não foram definidos por marcadores específicos. Estes neuritos são longos, por vezes ramificados e também às vezes mostrando alguns pontos de varicosidades, talvez correspondendo a pontos de onde pudessem partir ramificações. As culturas eram viáveis com ganho de complexidade dos neurônios, mesmo por tempos superiores de 72 a 96 horas, após plaqueamento. Algumas raras células morriam, ou por apoptose ou até mesmo por necrose e seus núcleos apresentavam de tamanhos reduzidos.

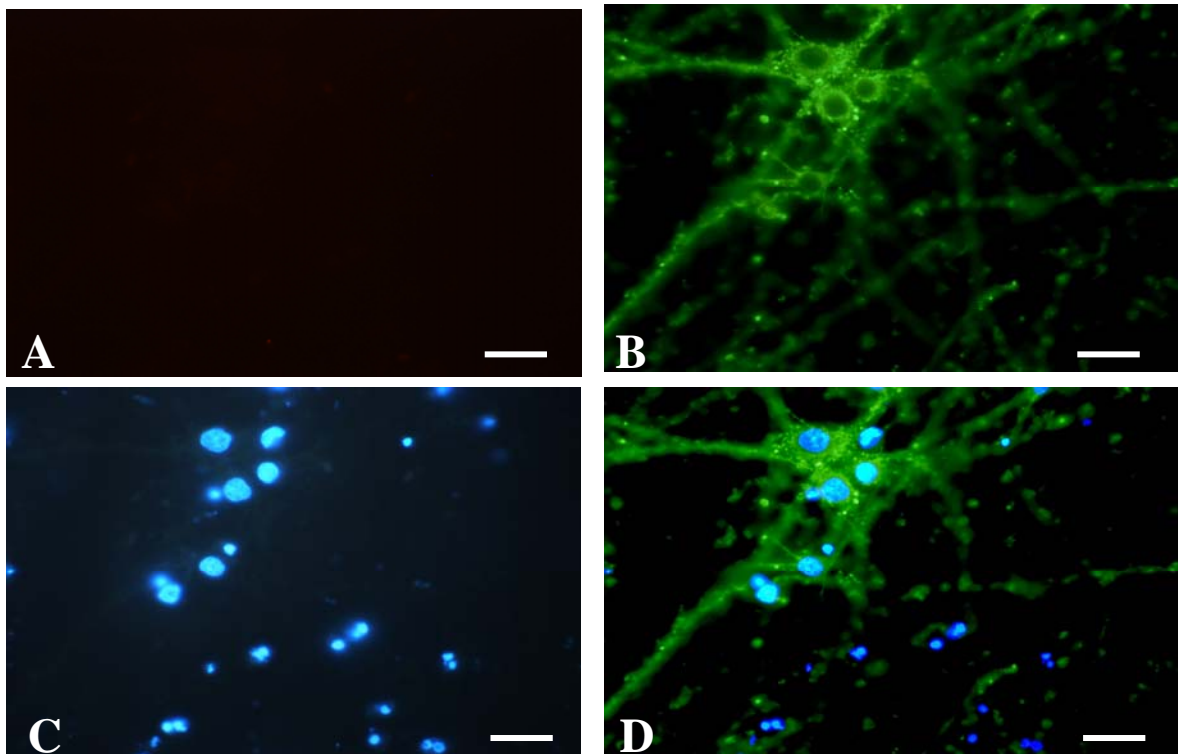


Figura 22: Fotomicrografias de culturas primárias de neurônios de rato não infectados, fixadas com 72 H após plaqueamento observada em microscopia óptica de fluorescência. A) Experimento controle, células não infectadas, marcada com anticorpo primário murino anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina secundário; B) marcação neuronal com anticorpo contra β tubulina III e anticorpo secundário anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens de B-C. As setas em D indicam a presença de varicosidades nos neuritos. Barra= 25 μ m

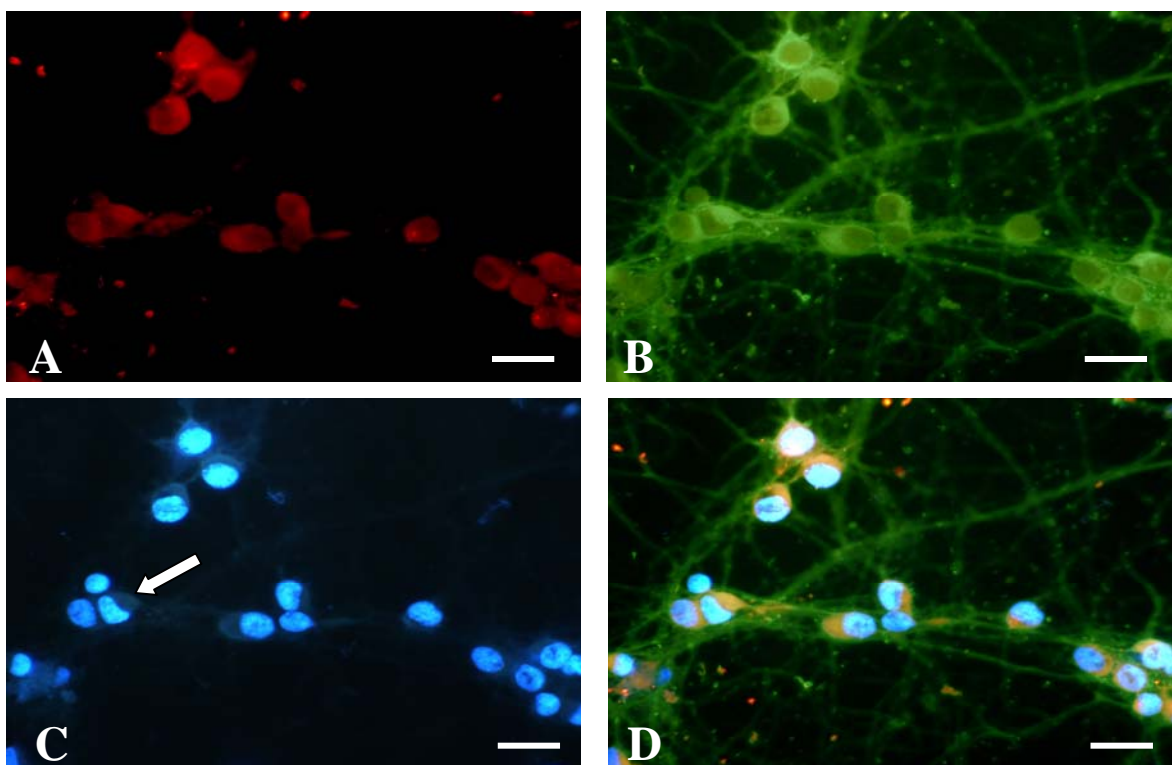


Figura 23: Fotomicrografias de culturas primárias de neurônios de rato infectadas com o vírus 44/2 fixadas com 72 H pós infecção, observada em microscopia óptica de fluorescência. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplada à rodamina; B) marcação neuronal com anticorpo contra β tubulina III e anticorpo secundário anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI, onde se observa condensação da cromatina indicado pela seta; D) superposição de imagens A, B e C, seta indicando tortuosidade nuclear e condensação da cromatina. Barra= 25 μ m.

A fotomicrografia da Figura 23 mostra a presença do vírus 44/2, 72 H p.i. em cultura primária de neurônios de rato e a consequência desta infecção na sobrevivência de neurônios. A infecção com este vírus em neurônios não modificou a morfologia celular, exceto pelo fato de haver maior número de varicosidades e em raras células, deformação da membrana nuclear. A Figura 23A mostra claramente a presença do antígeno viral, detectado pelo seu anticorpo que reagiu com o anticorpo secundário ligado à rodamina. A Figura 23B confirma que estas células são neurônios pela clara marcação com o anticorpo anti-beta tubulina III ligado a fluoresceína. Todas as células neuronais aparecem marcadas e infectadas (compare A e B). Esta afirmativa é confirmada pela Figura 23D que representa a sobreposição das três Figuras 23 (A,B e C). A Figura C representa a marcação dos núcleos neuronais por DAPI, observe a condensação da cromatina mostrada pela seta, onde há alteração da carioteca

com invaginação da membrana. Na Fig 23D a sobreposição permite constatar a marcação de cor alaranjada devido a superposição dos corantes vermelho e verde no citoplasma celular representando o vírus ligado ao anticorpo específico anti-DENV2 marcado com o conjugado anti-camundongo acoplado a rodamina.

Como se pode observar nas Figuras 23C–D os núcleos apresentam deformação quando comparados a figura 22. Há uma tortuosidade nítida da membrana nuclear, o que parece indicar uma hiperatividade metabólica. Também, o volume nuclear está ligeiramente alterado, verificando-se que ele tem forma arredondada, envolvido por citoplasma de configuração ovóide.

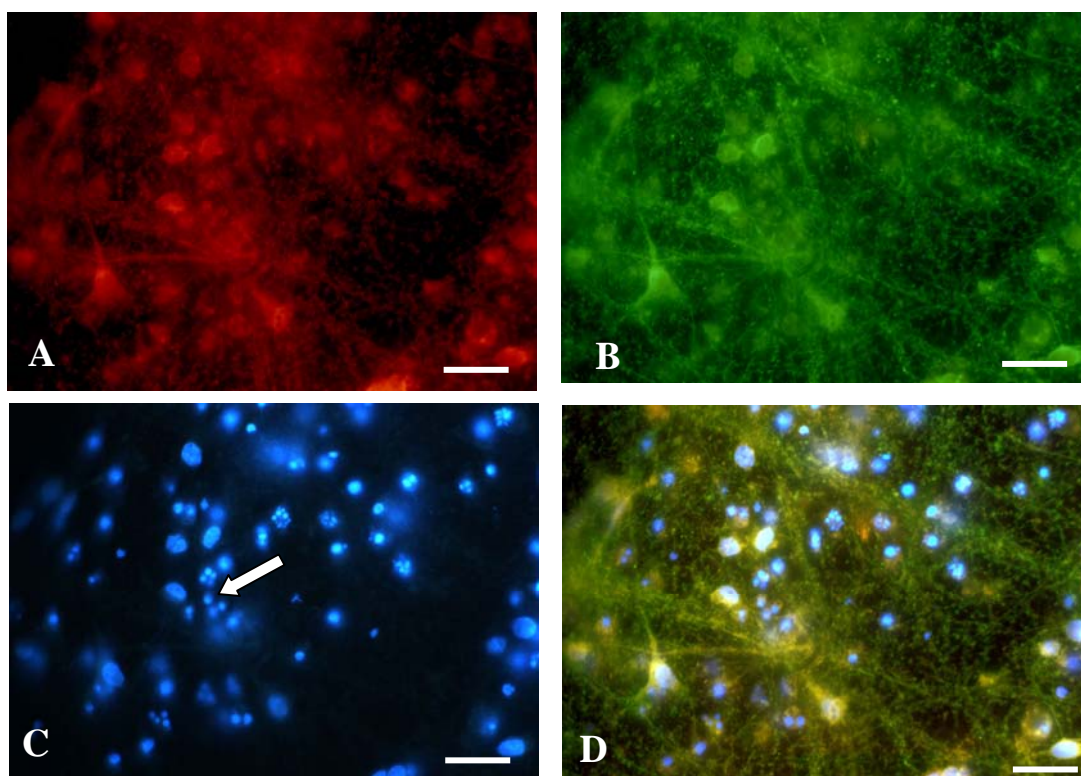


Figura 24: Fotomicrografias de culturas primárias de neurônios de rato infectadas com o vírus 44/2 fixados com 96 H pós infecção, observada em microscopia óptica de fluorescência. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação neuronal com anticorpo contra β tubulina III e anticorpo secundário anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI, pode ver condensação da cromatina (seta); D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m

A fotomicrografia, figura 24, mostra a presença do vírus 44/2, 96 H p.i. em cultura primária de neurônios de rato, e os efeitos ocasionados por eles. Podemos observar um aumento da proliferação viral como pode ser constatado

com o aumento da cor alaranjada nos corpos neuronais (Fig. 24A e D). Na figura 24B é mostrada uma intensa varicosidade nos neuritos (Fig. 24B e D), presença de condensação da cromatina, diminuição do volume nuclear quando comparamos com a figura 23C. Ainda podemos ver destruição celular após 96 H p.i.

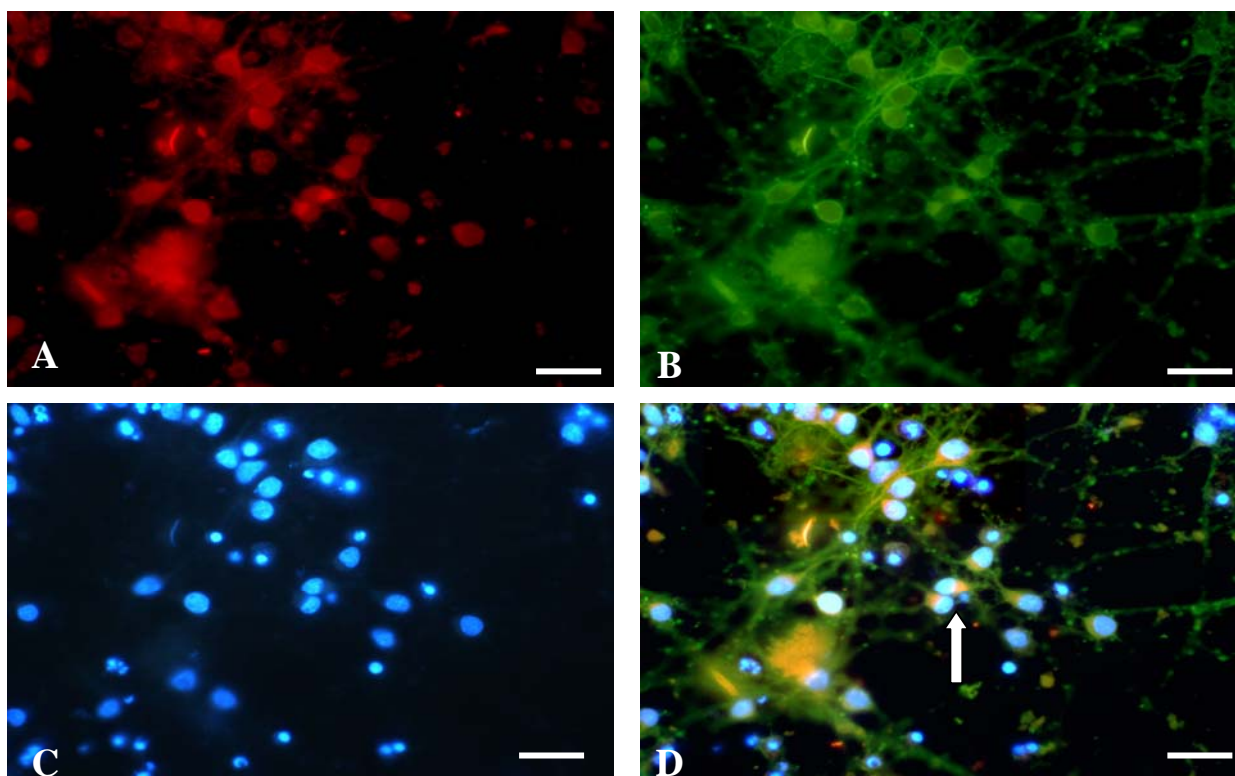


Figura 25: Fotomicrografia de culturas primárias de neurônios de rato, infectadas com o vírus Bel61082 fixadas com 72 H pós infecção observada em microscopia óptica de fluorescência e apresentando dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação neuronal com anticorpo contra β tubulina III e anticorpo secundário anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI, observa-se condensação da cromatina; D) superposição de imagens A, B, C. A flecha indica uma irregularidade na forma nuclear, com a marcação citoplasmática (laranja) indicadora da presença do vírus. Barra= 25 μ m

A Figura 25 mostra a infectividade da amostra viral BEL 61082, 72 H p.i. para neurônios de ratos em cultura primária. Como pode ser observada pelo exemplo na indicação da seta branca, podemos constatar uma grande quantidade de células marcadas com anticorpo anti-VDEN2 no citoplasma celular e uma evidente alteração na forma dos núcleos, que vem de arredondada (fig. 25) a formas irregulares. Também é possível perceber um

número muito maior de varicosidade de seus neuritos comparativamente ao que se descreveu para cultura tomada como controle, Figura 22.

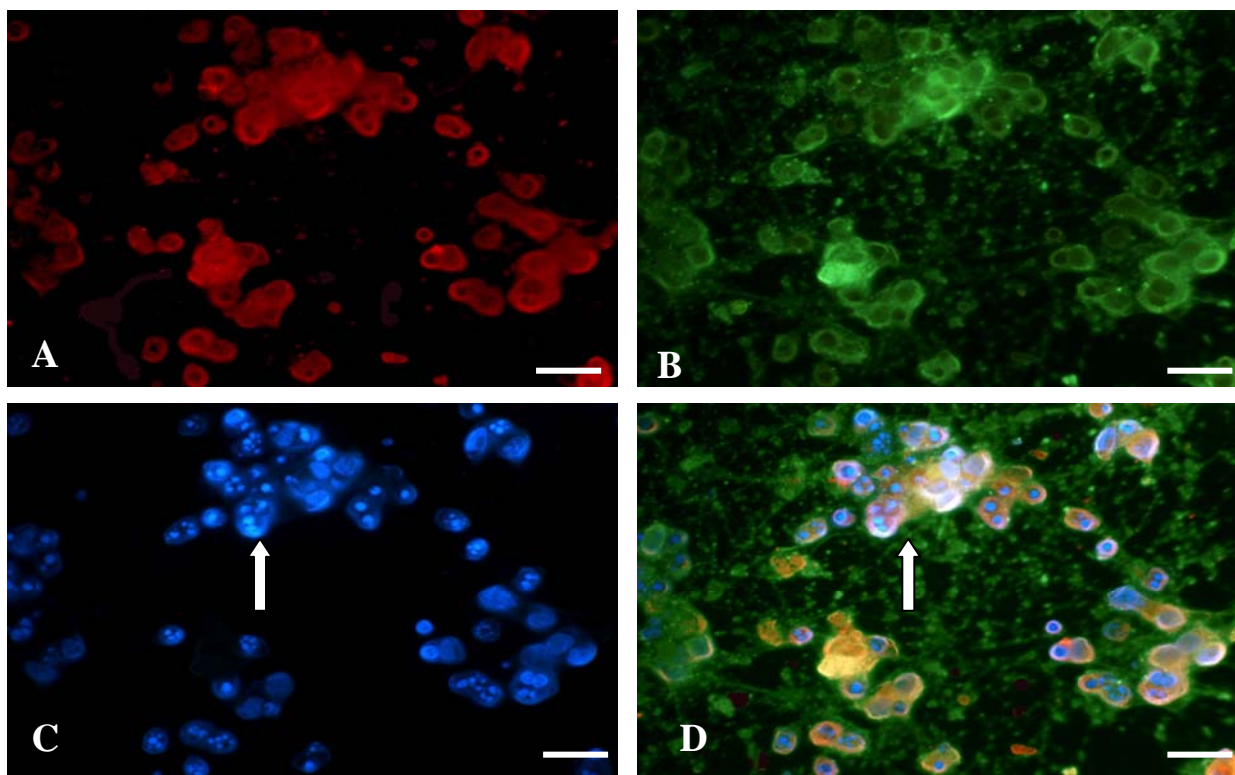


Figura 26: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus Bel61082 colhido com 96 H pós infecção, observada em microscopia óptica de fluorescência e apresentando dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplada à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

Aumentado o tempo de cultura de neurônios submetidos à infecção pelo vírus Bel61082, para 96 h, pudemos constatar um dramático efeito morfogenético em consequência da infecção viral. De fato a presença do vírus Bel61082 nos neurônios parece aumentar o volume celular como um todo, as células têm uma aparência quase normal, pelo visto nas Figuras 26A e B, entretanto, a marcação nuclear com DAPI deixa ver com clareza uma intensa fragmentação nuclear representada por pequenas figuras de cromatina condensada (observe o exemplo indicado pela seta branca) no interior de uma mesma célula. Esta figura nuclear tão típica de apoptose parece sugerir que o efeito dramático de Bel61082 é principalmente apoptótico. A evidência destes condensados de cromatina é mais bem visualizada na Fig. 26D, onde sobreposamos as três imagens da mesma figura. Há de fato uma visível

destruição de células e, sobretudo constata-se uma perda de neuritos, com neurônios sem prolongamentos.

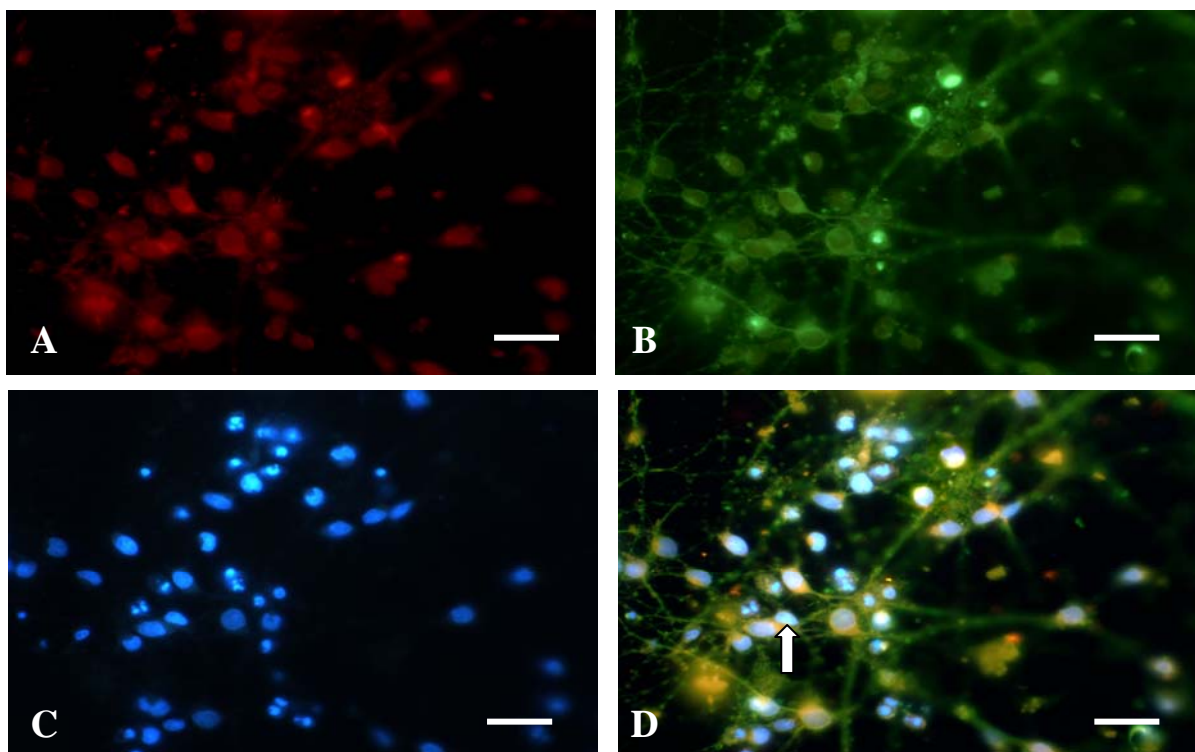


Figura 27: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus NGC colhido com 72 H pós infecção, observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra β tubulina III com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI e presença de condensação da cromatina; D) superposição de imagens A, B e C. A flecha indica a presença de partículas virais. Barra= 25 μ m.

A infectividade do vírus VDEN2 NGC 72 H p.i., para cultura primária de neurônios de ratos pode ser visualizada na Figura 27. Pode-se observar nessa figura, que embora a detecção dos antígenos virais (A) e neuronais (B) tenham sido possíveis, há poucas células viáveis sobreviventes, poucos neurônios e ainda mostram presença de neuritos. Os núcleos marcados com DAPI na Figura 27 C mostram que são realmente muito menores do que aqueles encontrados nas células infectadas pelos demais vírus comentados acima. Após 72 horas de infecção, a característica de núcleo apoptótico é predominante.

A progressão do tempo de cultura para 96 horas intensifica o efeito letal deste vírus sobre as células neuronais. Embora os campos mostrados na Figura 28 C e D parecem sugerir a presença de neuritos, eles também

demonstram que estes neuritos estão fragmentados e as células bem destruídas com a cor alaranjada da sobreposição de imagens em (D) mostrando a grande quantidade de antígeno viral. Trata-se de vírus adaptado ao sistema nervoso e isto explica o seu grau de infectividade elevado, com morte das células desde 72 horas após infecção.

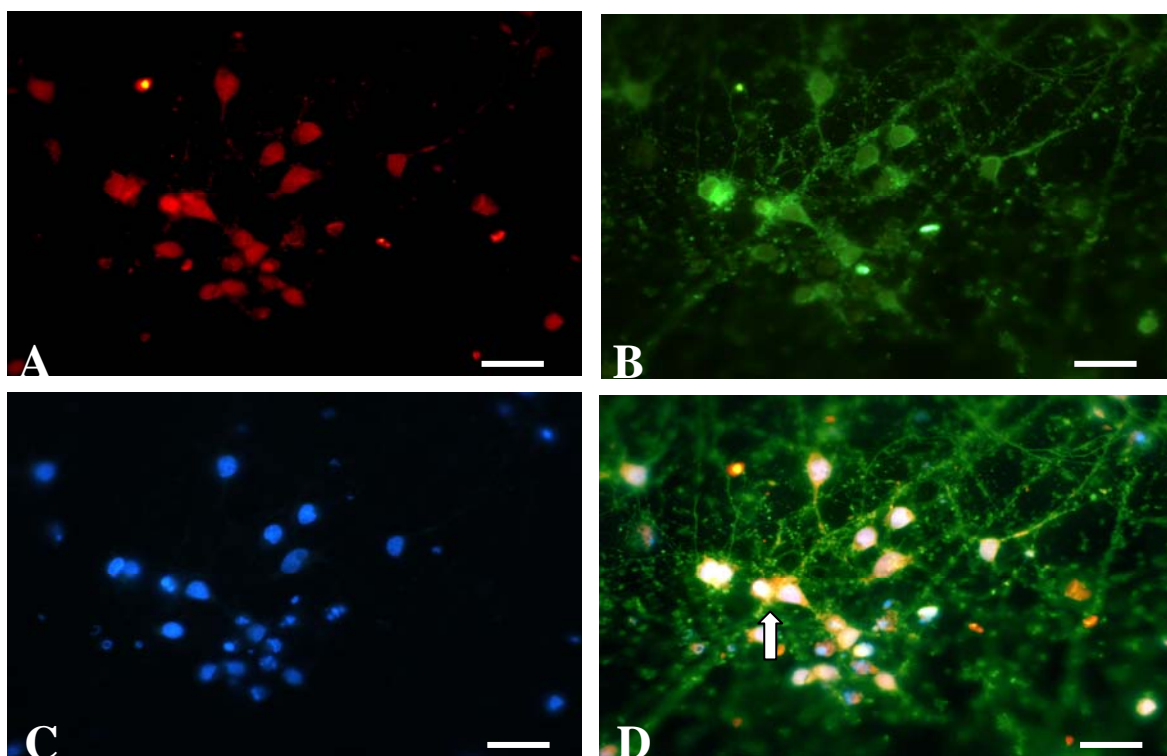


Figura 28: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus NGC colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

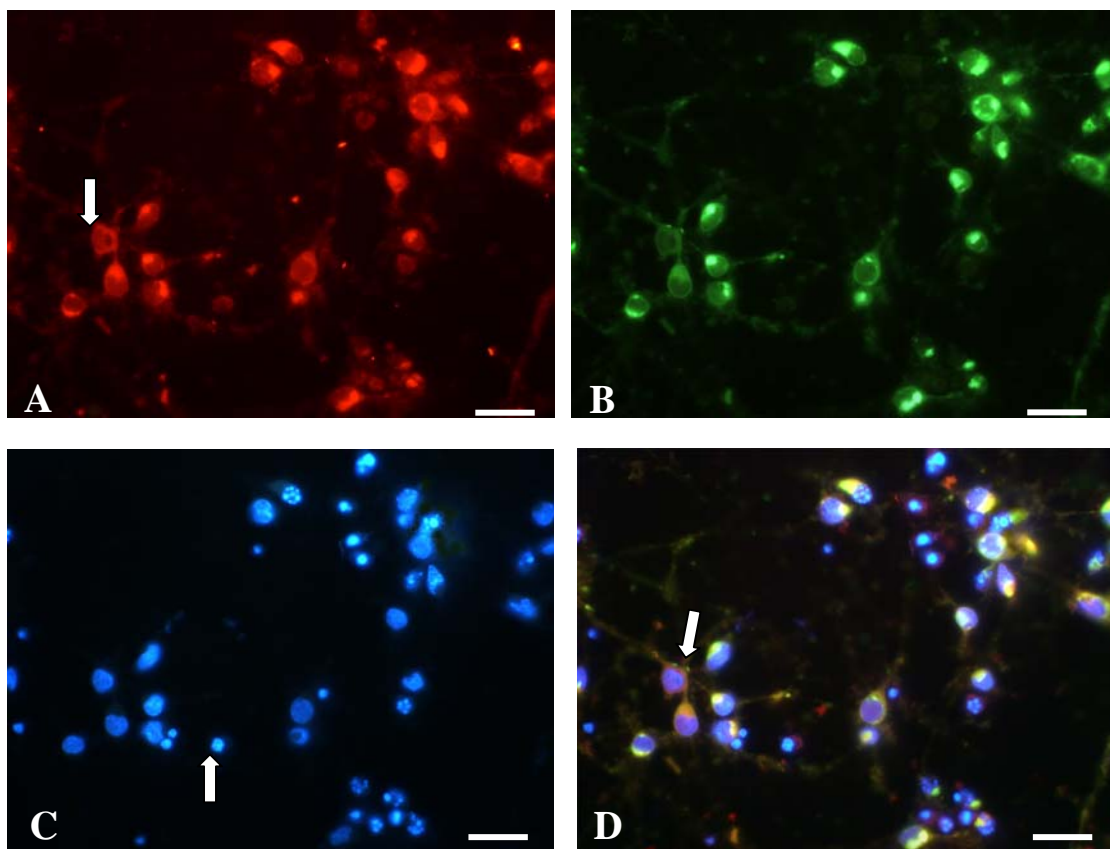


Figura 29: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus 17DD colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. As setas mostram marcação do vírus e núcleo picnótico. Barra= 25 μ m.

Com objetivo de analisar comparativamente a amostra em estudo com outros *flavivirus* que tenham características de neurovirulência, realizamos também ensaios com o vírus vacinal 17DD e um vírus quimérico 17D-D2, para que pudéssemos ter um perfil de patogenicidade e virulência, além de controles de neurovirulência. Os resultados estão descritos abaixo.

A fotomicrografia, figura 29, mostra a infecção do vírus vacinal VFA, cepa 17DD em células primárias de neurônio de rato, 72 H p.i. Na imagem 29 A e D podemos perceber a presença do antígeno viral, através da coloração vermelha da reação dos anticorpos anti-VFA com o anticorpo anti-camundongo ligado a rodamina (seta). A imagem 29B evidenciou uma modificação na distribuição da proteína β -tubulina nas células infectadas assim como da forma celular que passa a ser esférica. O arranjo difuso citoplasmático da proteína não é mais visto, a proteína se dispõe de forma punctiforme perinuclear. Na imagem 29 D, que é uma superposição das imagens 29 A, B e C, vemos que

há uma intensa destruição celular, onde não evidenciamos a presença dos neuritos (29 B e D). Na figura 29C os núcleos marcados com DAPI apresentam-se com morfologia irregular, com alguns núcleos de tamanho pequeno (seta). Observamos também presença de cromatina condensada que pode sugerir apoptose ou necrose das células infectadas.

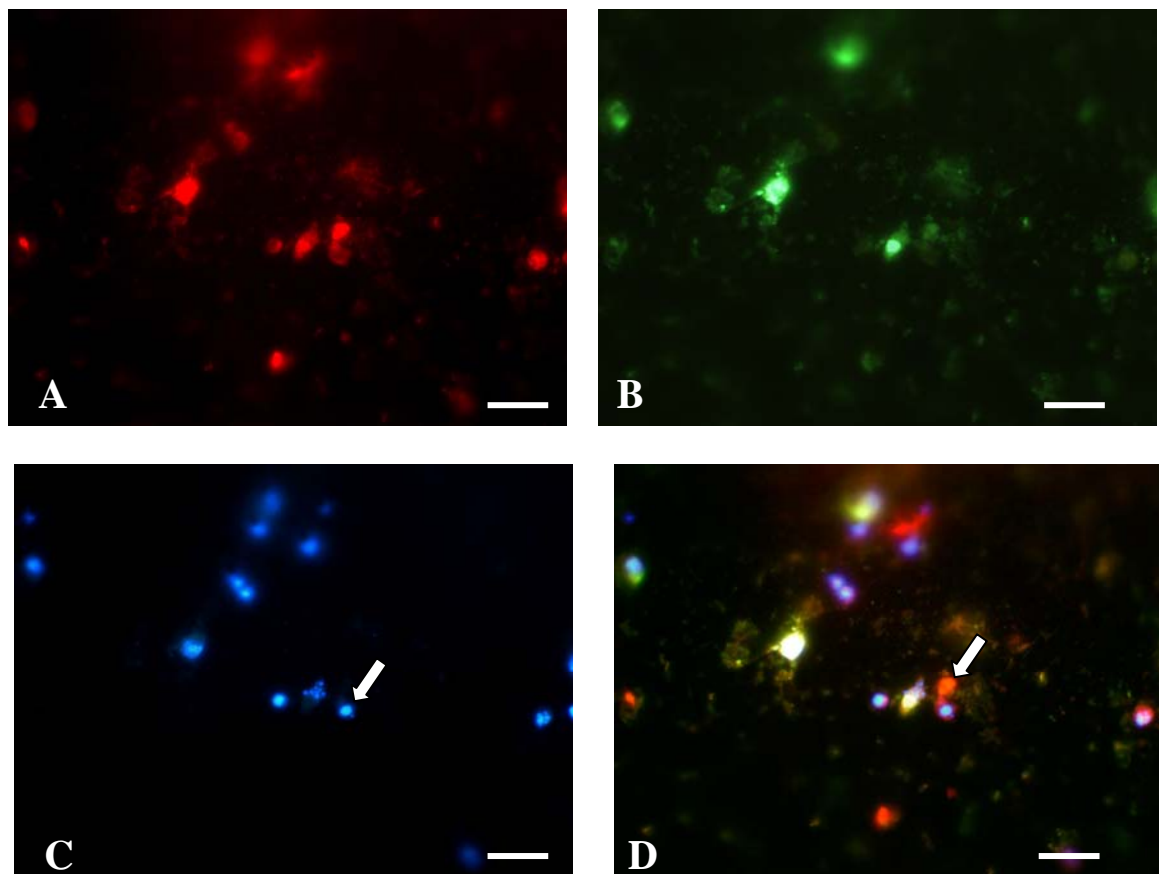


Figura 30: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus 17DD colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. As setas mostram marcação do vírus e núcleo picnótico. Barra= 25 μ m.

Após 96 H de infecção (Figura 30), observamos a total destruição celular dos neurônios infectados com o vírus VFA 17DD, há ainda uma grande redução no tamanho dos núcleos (seta). Mesmo com a vasta destruição das células, ainda podemos ver marcação do antígeno viral com o anticorpo anti-VFA em vermelho (seta) em fragmentos neuronais.

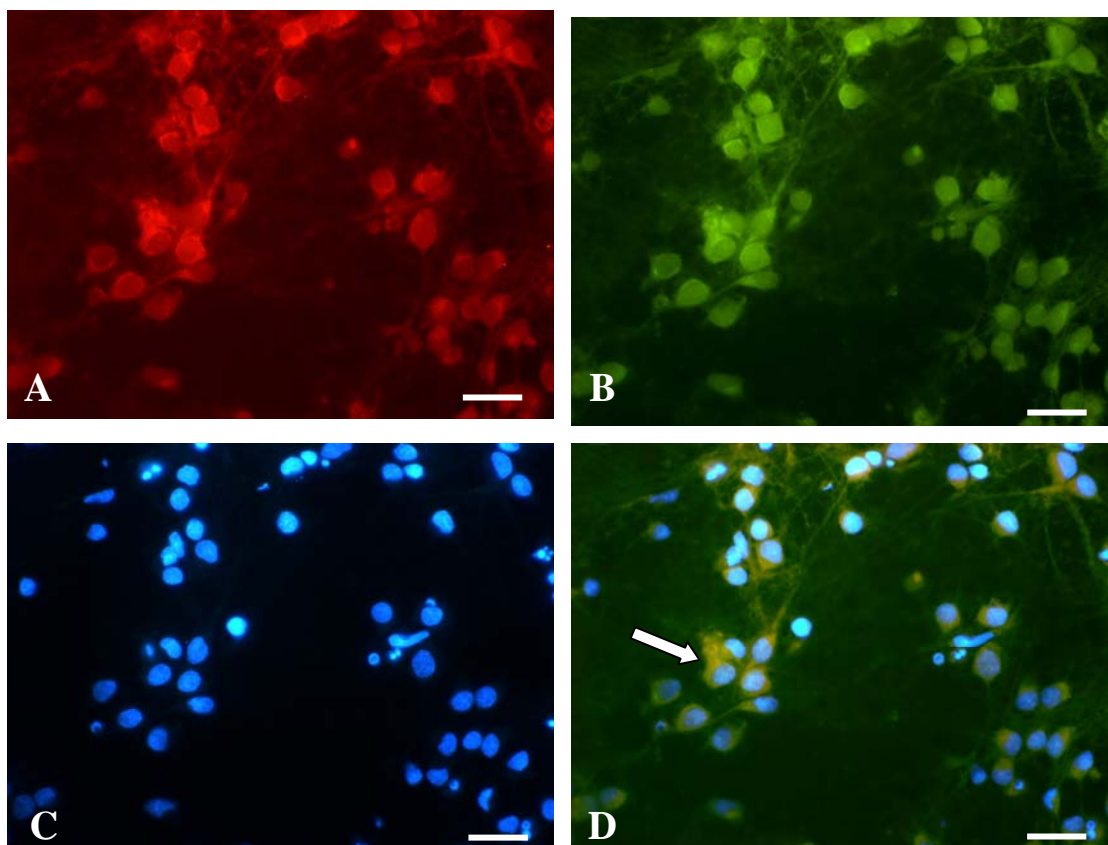


Figura 31: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus 17D/D2 colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VFA/VDEN2 (mistura 1:1) e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

A fotomicrografia, figura 31, mostra as culturas primárias de neurônio de rato infectadas com o vírus quimérico 17D/D2 72 H p.i. Na figura 31 A e D podemos ver a marcação em laranja do vírus com a mistura de anticorpo anti-VFA/VDEN2 (seta branca). A morfologia das células apresenta-se modificada, o corpo celular se torna poligonal, com fragmentação dos neuritos, os núcleos marcados com DAPI mostram-se pouco alterados (figura 31 C). Na figura 32, vemos as mesmas células infectadas 96 H p.i. e observamos uma maior quantidade de células destruídas, com uma baixa marcação do antígeno viral nos neurônios (seta branca) com a mistura de anticorpo anti-VFA/VDEN2 acoplado a rodamina (32 D), Essa destruição pode ser explicado pelo período de sobrevivência dos neuritos em cultura. Não há evidência de apoptose ou mesmo necrose na marcação do núcleo pelo DAPI (Figura 32 C).

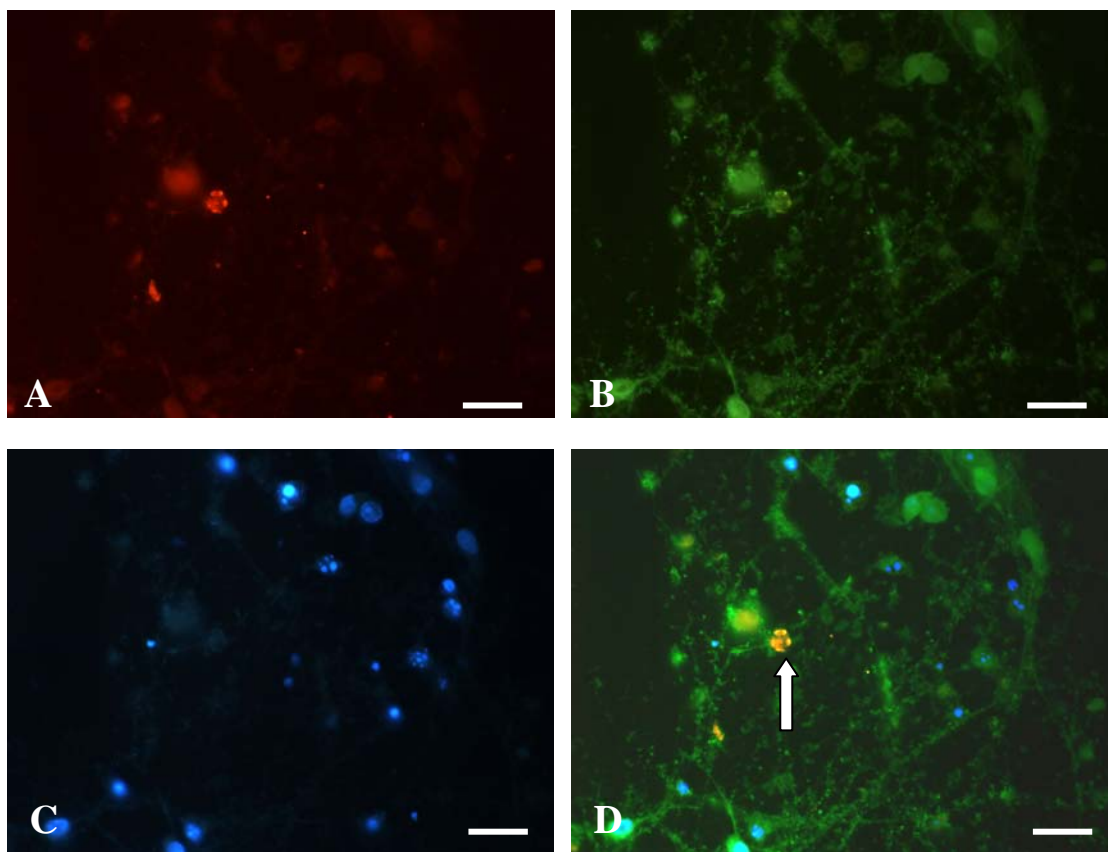


Figura 32: Fotomicrografia de células infectadas com o vírus 17D/D2 colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VFA/VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da β tubulina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μm .

Para interpretar o grau de infectividade de cada uma das cepas virais, nos neurônios em cultura decidimos medir a quantidade de núcleos neuronais fluorescentes (DAPI), representando as células, contra a quantidade de antígeno viral detectado/célula, representada por sua fluorescência no mesmo campo. A relação entre as duas quantidades poderia indicar a eficiência de infecção de um dado vírus para neurônios.

Embora não pudéssemos assegurar quantas partículas estavam presentes por célula, consideramos que seria possível representar a infectividade de cada tipo de vírus para os neurônios, contando o número de células positivas para antígeno viral na premissa de que o mesmo se encontrava no interior das células. A marcação do DAPI que nos permitiu quantificar os núcleos dos neurônios representou o número de células contadas por campo em cada experimento.

A tabela 15 mostra o resultado desta análise. A quantidade de núcleos celulares fluorescentes (DAPI) que representam a população celular e a de

antígenos virais representadas pela marcação com anticorpo anti-VDEN2. O somatório do número de células positivas para o antígeno viral contada em todos os campos, dividido pelo somatório do número de núcleos contados nos campos, nos deu um percentual de infectividade para todos os vírus.

A avaliação das fluorescências de cada estrutura foi realizada em 3 a 5 campos em dois experimentos diferentes. Tomadas as medidas de intensidade para antígeno viral, calculamos a média para todos os vírus, que estão apresentadas na coluna da esquerda, indicada para cada um dos campos.

Como se pode observar na coluna de infectividade, o vírus quimérico 17D/D2 após 72 H de infecção mostrou uma infectividade em torno de 32%. Isto corresponderia a 50% da infectividade do vírus VDEN2 NGC que apresentou 68,01% de infectividade. Essa tabela mostra ainda que os vírus VFA 17DD, VDEN2 44/2 e VDEN2 Bel61082, apresentam infectividade semelhantes (49%, 50% e 54%, respectivamente).

Tabela 20- Análise da quantificação absoluta e percentual da infecção de cada vírus em cultura de células primária de neurônio de rato.

	Células positivas para antígeno viral	Células Totais (DAPI)	Infectividade (%)
Média	77,66667	157,33333	49,68
17DD/72h-A	60	176	34
17DD/72h-B	99	190	52
17DD/72h-C	74	106	69,8
Total	233	472	49,37
Média	78,2	154,8	50,32
44-2/72h-A	84	184	45,65
44-2/72h-B	74	162	45,68
44-2/72h-C	76	175	43,44
44-2/72h-D	76	132	57,57
44-2/72h-E	81	121	67
Total	391	774	50,52
Média	113,2	348,8	32,45
17D-D2/72h-A	70	102	68,63
17D-D2/72h-B	147	539	27,27
17D-D2/72h-C	153	504	30,36
17D-D2/72h-D	141	506	27,87
17D-D2/72h-E	55	93	59,14
Total	566	1744	32,45
Média	102,2	188,4	54,25
Bel61082/72h-A	129	331	38,97
Bel61082/72h-B	117	236	49,58
Bel61082/72h-C	105	127	82,68
Bel61082/72h-E	89	137	64,96
Bel61082/72h	71	111	63,96
Total	511	942	54,25
Média	81,5	119,83333	67,91
NGC/72h-A	84	124	67,74
NGC/72h-A1	96	102	94,12
NGC/72h-B	71	116	61,21
NGC/72h-B1	68	114	59,65
NGC/72h-C	96	136	70,59
NGC/72h-C1	74	127	58,27
Total	489	719	68,01

Obs: As letras representam cada campo analisado para cada vírus.

Na figura 33 representamos os resultados da tabela 15 de forma gráfica. Os resultados sugerem que os neurônios de rato são mais permissivos à infecção por VDEN2 NGC neuro adaptado, e menos para o vírus quimérico 17D-D2 com permissividade intermediária para os outros três vírus (BEL61082, 44/2 e 17DD). A baixa quantidade da amostragem impossibilitou uma análise de significância.

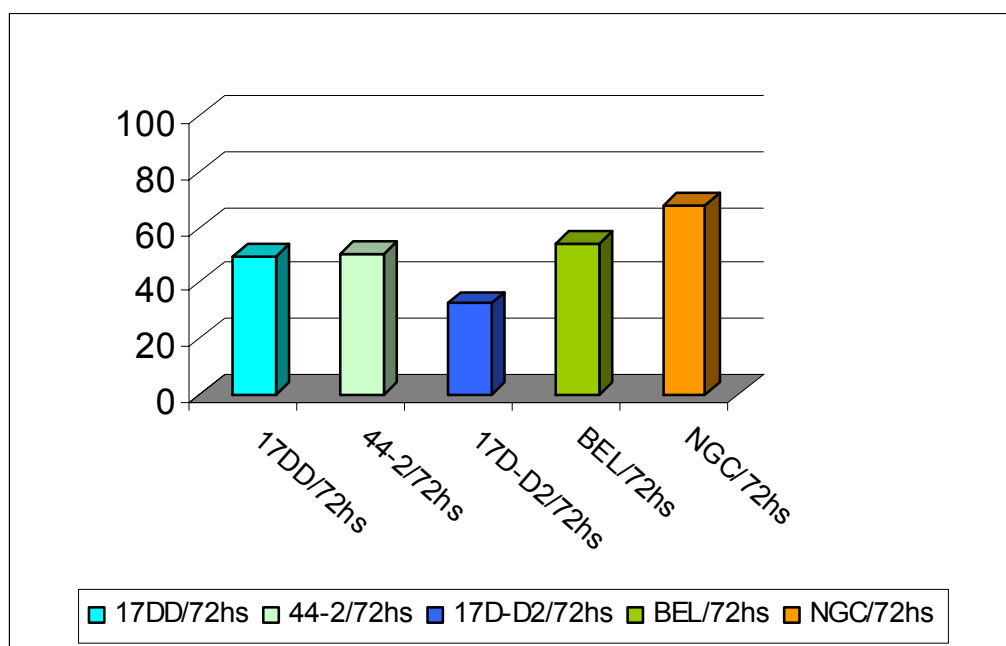


Figura 33: Análise comparativa da infecção de neurônio de rato com flavivirus.

Na figura 34 vemos uma análise quantitativa das infecções nos neurônios e esta mostra que para, aproximadamente, a mesma quantidade de células, há o mesmo número de células infectadas por campo (variando de 78 a 113) para cada uma das culturas infectadas com os diferentes vírus. No entanto, as culturas infectadas com o vírus quimérico (17D-D2) apresentam o maior número de núcleos de modo que a relação antígeno viral versus neurônios é a mais baixa sugerindo a resistência à infecção por esse vírus ou a incapacidade do vírus de infectar e/ou replicar neste tipo de célula. Fica evidente também a alta permissividade dos neurônios ao VDEN2 NGC, pois mostra um maior número de células infectadas por esse vírus.

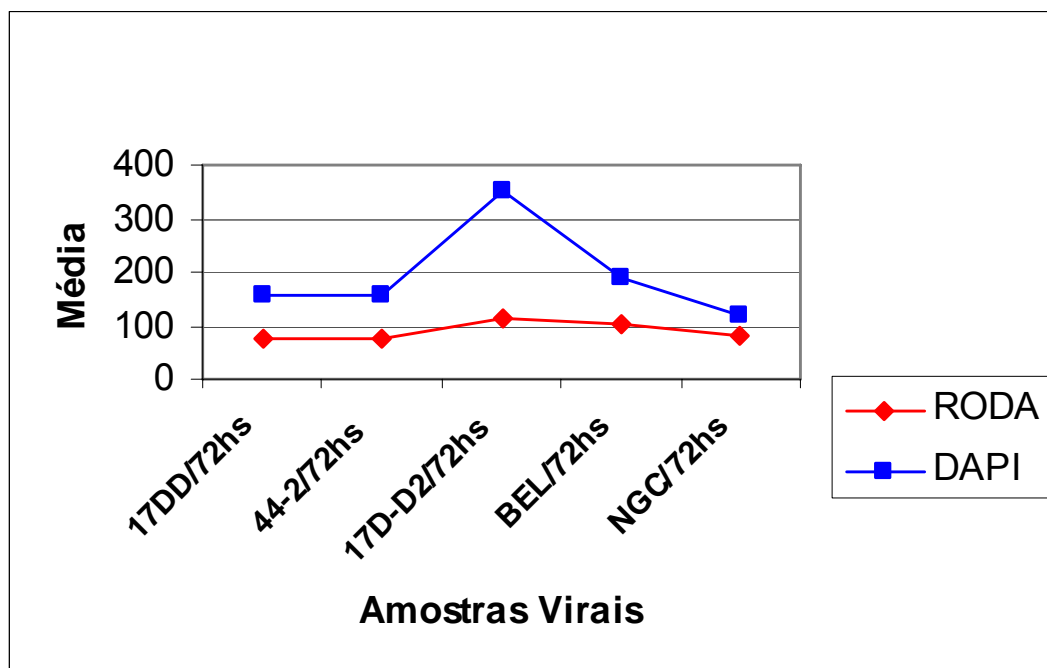


Figura 34: Análise quantitativa das infecções de Flavivirus em neurônios de ratos.

Esses números percentuais da tabela 20 nos permitiram apreciar o grau de permissividade das células neuronais aos agentes virais estudados. De fato, fica evidente que o VDEN2 NGC que é uma cepa neuroadaptada para camundongo é a mais virulenta para os neurônios. Evidenciou-se também pela primeira vez que o vírus recombinante FA17D-D2 mostrou a menor capacidade de infecção desse tipo de células quando comparado aos demais agentes virais estudados.

Nossos resultados foram corroborados pela titulação do sobrenadante da cultura primária de neurônios infectados com os Flavivirus usados, incluindo o vírus quimérico 17D-D2, como pode ser observado na tabela 16 e figura 35. A curva de crescimento viral mostra que o vírus VDEN2 NGC atinge os maiores títulos nos 4 dias de infecção, seguido pelos vírus Bel61082 e 17DD, enquanto que o vírus 17D-D2 apresentou o menor título obtido, onde só foi detectado em 2 tempos de infecção (72 e 96 H) e com um rápido decréscimo na concentração viral.

Tabela 21: Titulação do sobrenadante de cultura primária de neurônio de ratos infectados com Flavivirus coletados de 24 em 24 H.

Flavivirus	Titulo			
	24 H p.i. p.i.	48 H p.i.	72 H p.i.	96 H
VDEN2 - NGC	4,36	4,77	4,77	7,87
VDEN2 – 44-2	0	2,74	5,04	4,7
VDEN2 Bel61082	4,3	2,92	4,57	4,65
Quimera 17D-D2	0	0	3,95	3,7
VFA 17DD	3,87	3,48	2,9	-

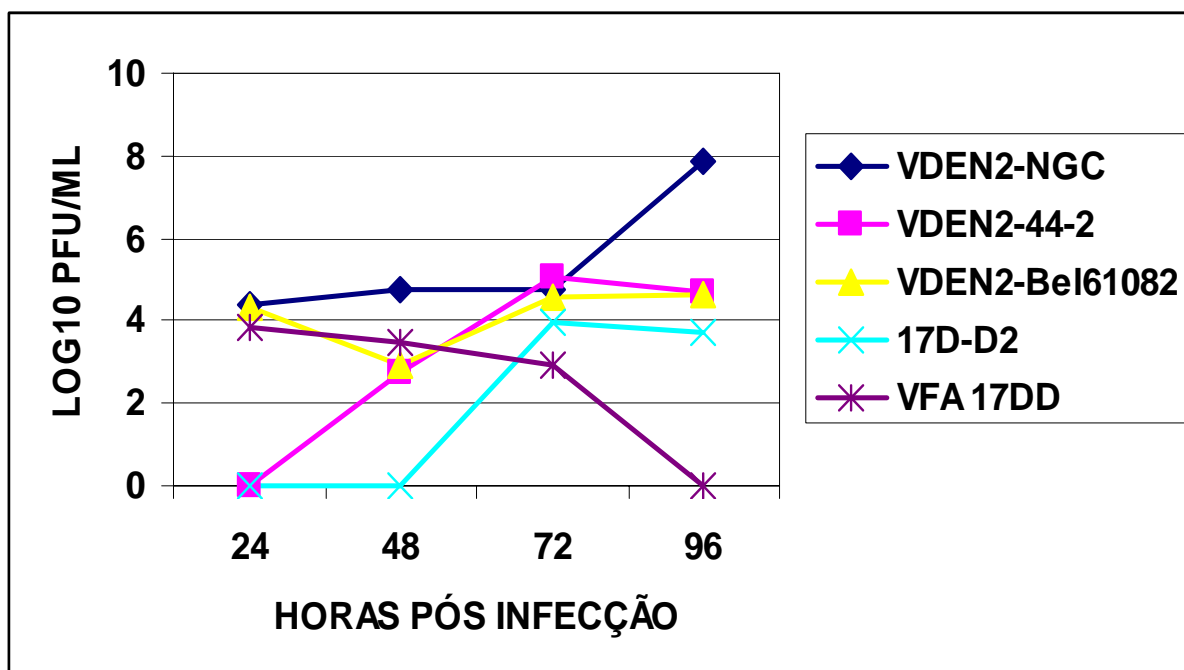


Figura 35: Curva de crescimento dos Flavivirus em sobrenadantes de cultura primária de neurônios de rato, dias pós-infecção. Os resultados estão expressos em LOG_{10} PFU/ML

6.1.5- Análise do tamanho do núcleo de neurônios de ratos infectados com *Flavivirus*.

Para avaliarmos o perfil morfológico do núcleo das células infectadas com *flavivirus*, utilizamos a técnica de coloração com DAPI e as alterações morfométricas observadas foram analisadas utilizando programas de computador que permitiram mensurar o tamanho dos núcleos.

Dentre as alterações morfológicas decorrentes da infecção de neurônios primários de rato com flavivirus, avaliamos a variação do tamanho do núcleo, nos resultados obtidos foram aplicados alguns testes estatísticos que mostrou pouca significância nos dados analisados (dados não mostrados), provavelmente em decorrência da baixa amostragem. Dessa forma aplicamos análise por histogramas para apresentar a frequência dos tamanhos dos núcleos, dos neurônios. Foram feitos gráficos para todos os vírus estudado e em cada de período de tempo, com dados normalizados. A normalização foi feita baseada no número de núcleos contados em cada campo, onde cada medição de núcleo foi dividida pelo número total de núcleos contados por campo. Os dados estão apresentados abaixo com os gráficos mostrando a frequência dos tamanhos dos núcleos por vírus.

Podemos observar nos dois tipos de gráficos que não houve diferença na distribuição das frequências. O que podemos dizer é que os vírus Bel61082, 17D-D2 e NGC 72 h p.i., apresentaram uma predominância de tamanho de núcleos entre 20 a 40 μm , na mesma faixa do controle negativo (célula não infectada). Para as células infectadas com o vírus 44-2 72 h p.i. esta faixa variou de 60 a 130 μm . Após 96 H de infecção as células infectadas com o vírus 44-2 mostraram uma redução desta faixa de 10 a 90 μm . Já as células infectadas com o vírus Bel61082 mostram o aumento do número de núcleos pequenos na faixa de 8 a 30 μm , (Figura 36).

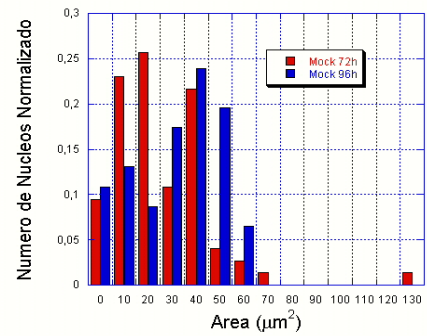
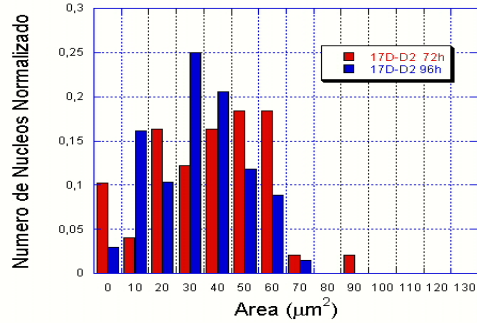
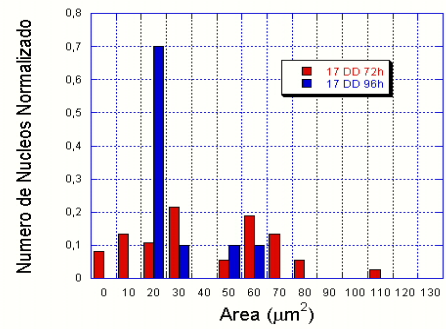
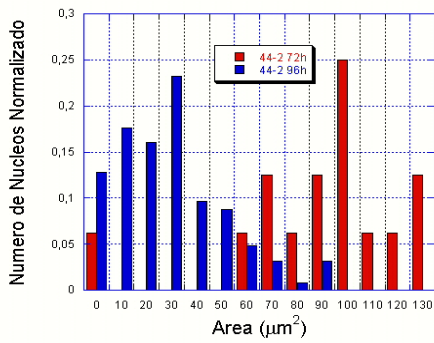
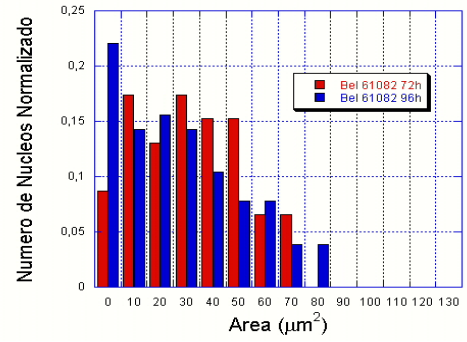
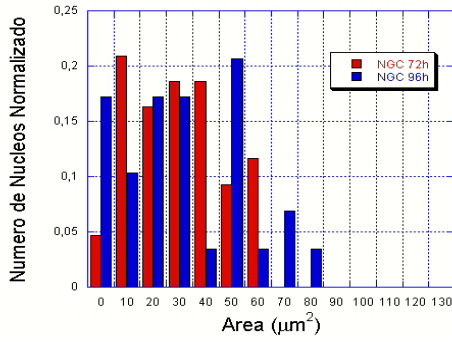


Figura 36: Gráficos de análise dos tamanhos dos núcleos pós-infecção em neurônio primário de rato infectados com vírus VDEN2 NGC, Bel61082, 44-2, VFA 17DD, vírus quimérico 17D-D2 e Mock 72 e 96 horas. Análise dos dados após normalização.

6.1.6- Infecção em cultura de células de glioma humano U87

Com a perspectiva de analisar o efeito da infecção de células gliais humanas, por variantes do vírus VDEN2, utilizamos uma linhagem humana de glioblastoma.

A cultura celular de glioma humano linhagem U87 da ATCC, foi infectada como descrito anteriormente em Material e Métodos. As culturas foram observadas diariamente por um período de 4 dias para verificação da presença ou ausência de ECP. Esse período foi determinado para permitir a comparação com a mesma cinética de infecção temporal da cultura primária de neurônio. Foram realizados dois experimentos com infecções em momentos distintos, utilizando-se suspensão com as amostras virais BEL61082, 44/2, NGC, 17D/D2 e VFA vacinal 17DD. A fixação das células de cada experimento ocorreu após 24, 48, 72 e 96 horas p.i.. A presença de ECP pode ser detectada durante o período de acompanhamento da cultura (dados não mostrados) e os resultados da infectividade viral por IFI, aparecem nas figuras abaixo.

Na condição controle com células não infectadas (Figura 37) observamos a qualidade da cultura, alta densidade celular, células com núcleos, grandes, bem arredondados, forma geral da célula, alongada, característico de astrócitos fibrosos e a total ausência de partículas virais (Fig.37A).

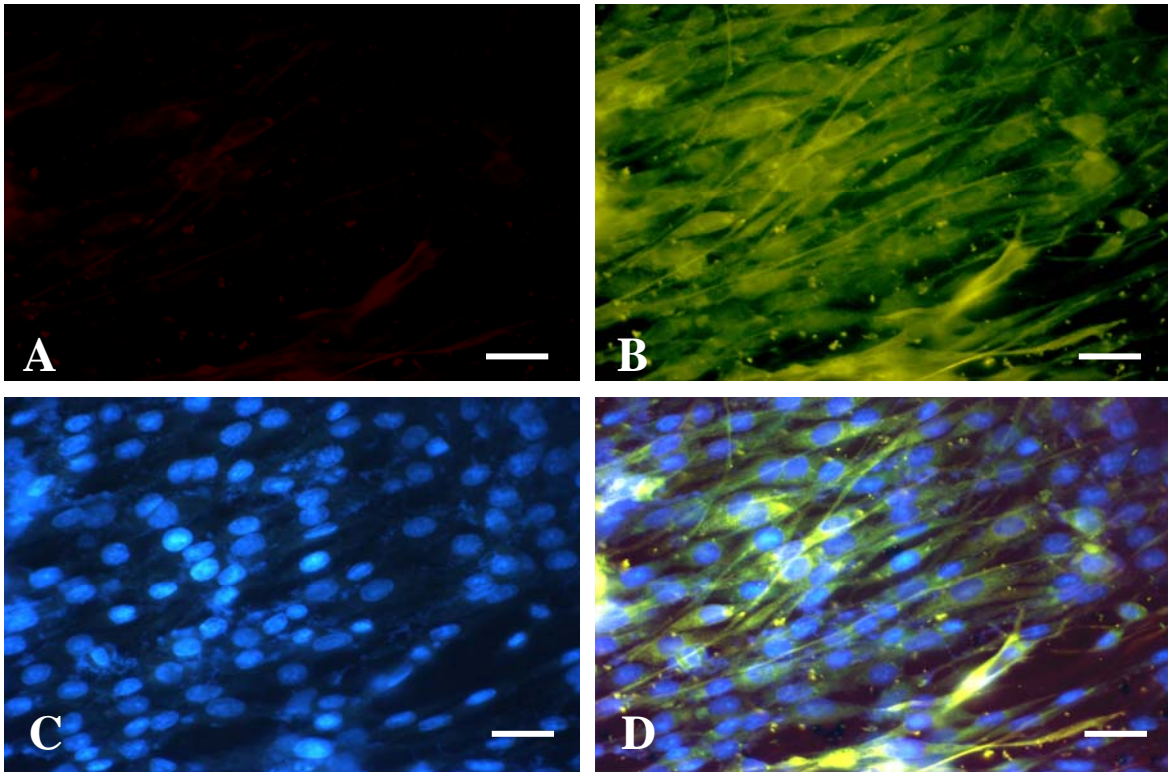


Figura 37: Fotomicrografia de células de glioma U87 não infectadas colhidas com 72 H., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Controle, sem infecção viral, marcado com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

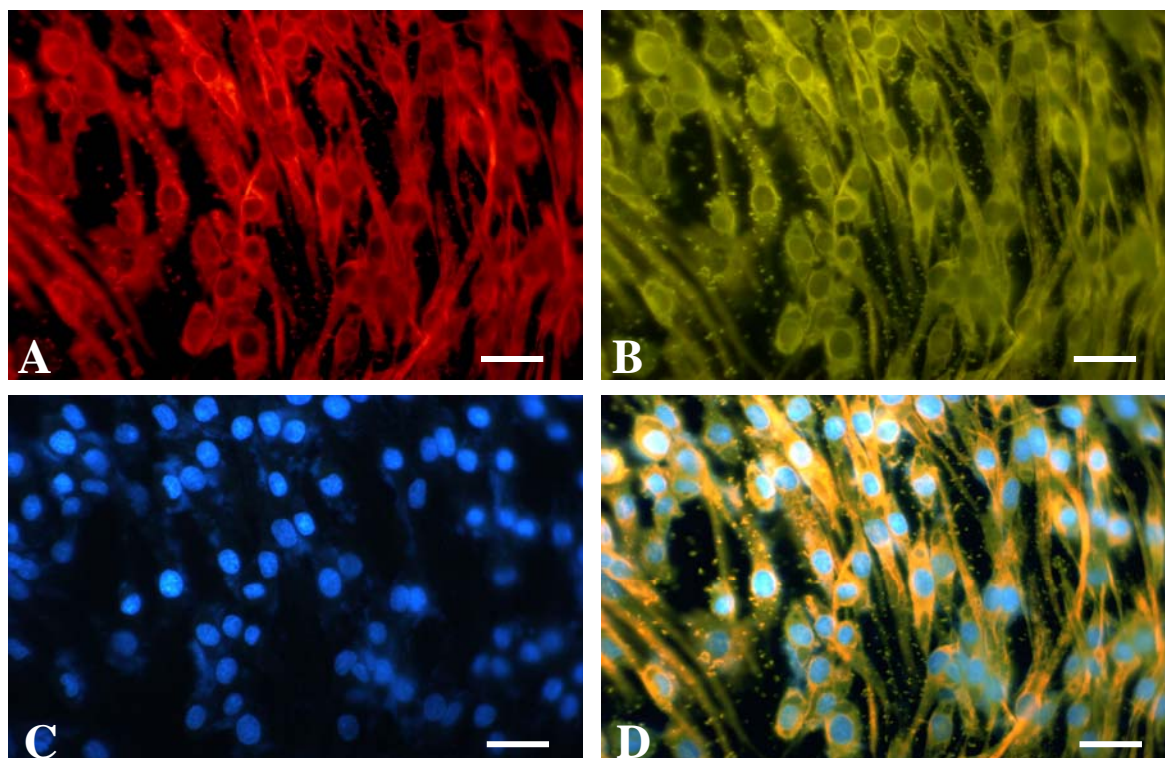


Figura 38: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus 44/2 colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B, C. Barra= 25 μ m

Quando as células de glioblastoma humano eram submetidas à infecção com VDEN2 44/2 por 72 horas, observou-se uma tendência das células ao arredondamento, elas pareciam passar da forma alongada (ver controle) a uma forma mais arredondada. Os núcleos parecem ganhar em volume e o citoplasma se avoluma, redondo, acompanhando o núcleo. A infecção é praticamente total (Fig. 38 A) e mais visível na sobreposição de imagens, com a cor alaranjada (Fig.38 D).

Entretanto, não era evidente núcleo apoptótico ou necrótico o que sugeriria que as células de glioblastoma humano eram resistentes ao efeito apoptótico de VDEN2 até 72 H p.i. É notável o aumento do volume celular, talvez devido ao acúmulo de estruturas membranares. A células gliais infectadas com 44-2 se mantiveram com poucas alterações morfológicas 96 H p.i., semelhantes ao que aconteceu 72 H p.i. (dados não mostrados).

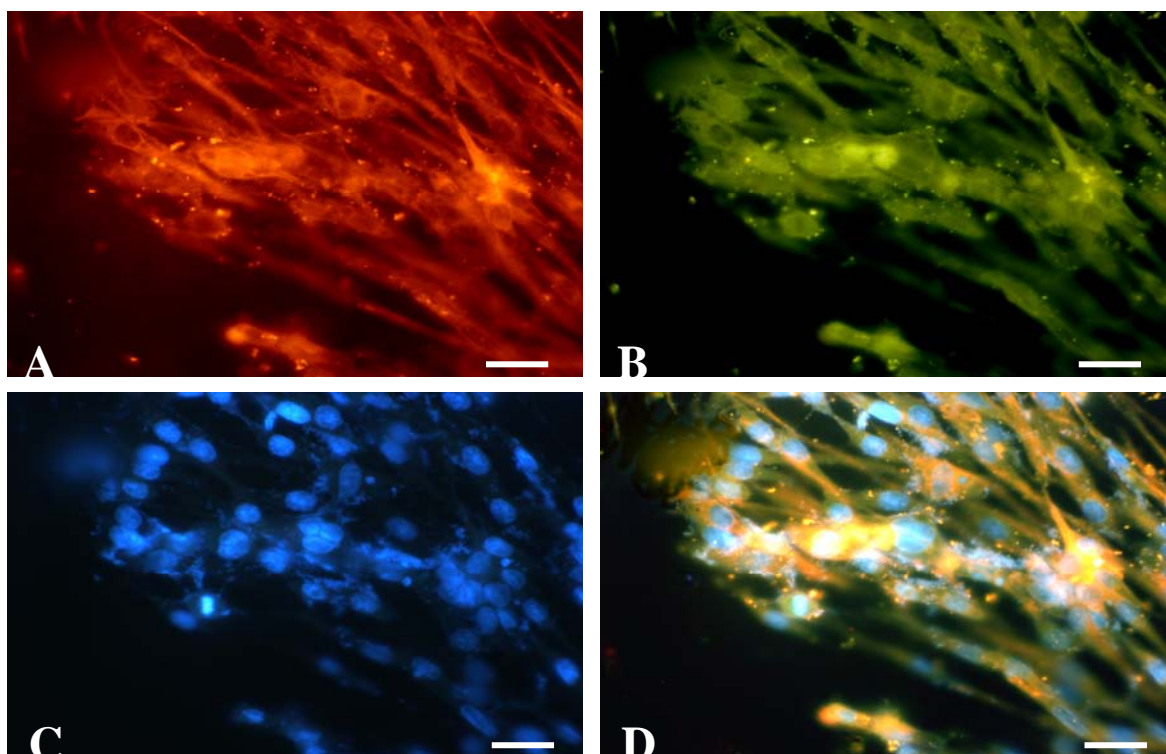


Figura 39: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus Bel61082 colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C . Barra= 25 μ m.

No entanto, quando estas mesmas células humanas eram infectadas com o vírus Bel 61082 o perfil da infecção era outro. Após 72 h de infecção podíamos observar uma destruição celular (Figura 39 B), com alteração da forma dos núcleos e presença de grande número de células multinucleadas (Figura 39 C). A infectividade parecia total visto na sobreposição das figuras (Figura 39 D) e com consequências muito mais dramáticas diferentemente da infecção dos glioblastomas humanos com VDEN2 44/2. A progressão da infecção com vírus Bel61082, para um tempo de 96 horas acentua a destruição celular (Figura 40). Observa-se a destruição nuclear, a fragilidade dos neuritos que ainda estão presentes em algumas células e as células são completamente amorfas. A Figura 40 A, mostra a presença do vírus em todas as células como evidenciado pela marcação para vimentina, Figura 40 B. A vimentina é uma proteína do citoesqueleto e, portanto abundante e persistente nos tumores, mesmo que fragmentada nas células que estão morrendo.

As imagens de Figura 40 C e D nos permitem ver cromatina nuclear condensada, fragmentada e a total alteração da forma das células que vão morrendo, sugerindo a alta virulência deste vírus para estas células.

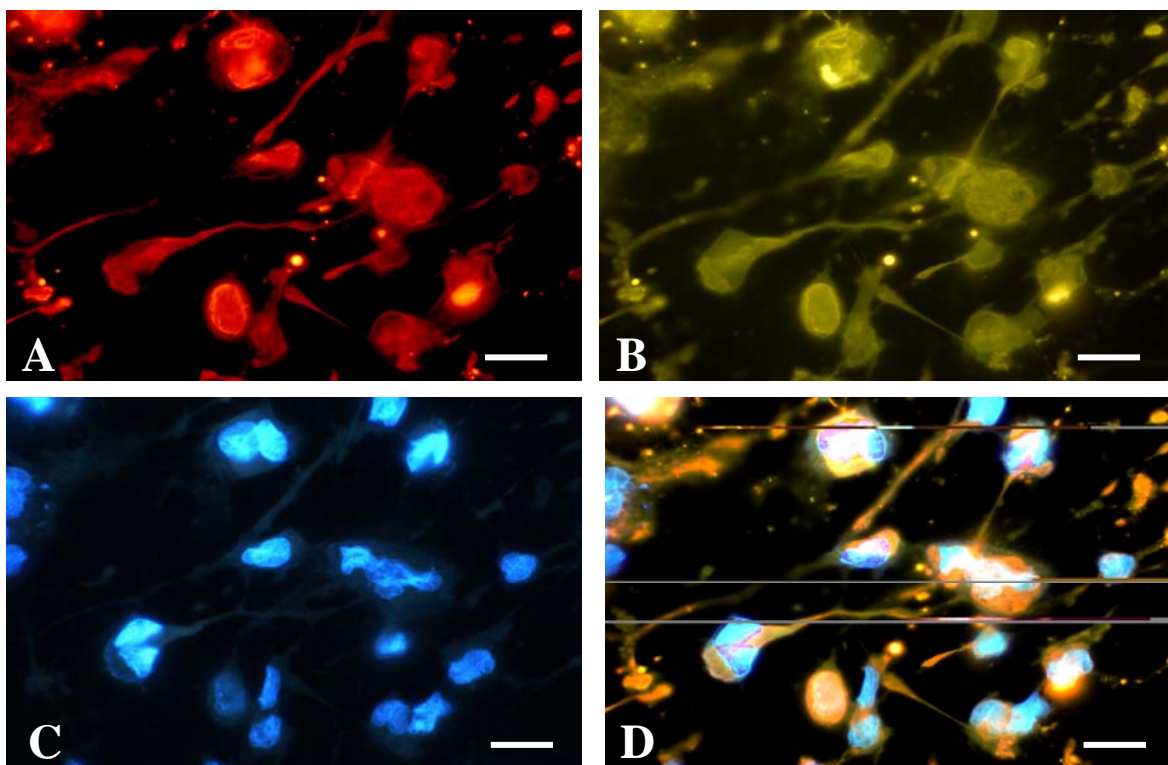


Figura 40: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus Bel61082 colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo da contra vimentina com anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

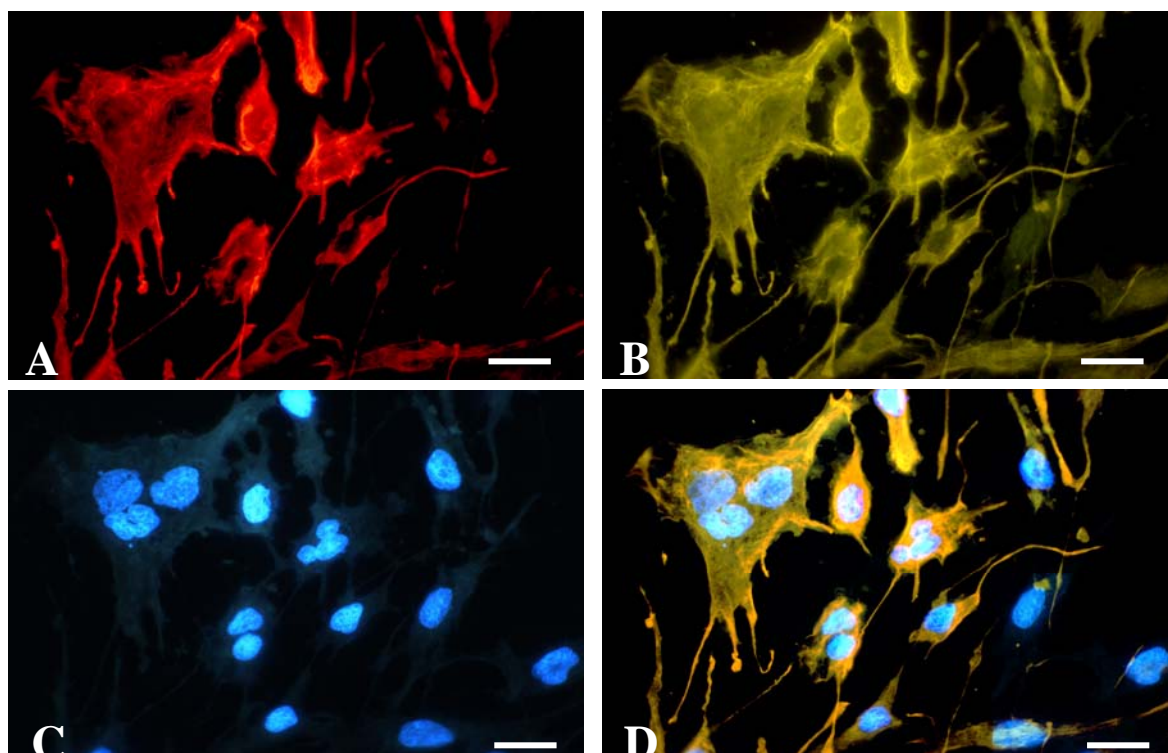


Figura 41: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus NGC colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação por IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VDEN2 e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

O processo de infecção do glioblastoma humano com o vírus VDEN2 NGC mostrou reatividade para a marcação com o anticorpo anti-VDEN2 ligado a rodamina, com pouca destruição celular (dados não mostrados).

A infecção deste mesmo glioblastoma humano, com a cepa NGC adaptada ao sistema nervoso é ainda mais agressiva que as anteriores. Observa-se na figura 41 A presença do vírus e as células completamente deformadas, muitas delas se tornando gigantes, em torno de 96 horas de infecção. A figura 41 mostra claramente a deformação das células, com o espalhamento da marcação de vimentina sem o arranjo citoesquelético típico e os núcleos mostrando intensa condensação de cromatina e formação de fragmentos nucleares.

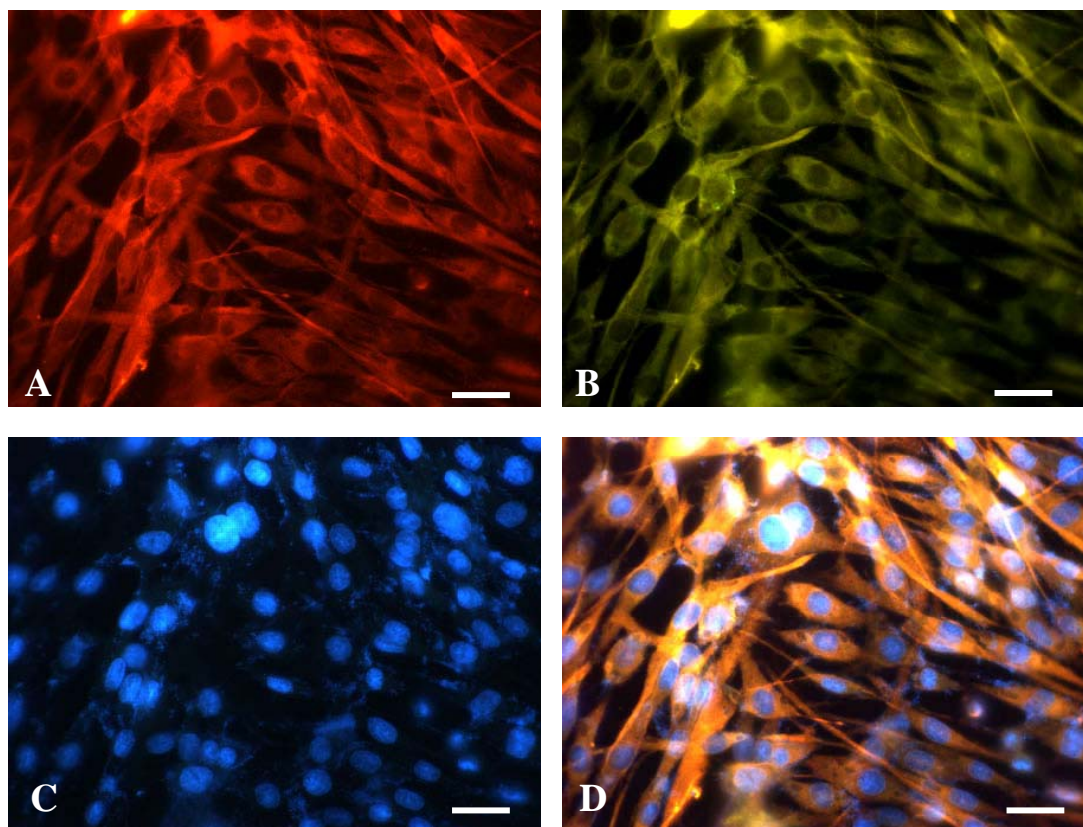


Figura 42: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus VFA 17DD colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação IFI. A) 1Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

A cultura de glioblastoma infectada com o vírus vacinal da VFA, cepa 17DD, 72 p.i apresentou susceptibilidade para esse vírus, como indicada pela detecção dos antígenos virais reagindo com anticorpo marcado com rodamina (figura 42 A) em todo o citoplasma celular. Nota-se também, que mesmo com essa reatividade ocorreram poucas alterações morfológicas nas células gliais tumorais, o que parece acontecer é apenas um aumento na atividade metabólica da célula, mostrada pelo aumento de volume celular e do núcleo (figura 42 C).

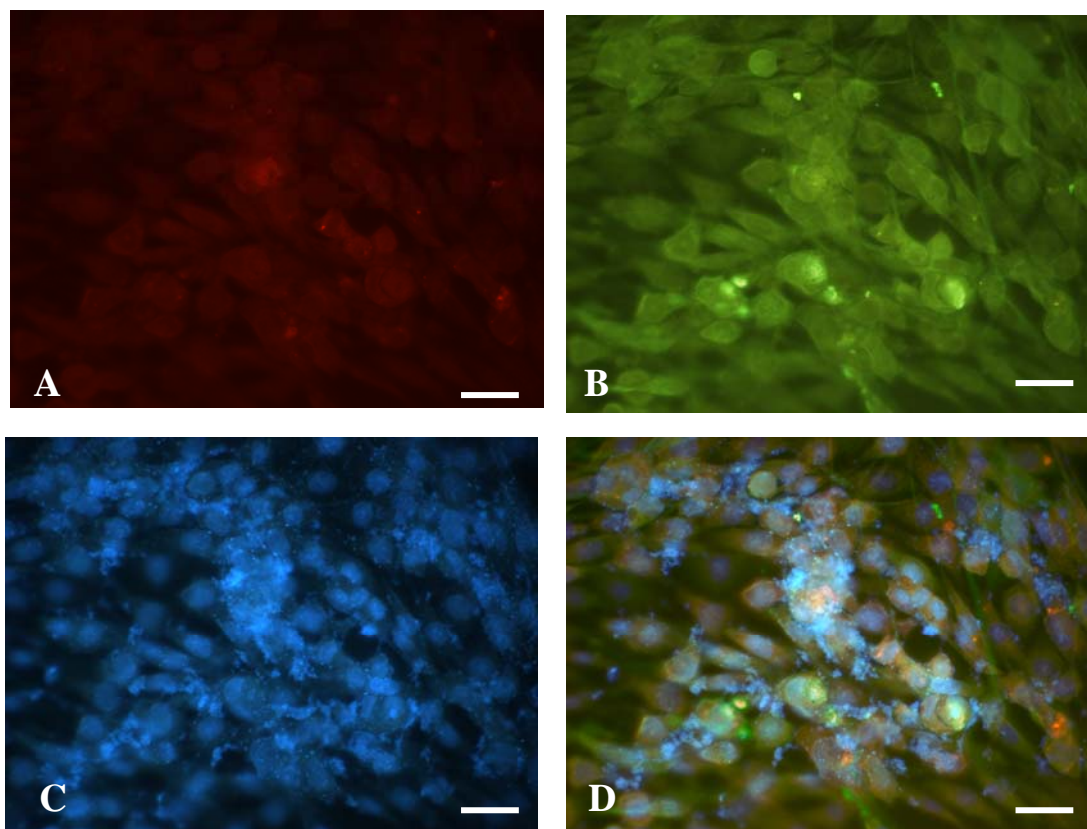


Figura 43: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus vacinal VFA 17DD colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação IFI. A) Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

Entretanto, na fotomicrografia da figura 43, a qual mostra culturas de células de glioma U87 infectadas por 96 H p.i. com o vírus vacinal VFA 17DD, podemos observar que há uma redução de volume, diminuição na marcação dos antígenos virais pela rodamina (cor avermelhada ou alaranjada), visto que há pouca fluorescência (figura 43 A e D). O corpo celular se mostra aumentado de tamanho; os núcleos das células se mostram de conformação normal, sem nenhuma alteração. Estes resultados sugerem que a infecção deste tipo de células é de curta duração talvez pela indução de interferon ().

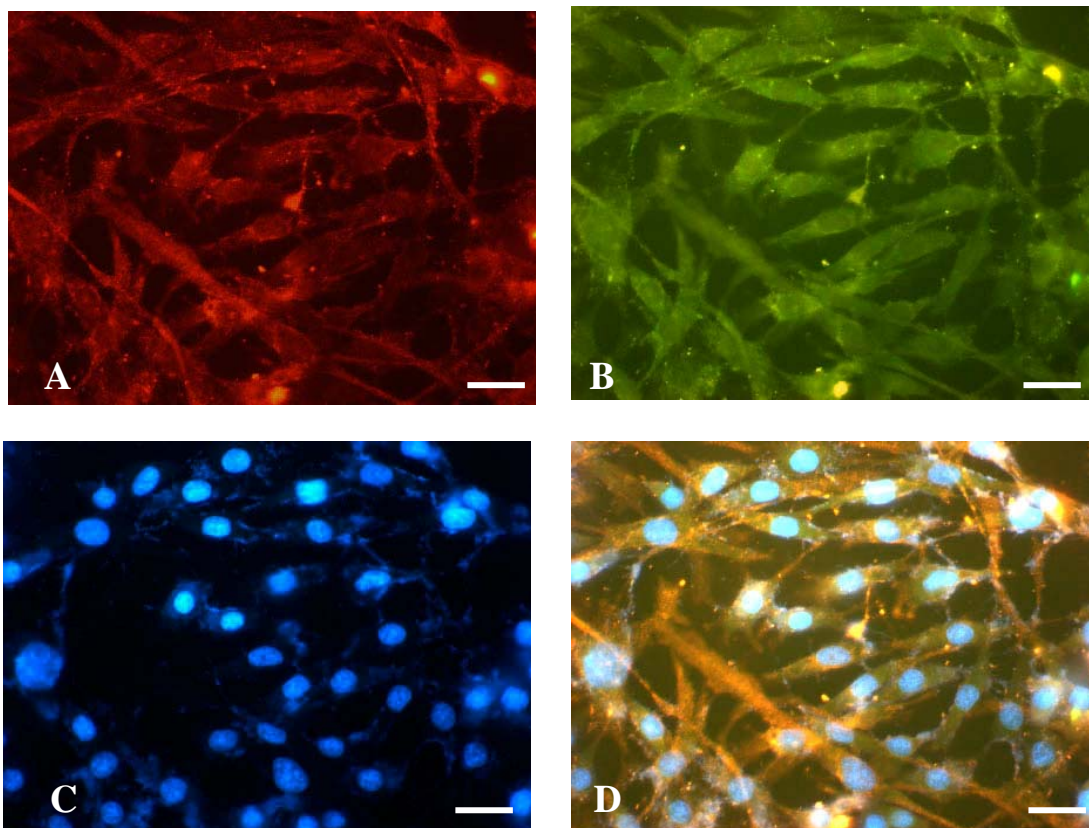


Figura 44: Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus 17D/D2 colhido com 72 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação IFI. A) 1Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

A fotomicrografia da figura 44 mostra cultura de células de glioma infectadas com o vírus quimérico 17D/D2, 72 H p.i., onde podemos observar pequenas alterações no citoesqueleto, se mostrando mais compactado em torno do núcleo mas a morfologia apresenta-se semelhante ao controle, com aspectos alongados, típicos de astrócito fibroso (figura 44 D). Há uma baixa densidade celular, contudo os núcleos se mostram arredondados (figura 44 C) de morfologia normal. Todas as células parecem estar infectadas (44 A e D).

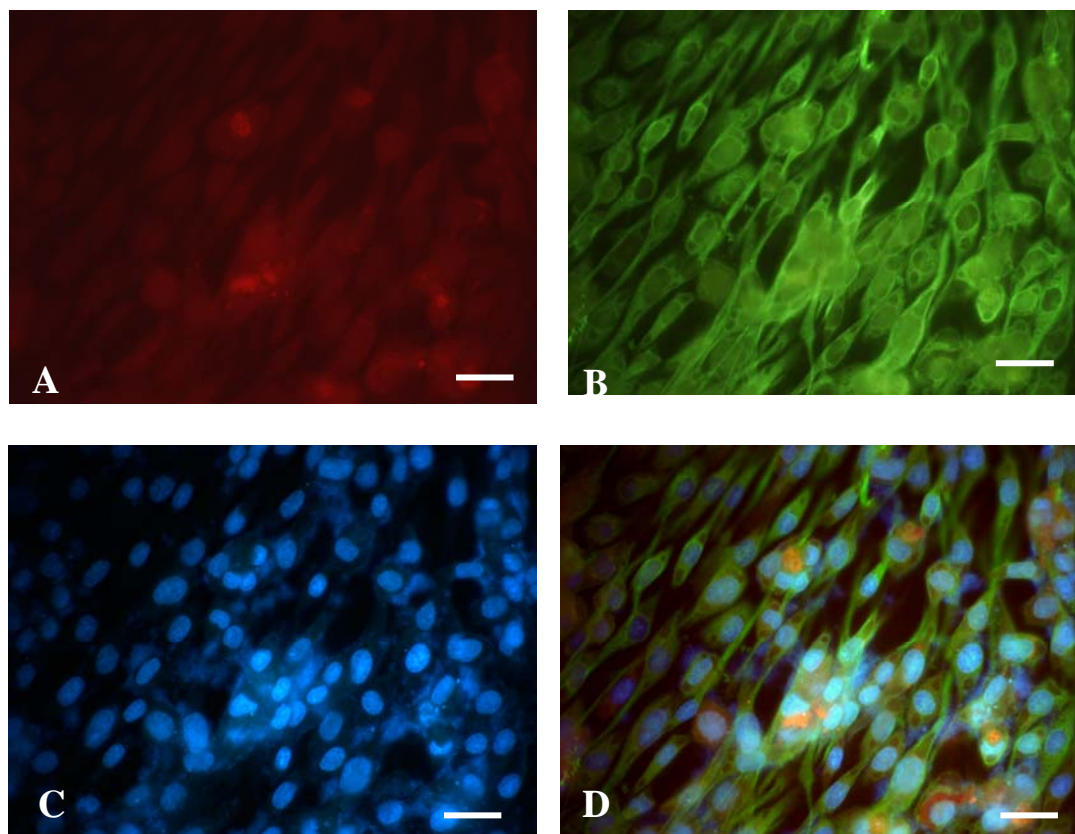


Figura 45. Fotomicrografia de células de glioma U87 infectadas com o vírus 17D/D2 colhido com 96 H p.i., observada em microscopia óptica de fluorescência e com dupla marcação IFI. A) 1Marcação com anticorpo anti-VFA e anti-camundongo acoplado à rodamina; B) marcação do anticorpo contra vimentina e anti-camundongo acoplado à FITC; C) marcação do núcleo com DAPI; D) superposição de imagens A, B e C. Barra= 25 μ m.

A fotomicrografia da figura 45 apresenta cultura de glioma infectada com o vírus quimérico 17D/D2, 96 H p.i. Assim como para a figura 37 as células estão com morfologia normal com a mesma densidade celular (Figura 45 D). No entanto, há uma diminuição na marcação dos antígenos virais, pela rodamina, semelhante ao que acontece com o vírus VFA vacinal 17DD. Quanto ao aspecto do núcleo eles mostram-se irregulares, algumas vezes alongados, que pode indicar um aumento no metabolismo celular (Figura 45 C).

6.2- Determinantes genéticos de neurovirulência do vírus VDEN2 (Bel61082)

O vírus BEL61082 foi seqüenciado (número de acesso AY644452) a partir de uma suspensão de uma única passagem em células de *Ae. albopictus* clone C6/36. A região gênica analisada corresponde aos genes C/prM/M/E/NS1, obtendo-se 2.133 pares de bases que correspondem a 711 aminoácidos. As seqüências foram alinhadas e analisadas em programa Megalign (DNASTAR) usando o método Clustal W, para estudo de similaridade com as cepas controles cujas seqüências já estavam disponíveis, a cepa NGC no Genbank e a 44-2 cedida pelo Dr. Ricardo Galler (Biomanguinhos/Fiocruz) (Figura 46).

Os principais marcadores de neurovirulência são os resíduos E126 e E390, estes têm sido implicados na atividade biológica do VDEN2 (Bray *et al.*, 1998; Sanchez e Ruiz, 1996; Hurrelbrink e McMinn, 2003). Não encontramos nenhuma alteração nos aminoácidos nessa posição no genoma do vírus em estudo Bel61082 (Figura 46).

Os resultados obtidos das diferenças de aminoácidos apresentadas não correspondem às mesmas que foram determinadas como sendo responsáveis pela atividade de neurovirulência por Bray *et al.*, que é a alteração do resíduo de aminoácido E126, o aminoácido E que continua estável. Contudo segundo trabalho de Catteau e colaboradores (Catteau *et al.*, 2003), detectamos uma alteração na proteína prM no resíduo M28 (K→E), que está no ectodomínio designado como pro-apoptótico (Figura 46).

Foram encontradas 3 alterações de aminoácidos, no gene da proteína de capsídeo, que ainda não estão relacionadas a nenhuma mudança de atividade biológica do vírus e uma outra alteração no gene da proteína NS1.

	Capsideo				prM	10	20	28 30
44-2_-_DENV2	WGTIKKSKAI	NVLRGFRKEI	GRMLNILNRR	RRTAGVIIML	IP TAMAFHLT	TRNGEPHMIV	GRQEKGKSL	FKTKDGVNMC
bel61082-Brasil_-_2001S.....A	S.....E.....
Nova_Guine_C_DENV2M.....V.....E.....
	40	50	60	70	80	90	100	110
44-2_-_DENV2	TLMAIDLGEL	CEDTITYKCP	LLRQNEPEDI	DCWCNSTSTW	VTYGTCTTTG	EHRREKRSVA	LVPHVGMGLE	TRTETWMSSE
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2M.....	F.....
	120	130	140	150	160	E	10	20
44-2_-_DENV2	GAWKHVQRIE	TWILRHPGFA	IMAAILAYTI	GTTHFQRALI	FILLTAVAPS	MTMRCIGISN	RDFVEGVSGG	SWVDIVLEHG
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2A.....T.....
	30	40	50	60	70	80	90	100
44-2_-_DENV2	SCVTTMAKNK	PTLDFELIKT	EAKQPATLRK	YCIEAKLTNT	TTESRCPTQG	EPSLNEEQDK	RFICKHSMVD	RGWNGCGGLF
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2D.....V.....
	110	120	126	130	140	150	160	170
44-2_-_DENV2	GKGGIVTCAM	FTCKKNMEGK	VVLPENLEYT	IVITPHSGEE	HAVGNDTGKH	GEEIKITPQS	SITEAELTGY	GTVTMECSPR
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2K.....Q.....K.....
	190	200	210	220	230	240	250	260
44-2_-_DENV2	TGLDFNEMVL	LQMEEKAWLV	HRQWFLDLPL	PWLPGADTQG	SNWIQKETLV	AFKNPHAKKQ	DVVVLGSQEG	AMHTALTGAT
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2N.....T.....
	270	280	290	300	310	320	330	340
44-2_-_DENV2	EIQMSSGNLL	FTGHLKCLR	MDKLQLKGMS	YSMCTGKFKI	VKEIAETQHG	TIVIRVQYEG	DGSPCKIPFE	IMDLEKRHVL
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2V.....
	350	360	370	380	390	400	410	420
44-2_-_DENV2	GRLITVNPVIV	TEKDSPVNI	AEPFPGDSYI	IIGVEPGQLK	LNWFKKGSSI	GQMFETTMRG	AKRMAILGDT	AWDFGSLGGV
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2I.....
	430	440	450	460	NSI	10	20	30
44-2_-_DENV2	FTSIGKALHQ	VFGAIYGAAF	SGVSWTMKIL	IGVIITWIGM	NSRSTLSVSV	LVLVGVVTTY	LGVMVQADSG	C
bel61082-Brasil_-_2001
Nova_Guine_C_DENV2A.....

Figura 46: Alinhamento dos vírus VDENV2 Bel61082, 44/2 e NGC. As setas indicam início do gene da proteína e principais alterações seguida com letras vermelhas.

7- DISCUSSÃO

Parte I – Caracterização Molecular do VDEN

Em nosso estudo com os vírus VDEN2 E VDEN3 nos propomos a buscar respostas para as diferentes formas de apresentação clínica e biológica, durante as epidemias ocorridas no Brasil. Inicialmente vamos fazer uma breve análise dos estudos realizados anteriormente, e que nos levaram a escolha do nosso método.

A primeira evidência genética de diferenças entre os vírus VDEN do mesmo sorotipo veio de estudos de “fingerprinting” do RNA viral (Repik *et al.*, 1983; Vezza *et al.*, 1980) e os grupamentos resultantes das amostras virais, foram chamadas de “topotipos”. Outro método usado uma abordagem similar, foi à digestão de cópias de cADN do ARN viral molde com endonucleases, que deram uma melhor resolução, mas ainda é falho para identificar as regiões do genoma que possuem diferenças de seqüências entre os vírus.

Nos anos 80 o advento do sequenciamento direto de regiões específicas do genoma, possibilitou estudos de muitos vírus diferentes. Para as primeiras análises de variação do vírus VDEN foram usadas seqüências relativamente pequenas ou poucas cepas (Block *et al.*, 1989; Chu *et al.*, 1989; Rico-Hesse, 1990). No decorrer do tempo foram obtidas muitas outras seqüências, de genomas completos ou de gene de muitos vírus diferentes fazendo com que houvesse um aumento no entendimento da evolução do VDEN e sua virulência. A classificação dentro de um grupo genético (genótipo) e de um sorotipo está constantemente mudando, à medida que métodos de sequenciamento e análises evolucionárias melhoram e a disponibilidade de seqüências no banco de dados se expande.

A evolução do vírus VDEN tem causado um grande impacto para a virulência em humanos e na epidemiologia em todo o mundo. Estudos filogenéticos de amostras diferentes do VDEN de genótipos específicos (dentro de um sorotipo) definem os fatores de virulência viral. Segundo Rico-Hesse (2003), o VDEN pode ser classificado epidemiologicamente como de baixo, médio ou alto impacto, sendo que alguns vírus possuem um ciclo silvestre de pouco ou menor transmissibilidade em humanos, outros produzem apenas FD

e alguns genótipos associados com o potencial de causar as formas mais severas, FHD e SCD.

O entendimento da variação genética do VDEN é especialmente importante, por que ainda sabemos pouco sobre a doença. A evolução do VDEN é determinada por muitas interações complexas, desde nível celular até populacional, em humanos e mosquitos. O pouco entendimento que temos hoje foi adquirido indiretamente pela associação entre grupamentos evolucionários das cepas virais e a apresentação clínica e/ou epidemiológica da doença (Rico-Hesse, 2003).

Com o avanço dos métodos de sequenciamento simultaneamente ocorreu o aumento do número de cepas analisadas de VDEN. Esta situação levou ao referimento da análise de evolução do VDEN, onde podemos falar agora em microevolução. Estes avanços também dependem do desenvolvimento de métodos estatísticos para determinar as relações entre seqüências, conhecidas como “filogenéticas”. Nas últimas décadas, algoritmos de computador usados na geração de árvores filogenéticas ou evolucionárias das relações virais têm aumentado em números e complexidade.

Há um consenso entre os filogeneticistas, no que diz respeito a um grande número de táxon (cepas virais), com longas seqüências (um gene ou mais) que devem ser analisadas pelo método da máxima verossimilhança (MV) (maximum likelihood), com cálculos das taxas de transição e transversão, com valores de “bootstrap” (estatístico) para o padrão de ramificação. Isto provavelmente seja o suficiente para uma precisão das árvores filogenéticas para classificação do fenótipo viral (Hills, 1989; Lemmon e Milinkovitch, 2002).

A taxa de evolução analisadas pelo fato cálculo do relógio molecular, de ancestrais e estimativas da pressão seletiva, ainda é muito incipiente e requer muitas suposições. Isso se dá pelo fato de não termos fortes evidências evolucionárias, pela ausência de informações de amostras de vertebrados em ambientes silvestres ou oriundas de mosquitos. Deste modo à quantificação da diversidade de vírus VDEN ainda é prematura. A exatidão das árvores filogenéticas está geralmente limitada ao número e tipo de táxon analisado, e acesso à análise computacional (Holmes *et al.*, 1998; Zanotto *et al.*, 1996).

A seleção dos domínios e da região genômica analisada para comparação das seqüências é muito importante considerando a análise do resultado e limites de interpretação.

As análises já realizadas com vírus VDEN tornaram clara que diferentes áreas do genoma do vírus VDEN evoluíram ou fixaram mutações em diferentes taxas e algumas vezes exibem "hot spots" de elevadas taxas de mutações dentro de uma região, isso foi visto nas regiões do gene E e na extremidade 3'(Rico-Hesse, 2003). Nesse sentido iremos discutir os resultados obtidos de nosso estudo envolvendo os vírus VDEN2 e 3.

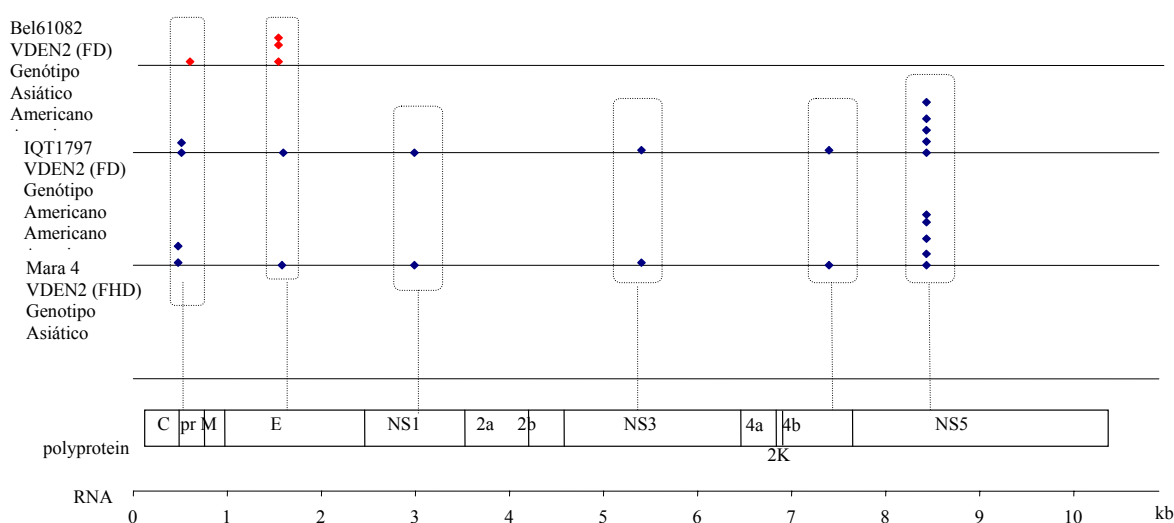


Figura 47: Comparação dos genótipos de VDEN2 circulantes nas Américas. Os balões azuis mostram os pontos de mutações fixados na poliproteína com estabilidade genética, determinante das bases moleculares de virulência e atenuação de vírus estudados nas Américas e os botões vermelhos representam os pontos de mutações fixados nos vírus isolados no Brasil.

Quatro pontos de mutação foram fixados nos vírus brasileiros quando comparados com os vírus VDEN2 já analisados (Rico-Hesse *et al*, 1997 e Rico-Hesse 2003), dentre essas mutações três estão presentes na seqüência do vírus da Venezuela usados na comparação junto com representantes do genótipo Americano e do Sudeste Asiático. As alterações se encontram nos resíduos prM134, E92 e 204 que estão representadas esquematicamente na figura 47 e uma está presente apenas nos vírus isolados no Brasil (Tabela 14).

Vírus VDEN2

Nossos resultados similares aos existentes em estudos anteriores (Miagostovich *et al.*, 2003) e apresentaram um percentual médio de identidade entre os vírus VDEN2 de 89,5 a 99,8% para nucleotídeo e aminoácido, respectivamente quando comparadas entre si e com as demais seqüências (Tabela 13).

Estudos prévios sobre a variabilidade genética de VDEN2 no Brasil mostraram um elevado grau de similaridade desse vírus circulante no país com o vírus da cepa Jamaica (Miagostovich *et al.*, 2003). Os dados de divergência nucleotídica (10,5%) obtidos em nosso estudo indicariam um acúmulo de mutações nucleotídica durante o período da alta circulação desse vírus. No entanto, após análise dos aminoácidos desses genes percebemos que há um menor índice de divergência entre ele, com a ocorrência de mudanças sinônimas, ou seja, sem alterações de aminoácidos e ou de seu caráter físico-químico que poderiam levar a mudança da atividade biológica. Isto também é percebido na maior taxa de transição do que transversão. O grau de variabilidade nucleotídica reflete a dispersão do vírus e seu elevado potencial de replicação, o que explicaria o elevado número de pessoas infectadas e sua endemização ao longo dos últimos 20 anos. A alta densidade do vetor *Ae. aegypti* durante surtos e epidemias favorece também um elevado índice de replicação viral, permitindo o surgimento de mudanças genéticas intra-sorotipo.

O genótipo do VDEN2

Antes de iniciar a análise dos dados verificamos a qualidade da informação filogenética disponível. As análises de saturação das 11 e 10 seqüências de VDEN2 e VDEN3, respectivamente, mostraram sinal filogenético de excelente qualidade (figuras 13 e 14) que deu confiabilidade em nossos estudos filogenéticos.

O vírus VDEN2 tem sido estudado com mais detalhes do que os outros membros do sorogrupo devido a sua associação mais freqüente com a gravidade da doença do ponto de vista individual e populacional (Rico-Hesse,

2003). No sudeste da Ásia os primeiros casos graves de dengue foram causados pelo VDEN2 (Burke *et al.*, 1998; Sangkawibha *et al.*, 1984) assim como nas Américas o aparecimento do VDEN2 foi associado com as primeiras epidemias de FHD (Kouri *et al.* 1987). Conseqüentemente, os estudos de caracterização genética do VDEN foram iniciados pelo sorotipo VDEN2. A maioria dos métodos de diferenciação genética entre cepas foi desenvolvida para este vírus, como o mapeamento de DNA por enzimas de restrição, sondas específicas para detecção de diferenças nucleotídicas (Kerschner *et al.* 1986).

Um estudo realizado com 40 cepas de diferentes áreas tropicais do mundo, coletadas num período de 45 anos comparando as seqüências nucleotídicas da junção da E/NS1 mostrou que o vírus VDEN2 poderia ser classificado dentro de cinco genótipos (Rico-Hesse, 1990).

Comparações subseqüentes de seqüências do gene E de 16 cepas (Lewis *et al.*, 1993) e mais recentemente comparação de regiões não traduzidas 3' de cepas de VDEN2 mantiveram o mesmo agrupamento (Shurtleff *et al.*, 2001). Após análise de muitas outras amostras, especialmente aquelas do Sudeste Asiático, uma região com uma longa história de alta incidência de FHD e elevada co-circulação de variantes do vírus, levou ao agrupamento em quatro genótipos (Rico-Hesse *et al.*, 1998), sendo divididos em África ocidental/silvestre, Americano, Sudeste da Ásia, subcontinente Indiano/Malásia.

Outras análises mais detalhadas dos vírus VDEN2 circulantes nas Américas, diretamente ligados às doenças mais graves causadas por dengue (Leitmeyer *et al.*, 1999), tornaram claro que estavam diretamente relacionados à introdução do VDEN2 do genótipo III proveniente do Sudeste Asiático, em 1981 em Cuba, que se espalhou para todo o Caribe nos anos seguintes. A disponibilidade de amostras virais isoladas de pacientes com registros clínicos bem documentados de três países com casos de FHD (Brasil, México e Venezuela) ajudou esclarecer esta situação (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Até esta data todos os VDEN2 de pacientes com FHD/SCD pertencem ao genótipo do Sudeste da Ásia (Rico-Hesse, 2003). Estudos continuados com vírus VDEN2 mostraram que todas as cepas caracterizadas geneticamente e relacionadas a casos de FD são do genótipo Americano e Sucontinente indiano

indiano/Malásia e são consideradas de baixo impacto epidemiológico (Rico-Hesse *et al.*, 1997).

No Brasil o vírus VDEN2 circula há mais de duas décadas tornando-se um grande problema de saúde pública com uma elevada incidência de casos de FHD. Estudos filogenéticos com amostras isoladas nas Américas, incluindo isolados brasileiros indicam que o aparecimento de FHD está relacionado com a entrada da cepa do Sudeste Asiático na Região do Caribe (Rico-Hesse *et al.*, 1997).

Nossas análises filogenéticas das seqüências de vírus isolados no Brasil demonstram que os mesmos descendem de uma cepa viral de origem Asiática que se presume ter sido introduzida na América Latina durante os anos 70 ou início dos anos 80, que é representado por um vírus da Jamaica isolado em 1983 (Jam83). Análise das 27 seqüências, sendo que 11 são de nossos estudos isolados no Brasil, pelo método de agrupamento de vizinhos, apresentou o agrupamento de oito seqüências brasileiras com elevado grau de afinidade (sustentado por 99% do valor de bootstrap), e estão altamente relacionadas com genótipo III de origem Asiática.

Percebemos ainda uma variabilidade genética em duas seqüências dos vírus isolados no Estado de Roraima que se apresentaram mais distante das demais quando analisadas pelo MP e agrupamentos de vizinhos (figura 15 e 16), esta variação ainda está pouco esclarecida. Mas, podemos sugerir que pela proximidade geográfica com a Venezuela, onde já ocorre co-circulação de dois genótipos de VDEN2 (Americano e Sudeste Asiático) estes vírus na realidade representariam à introdução deste mesmo genótipo a partir daquele país.

Estas mutações *in situ* sofridas pelo VDEN2 desde sua entrada no Brasil em 1986, podem ser responsáveis pelos agrupamentos distintos em regiões durante a dispersão do vírus formando “Clusters” como está mostrado na árvore filogenética do vírus VDEN2 (figura 15). Os agrupamentos mostram que desde sua dispersão ocorreram muitas mudanças nucleotídicas na região estrutural sem alterações significativas nos aminoácidos codificados e que foram divididas em três subgrupos (A, B e C) (figura 15).

Marcadores de virulência viral

Os primeiros estudos de comparação de seqüência nucleotídicas do gene E de 12 vírus VDEN2 não mostraram correlação entre gravidade da doença e nucleotídeo ou aminoácido específico (Block *et al.*, 1989). Em seguida, as análises de genoma completo de vírus isolados de pacientes do Sudeste Asiático também falharam para identificar sítios específicos que pudessem determinar virulência (Mangada and Igarashi, 1998; Pandey and Igarashi, 2000).

Posteriormente a análise de um maior número de seqüências de VDEN2 mostrou diferenças no potencial de virulência em genótipos específico presentes em surtos com alta freqüência de FHD. Leitmeyer *et al.*, (1999) identificaram uma substituição no resíduo de aminoácido E390 como um determinante primário de FHD. No genótipo americano que não está associado a casos de FHD o aminoácido é D, enquanto que na cepa do Sudeste Asiático associado a FHD encontrou-se o aminoácido N.

Os resultados obtidos da comparação de seqüências do gene prM/E das 11 amostras brasileiras do estudo isoladas no período de 1991 a 2002, sendo uma de FHD; com 16 seqüências representando os genótipos do Sudeste Asiático, Americano/Asiático e Americano permitiram a identificação do resíduo de aminoácido Asn na posição E390 em todas as seqüências estudadas, sendo que este resíduo de aminoácido como tendo capacidade de induzir FHD (Leitmeyer *et al.*, 1999). Esses resultados nos sugerem dizer que todas as amostras brasileiras analisadas possuem potencial de desencadear FHD, corroborando com aqueles já relatados com isolados da Venezuela (Uzcategui *et al.* 2001).

Não há outras diferenças consistentes no gene E entre as amostras do Brasil, que seja determinante para FHD de acordo como foi descrito anteriormente, pois de 11 amostras analisadas apenas uma era proveniente de caso de FHD sendo o restante de FD e encefalite. As alterações no gene da prM, resíduo 28 (E→K) e 31 (V→T) encontradas nos vírus do genótipo Americano diferindo da cepa do Sudeste Asiático introduzido nas Americas (Leitmeyer *et al.*, 1999), não foram detectados nas 11 amostras brasileiras analisadas (Tabela 08).

A diferença do aminoácido no resíduo E-390 entre os vírus dos genótipos Americanos e Sudeste Asiático foi considerada a mais importante (Leitmeyer *et al.*, 1999). Contudo, ensaios utilizando células dendríticas mostram que substituição no aminoácido E-390 do genótipo Asiático não são suficientes para reduzir sua replicação, múltiplas alterações foram necessárias para diminuir a capacidade replicativa. Entre essas alterações destacamos as de regiões não traduzidas (RNT), onde a RNT do genótipo Americano em um clone infeccioso derivado de uma cepa Asiática modificaram suas estruturas e diminuíram seu poder de replicação (Cologna *et al.*, 2003). Alteração na RNT pode mostrar influência sobre a replicação do VDEN2, isto já foi demonstrado com uma única substituição na posição do nucleotídeo 57 da 5' RNT de um vírus derivado de uma cepa Asiática, ocorreu diminuição da replicação viral (Butrapet *et al.* 2000).

A diferença dos genótipos dengue e suas habilidades de infectar células alvos primárias conhecidas, em humanos foram mostradas em estudos comparativos com cepas virais do genótipo Americano e do Sudeste Asiático em infecções de células dendríticas humanas e mosquitos *Ae. aegypti*. (Cologna *et al.*, 2003 e 2005). Nesse estudo os vírus VDEN2 do genótipo Asiático geraram maiores concentrações de vírus VDEN2 do que aqueles pertencentes ao genótipo Americano, resultado em aumento do índice de citocinas no plasma e também replicaram mais eficientes em mosquitos *Ae. aegypti* (Cologna *et al.*, 2003 e 2005).

Sabemos ainda que a glicoproteína E é exposta na superfície do vírus VDEN representado o antígeno viral dominante, conferindo resposta imune protetora. Situação semelhante a anterior foi descrita também para outros flavivirus: uma única substituição do aminoácido da proteína E na posição 52 (Hasegawa *et al.* 1992), 138 (Sumiyoshi *et al.*, 1995), 271 e 336 em JEV (Cecília and Gould, 1991); na posição 390 em MVEV (Lobigs *et al.*, 1990); na posição 104 e 107 na quimera TBEV-VDEN4 (Pletnev *et al.*, 1993), na posição 171 e 184 para TBEV (Mandl *et al.*, 1988) mostraram ter um forte efeito na virulência *in vitro* ou *in vivo*.

Sanchez *et al* descreveu que clones de VDEN2 (cepa mexicana) com uma única mutação na posição 390 de D→H se mostraram virulentas quando inoculadas intracerebralmente em camundongos (Sanchez e Ruiz, 1996). De

forma contrária mutação de D→N confere atenuação, como pode ser observado com os vírus do genótipo Americano, que epidemiologicamente estão relacionados a casos de FD.

Outro fato importante sobre a mudança no resíduo E390 é a localização em que se encontra na estrutura molecular do homodímero do fragmento amino-terminal do vírus VTBE, a diferença observada está localizada no domínio III carboxi-terminal (aa 303-395) na superfície lateral do domínio III e é sugerida conter resíduos que estão envolvidos com determinantes para chegada ao hospedeiro, tropismo e virulência em diferentes flavivirus (Hasegawa *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993; Mandl *et al.*, 1989).

No gene E dos 11 vírus brasileiros analisados ocorreram 12 alterações e apenas cinco substituições de aminoácidos foram significativas, com mudança de caráter e carga, sendo na posição E208 (V→E), 262 (T→K), 273 (S→L), 274 (S→A) e 405 (T→P). Observamos uma alteração importante na posição E274 na amostra Goi4191 (isolada de caso de FD) que mudou de S→L (Tabela 14), esta posição do aminoácido está inserida no ectodomínio II desta proteína responsável pela dimerização da proteína E. Todas as alterações de aminoácidos mostradas na tabela 14 e figura 10 estão inseridas no ectodomínio II ou fora do ectodomínio da proteína E como no caso do resíduo 405 da amostra Goi4191. Algumas alterações apresentadas na tabela 14 e figura 10, como E262 e 264 do vírus ROR1811 estão presentes no vírus da Venezuela AF100466, sugerindo o vírus circulante possa ter vindo desse país.

Se analisarmos de acordo com a patogenicidade do vírus, as alterações ocorridas nos vírus brasileiros de casos de FD, não estão presentes naquelas seqüências de origem de sudeste Asiático relacionadas com a maior gravidade da doença, nesse sentido podemos sugerir que estas alterações sejam responsáveis pela manifestação clínica diferenciada ocorrida em epidemias no Brasil (tabela 08).

Vírus VDEN3

A primeira publicação sobre a variabilidade fenotípica do VDEN3 foi em 1972 (Russel and McCown, 1972) usando testes sorológicos para mostrar a

diferença entre cepas de regiões geográficas distintas (Porto Rico e Taiti se separaram das cepas Asiáticas). Estudos de “fingerprinting” identificaram cinco topotipos para este sorotipo (Trent *et al.*, 1990).

O genótipo de VDEN3

Sabe-se também que a interpretação filogenética para o sorotipo VDEN3 é um pouco mais complexa por que a taxa de fixação parece ser baixa, ou seja, há uma menor distância ou divergência entre grupos genotípicos que pode ser explicado pela sua recente expansão no mundo (Rico-Hesse, 2003).

A primeira análise filogenética destes vírus foi feita com seqüência do gene E e foi dividido em quatro genótipos distintos (Lanciotti *et al.*, 1994). Esta classificação não se alterou com a inclusão de novos isolados. A maioria dos genótipos pode ser identificada pela origem geográfica: Américas, Sub continente indiano, Tailândia e Sudeste Asiático/Pacífico Sul (Rico-Hesse, 2003). Não há evidência de um grupo silvestre.

Inicialmente o genótipo de VDEN3 que circulava na Américas desde 1989 tinha baixo potencial epidemiológico, isso se deu pelo fato de que naquele momento havia apenas vírus isolados de pacientes com FD. Dos anos 1980 a 1990 foi introduzido nas Américas e no Pacífico Sul dois novos genótipos: Sudeste Asiático associado com grandes epidemias com FHD, em Taiti e Fiji (Chungue *et al.*, 1993) e o genótipo do subcontinente indiano introduzido na América Central em meados dos anos 90 (Balmaseda *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 1998, 2000, Usuku *et al.*, 2001).

Há evidências que tenha ocorrido evolução no genótipo do subcontinente indiano desde 1989 que levou ao aumento do número de casos de FHD no Sri Lanka (Lanciotti *et al.*, 1994). Em alguns estudos foi documentado que mutações são responsáveis pela variabilidade fenotípica da mesma forma como se dá para o vírus VDEN2 (Messer *et al.*, 2002).

Em 1994 o VDEN3 reapareceu nas Américas causando pequenos surtos associados com FD clássicos no Panamá. O vírus dispersou-se na direção norte indo para a Nicarágua e mais tarde México (CDC, 1995; Guzman *et al.*, 1996). Na Nicarágua em 1994, a introdução do VDEN3 foi associado a uma grande epidemia de FD/FHD no país, mas havia também a presença de

VDEN1. A entrada do VDEN3 no México em 1995 coincidiu com um aumento nos casos de FHD, onde já existia registro da co-circulação de VDEN1 e 2, sendo o VDEN2 em particular associado aos casos de FHD (Pinheiro and Corber, 1997). Desde então o vírus VDEN3 permaneceu circulando na América Central sendo registrados surtos na Nicarágua, Guatemala e El Salvador (PAHO, 200; Usuku *et al.*, 2001).

Após sete anos de sua entrada nas Américas através do Panamá o Vírus VDEN3 espalhou-se para o Sul sendo introduzido na Venezuela e Brasil, causando grandes epidemias (PAHO, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Rocco *et al.*, 2001; De Simone *et al.*, 2004).

As 10 seqüências brasileiras analisadas em nosso estudo, correspondem à região gênica prM/M/E (1977 nucleotídeos), na posição 435 a 2412 do genoma. Os resultados foram semelhantes àquele obtidos em países vizinhos (Pinheiro and Corber, 1997; Usuku *et al.*, 2001) cujas amostras virais foram agrupados no genótipo III que representam os VDEN3 do Sudeste Asiático, e são geneticamente diferentes da cepa de VDEN3 que circulou anteriormente nas Américas durante os anos 1960 (genótipo V) na Venezuela (Uscategui. *et al.*;2003). A região gênica do vírus VDEN3 de nosso estudo foi selecionada por ser uma região conservada descrita anteriormente por Lanciotti e colaboradores, 1994.

Os vírus VDEN3 pertencentes ao genótipo III são aqueles que causaram a epidemia de FHD de 1989 a 1991 no Sri Lanka e Índia (Gubler. 1998; Lanciotti *et al.*, 1994) Das 37 seqüências estudadas, 27 estavam disponíveis no Genbank e foram usadas para comparação de homologia. A seqüência de VDEN2 foi utilizada como representante de grupo externo para estudo de filogenia.

As 10 seqüências brasileiras analisadas no período de 2001-2002 foram de números de passagens baixa em cultura de células ou extraída direto de soro do paciente. Análise de identidade nucleotídica apresentou resultados semelhantes aos descritos anteriormente com um percentual de identidade de 89,6 a 100% quando comparadas entre si e com 27 seqüências obtidas do Genbank (NIH/NCBI) usando o método clustal W (tabela 10).

As seqüências brasileiras agruparam-se em quatro subgrupos dentro do genótipo III, esses subtipos surgiram provavelmente em decorrência da

rápida dispersão do vírus VDEN3, com elevado índice de replicação viral. Estes dados são sustentados pelos valores de "Bootstraps" de em torno de 88% observados nas árvores filogenéticas usando os métodos de MP e agrupamentos de vizinhos (Figuras 17 e 18).

Algumas evidências foram obtidas sobre evolução do genótipo do subcontinente indiano desde 1989, os vírus desse genótipo foram identificados como causador de FHD no Sri Lanka (Lanciotti *et al.*, 1994). Alguns estudos descreveram as mutações que são responsáveis por essa variação fenotípica da mesma forma como foi feito para VDEN2 (Messer *et al.*, 2002). De acordo com o perfil epidemiológico e o genótipo circulante podemos dizer que o genótipo III que foi introduzido nas Americanas proveniente do Sudeste Asiático pertencente ao genótipo do subcontinente indiano, tem um fenótipo de elevada virulência, possui uma alta capacidade de replicação em células humanas, que estão envolvidas na patogênese da doença (Rico-Hesse, 2003).

Este genótipo tem estado envolvido em várias epidemias na América central e Sula. No Brasil o vírus VDEN3 teve seus primeiros casos importados em 2000 no Estado de São Paulo, em seguida foram detectados casos autóctones no Rio de Janeiro. No ano de 2001 ocorreu a primeira epidemia, também no Rio de Janeiro, com elevado número de casos de FHD, sendo identificado o vírus VDEN3 como pertencente ao genótipo III, similar às cepas que circulam no Srilanka. Podemos observar que a dispersão do VDEN3 no Brasil se deu da região sudeste para o norte, e com o aumento da replicação viral ocorreu à diminuição dos casos de FHD, e nossos resultados mostraram claramente que as seqüências dos vírus estudados agruparam-se em quatro clades (subgrupos) que coincidem com o quadro clínico apresentado pelo paciente (figura 17). Nos subgrupos A e B estão os vírus relacionados com quadros clínicos mais severos e nos C e D febre de dengue clássica (figuras 17 e 18).

Marcadores de Virulência

Apesar das poucas informações sobre as bases de moleculares de virulência do VDEN3, alguns marcadores moleculares foram identificados para o VDEN3, a maioria dos estudos foram realizados com objetivos específicos para determinação de fatores de atenuação e virulência de candidatos à vacina

para VDEN. O Vírus VDEN3 possui alguns marcadores localizados nos ectodomínios I e II, sendo na proteína E nos resíduos de aminoácidos 54 (A→E), 277 (F→S) inseridos no cluster B 18 (A→S) inseridos no cluster D, 401 (E→K) e 406 (K→E) inseridos no cluster E. Os domínios I e II estão envolvidos no peptídeo de fusão e trimerização da proteína E solúvel (Hurrelbrink and McMinn, 2003).

A comparação realizada entre as 10 seqüências das amostras virais de nosso estudo isoladas no Brasil, com 27 seqüências obtidas do genbank,

Mostrou que quando comparamos com vírus do Sri Lanka (1991), observamos alterações de nucleotídeos (anexo) que levaram a mudança de aminoácidos (figura 12), contudo a maioria dessas alterações está presente nas seqüências do primeiro vírus VDEN3 isolado no Rio de Janeiro (tabela 17). Observamos também que na região do ectodomínio III está altamente conservada quando comparada ao vírus do Srilanka, essa região corresponde à porção solúvel da proteína e sua conformação é semelhante a da imunoglobulina e contém regiões importantes como receptor de ligação da integrinas encontrada na superfície celular (Bhardway *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1997; Crill and Roehrig, 2001; Mandl *et al.*, 2001). Foram detectadas mudanças no resíduo de aminoácido E251 (K→E), nos vírus AM2394 e RGN576, e resíduo E321 (K→R) nos vírus AM2394. O resíduo E251 está no ectodomínio II, na porção responsável pela atividade de fusão da proteína e o E321 na porção do ectodomínio III e estão relacionados à estabilidade da interação com o receptor.

Mesmo havendo um elevado grau de homologia entre si e poucas alterações genéticas significativas entre as seqüências analisadas, o grau de severidade de doenças com FHD observado nos registros epidemiológicos podem ser justificados pelas mutações pontuais encontradas no ectodomínio III, que está mais exposto ao sistema imune (Tabela 17).

A alteração no resíduo do aminoácido 86 observada na proteína prM deve ser melhor estudado para entendermos o seu papel no mecanismo de virulência ou replicação viral.

Ao relacionarmos patogenicidade versus virulência foi possível observar que o aumento da replicação com a dispersão do VDEN3 levou a uma diminuição do seu potencial patogênico, provavelmente em decorrência de

acúmulos de mutações silenciosas que possam desenvolver uma diferenciação genética (Tabela 17). Contudo, a gravidade da doença também está relacionada à outros fatores importantes envolvidos na patogêneses dos vírus VDEN, como: resposta imune, fatores nutricionais, etc. que associados ao tipo de cepa dentro de um sorotipo pode facilitar o desencadeamento de manifestações hemorrágicas que pode ou não levar a SCD.

8 - DISCUSSÃO

Parte II – Caracterização Biológica do VDEN2

Desordens neurológicas, anormalidades cardíacas e hepatite têm sido registradas como complicações incomuns nas formas clínicas de febre de dengue (FD) e febre hemorrágica de dengue (FHD). Durante anos de literatura registra o aumento do número de casos de dengue associados com manifestações neurológicas (Nimmannitya *et al.*, 1987; George *et al.*, 1989; Chimelli *et al.*, 1990; Patey *et al.*, 1993; Thisyakorn and Thisyakorn, 1994; Lum *et al.*, 1996; Row *et al.*, 1996; Hommel *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2000; Leão *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2002). Alguns casos de complicações neurológicas têm levado pacientes ao óbito, no entanto ainda é pouco esclarecida a principal causa, pois o mecanismo de neurovirulência sempre vem associado aos casos graves de FHD (Hommel *et al.*, 1998; Miagostovich *et al.*, 1997). No Brasil cerca de oito casos foram confirmados clínica e laboratorialmente como sendo pacientes que manifestaram complicações neurológicas (Chimelli *et al.*, 1990; Miagostovich *et al.*, 1997; Leão *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2002).

Poucos estudos têm sido realizados para explicar esse potencial de neurovirulência, sabe-se que há uma freqüência mais elevada em locais onde há uma maior incidência epidêmica do vírus dengue (VDEN), como tem ocorrido principalmente no Sudeste Asiático e nas Américas.

Inicialmente associava-se mais comumente essa complicação neurológica aos casos de FHD e síndrome de choque por dengue (SCD), provavelmente causado pelo choque prolongado, acidose metabólica e distúrbio eletrolítico, falência do fígado e comprometimento da coagulação intravascular que desencadearia a hipoxia e isquemia cerebral (Nimmannitya *et al.*, 1987; Hendarto e Hadenigoro, 1992). Contudo, detecção de vírus VDEN em fluído cérebro espinhal, histopatologia e imunohistoquímica dos casos de óbito indicaram o neurotropismo viral e seu potencial de replicação (Chimelli *et al.*, 1990; Miagostovich *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2002). Outro fato importante foi a confirmação tanto por sorologia como detecção viral, seja por métodos de isolamento ou detecção molecular de casos de FD associados com manifestações neurológicas, sugerindo assim que havia algum fator de virulência envolvido no desenvolvimento desse quadro clínico (Nimmannitya *et*

al., 1987; George *et al.*, 1989; Chimelli *et al.*, 1990; Patey *et al.*, 1993; Thisyakorn and Thisyakorn, 1994; Lum *et al.*, 1996; Miagostovich *et al.*, 1997; Hommel *et al.*, 1998; Solomon *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2002; Kunishige *et al.*, 2004).

A relação com o sorotipo do vírus é pouco provável, pois há casos notificados envolvendo pelo menos os três principais sorotipos envolvidos na ocorrência das epidemias, que são dengue 1, 2 e 3 (Patey *et al.*, 1993; Deprès *et al.*, 1996; Nogueira *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 1998) estabeleceu as bases moleculares da aquisição de neurotropismo do vírus VDEN2, cepa Nova Guiné C, adaptada laboratorialmente em camundongo. Posteriormente outras investigações foram realizadas com vírus VDEN1 em camundongos neonatos e células de neuroblastoma de camundongo (Deprès *et al.*, 1996, Deprès *et al.*, 1998). Estes estudos mostraram que a replicação viral está restrita aos neurônios das regiões cortical e hipocampo. A linhagem celular de neuroblastoma murino Neuro 2a sofre apoptose após infecção (Deprès *et al.*, 1998).

Neste trabalho estudamos o neurotropismo do vírus VDEN2 (Bel61082) isolado de um paciente que apresentou manifestações neurológicas. Através da inoculação intracerebral em camundongos neonatos observamos que os mesmos não apresentaram sinais aparentes de doença. Já animais inoculados com o vírus VDEN2 cepa neuroadaptada NGC apresentaram todos os sinais de distúrbios neurológicos como, parestesia e encefalite, do terceiro ao sexto dia (Tabela 19). Após a infecção mesmo sem os sinais de doença, todos os animais foram sacrificados para retirada de cérebro e fígado e submetidos a RT-PCR.

Os resultados mostraram presença do vírus VDEN2 Bel61082 no cérebro de animais inoculados do quarto ao sexto dia, assim como o vírus VDEN2 NGC. Já o vírus VDEN2 44/2 não foi detectado (Figura 19). Esses resultados foram similares ao encontrado por Deprès *et al.* (1998) com VDEN1, onde foi mostrada a replicação, no sistema nervoso central (SNC) de camundongo. A ausência de manifestações clínicas de encefalite em camundongo intracerebralmente é uma característica do grupo antigênico do dengue. Contudo as cepas de VDEN podem ser adaptadas através de diversas

passagens em cérebro de camundongo para aquisição de neurotropismo (Sabin, 1952; Bray *et al.*, 1998; Deprès *et al.*, 1998).

Os estudos utilizando linhagens celulares originárias de tecido nervoso para infecção com vírus VDEN2, VFA (17DD) e a quimera 17D/D2 nos permitiram observar um neurotropismo que variou de acordo com tipo celular e vírus. Os ensaios realizados com cultura de primária de astrócito PO (nascimento), neurônio de células de embrião de rato E16 (16^a semana da vida embrionária) e linhagem contínua de células de cultura de glioma humano U87 mostraram sua elevada sensibilidade para vírus VDEN2.

As culturas primárias de astrócitos infectadas com o vírus Bel61082 foram observadas apenas ECP, onde a proliferação de microglias foi a única alteração detectada (Figura 20). A presença de alterações morfológicas com total destruição das células neuronais 96 H p.i, com os vírus VDEN2 NGC, Bel61082 e 44-2 (Figura 21), o ECP nos indicou que havia uma maior susceptibilidade dos vírus para essas células, dessa forma a utilizamos para os estudos imunocitoquímico.

Os resultados da imunocitoquímica mostraram alterações morfológicas em neurônios infectados com o vírus Bel61082. Como pode ser visto na figura 25, há ainda uma intensa marcação do vírus com o anticorpo anti-VDEN2 ligado a rodamina no citoplasma celular que se apresentou de cor alaranjada. Essa marcação pode ser vista também na infecção dos vírus 44/2, NGC, 17D/D2 e VFA (17DD) quando comparados ao controle negativo que não apresentou marcação (figuras 22, 23, 27, 29 e 31).

Quando analisamos a infectividade dos vírus VDEN2 observamos uma ampla marcação no citoplasma celular refletindo a presença maciça dos antígenos virais.

O índice de infectividade nos permitiu avaliar e concluir que entre diferentes amostras de vírus VDEN2 há uma seletividade na permissividade à infecção de célula neuronal. Os vírus VFA 17DD, VDEN2 44/2 e VDEN2 Bel61082 apresentaram infectividade semelhante (49%, 50% e 54%, respectivamente) mas inferior à média para a cepa neurovirulenta de VDEN2 NGC (68%). Ainda pudemos ver que o vírus quimérico (17D/D2) apresentou uma baixa infectividade (32%) que corresponde a apenas 50% da cepa NGC (Fig. 29). Quando avaliamos a média de infecção vimos que ocorreu uma

intensa destruição celular causada pelos vírus Bel61082 e NGC (tabela 14). A cultura infectada com o vírus 17D/D2 apresentou um maior número de células íntegras demonstrando que há uma baixa permissividade ou baixo nível de replicação deste vírus nas células neuronais (figuras 33 e 34).

Esses resultados nos levam a crer que existam determinantes que permitem a entrada e a replicação do VDEN2 nos neurônios, e que a infecção pode desencadear alterações bioquímicas capazes de induzir modificações morfológicas ou mesmo morte celular. Os determinantes de fusão ou adesão do vírus à célula hospedeira tem sido objeto de estudo para explicar a natureza da interação do vírus com as células alvos. Chen e colaboradores determinaram em estudos com várias linhagens celulares incluindo microglias, que os resíduos responsáveis pelo mecanismo de interação do vírus VDEN com as células alvos estão localizados nos resíduos de aminoácidos E281 e E423 que corresponde ao domínio III (Chen *et al.*, 1996).

Como o vírus 17D/D2 contém o domínio III da proteína E do vírus VDEN2 44/2 (Caufour *et al.*, 2001). Este domínio responde pelo tropismo e adesão aos receptores celulares (Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2004).

O vírus 44/2 apresenta uma maior infectividade que a quimera, é provável que sua menor infectividade na realidade se deva a um menor grau da replicação. Por outro lado, o vírus 17DD também replica melhor que a quimera neste tipo de célula. A quimerização aparentemente torna o vírus menos virulento como detectado em camundongo (Caufour *et al.*, 2001) e macacos (Galler *et al.*, 2005).

Uma evidente alteração morfológica da árvore neurítica é verificada na célula neuronal após a infecção viral. Neurônios, em cultura primária emitem ramificações arborescentes, com prolongamentos chamados neuritos que tanto podem ser axônios ou dendritos (Garcia *et al.*, 1995). Nossas culturas de células em condições controles mostram esta árvore neurítica bem desenvolvida. No entanto, a infecção viral caracterizou-se por promover inicialmente uma intensa formação de varicosidades ao longo dos neuritos e a posterior fragmentação dos neuritos com a progressão da infecção viral.

O suporte físico dos neuritos é garantido pelo citoesqueleto, constituído, por exemplo, de microtúbulos, com proteínas do tipo tubulina específicas de neurônios (Moura Neto *et al.*, 1983). A actina, com seus filamentos e os

filamentos intermediários neuronais, o triplet NF-L, NF-M, NF-H, pode sustentar a formação neurítica.

Como observamos uma perda ou pelo menos a fragilização dos neuritos, é provável que o citoesqueleto neuronal seja afetado durante a infecção viral. Essa alteração deve ser uma consequência de mudanças metabólicas na célula infectada, devido à formação extensa de estruturas membranares (Grief *et al.*, 1997) para a maturação viral ou ainda produto das alterações gênicas advindas dos sinais iniciais de apoptose provocados pelo acúmulo de proteína viral nestas estruturas (Catteau *et al.*, 2002).

Embora não possamos dizer que o citoesqueleto neuronal é um alvo primário da infecção, nossos resultados mostram que ele é um dos alvos da ação dos vírus. A ação de outros vírus sobre o citoesqueleto já tem sido descrita e não podemos deixar de assinalar aqui que nossos resultados apontam para este efeito em neurônios (Ferreira *et al.*, 1994). Estudos envolvendo infecção de células BHK-21 com o vírus vaccinia mostram a associação entre estruturas do vírus vaccinia e filamentos intermediários em áreas específicas do citoplasma das células infectadas sugerindo que a infecção do vírus vaccinia interfere na arquitetura celular pela modificação da rede de filamentos intermediários. Proteínas do citoesqueleto são alvos da infecção viral atuando no transporte intracelular das moléculas virais (Ferreira *et al.*, 1994).

As ações de outros vírus no citoesqueleto celular também já foram descritas, entre eles temos o vírus canino causador da sinomose que induz a reorganização das estruturas do citoesqueleto (microfilamento, microtúbulos e filamentos intermediários) da célula do hospedeiro (Howard *et al.*, 1983; Murti e Goorha, 1983). Os microfilamentos também estão relacionados à saída do vírus do Sarcoma Rous de fibroblastos infectados (Stanislowski *et al.*, 1984) e microtúbulos também estão envolvidos na organização dos vírus nas células infectadas (Carvalho *et al.*, 1988).

Em células da glia, a infecção viral também causa a desorganização do citoesqueleto. Neste caso só verificamos a alteração dos filamentos de vimentina. Vimentina, uma proteína de filamento intermediário, é reconhecida como alvo de infecção viral. A ação do vírus vaccinia leva a fosforilação da vimentina em células BHK (células epiteliais de rim de Hamster neonato), com

reorganização arquitetural deste componente do citoesqueleto (Ferreira *et al.*, 1994).

Nós não sabemos se a fosforilação de vimentina ocorre sob ação dos diferentes vírus utilizados. Nem mesmo se a fosforilação precede a desorganização e aparente fragmentação do filamento de vimentina. Certamente esta questão merece um estudo posterior para esclarecer quais as conseqüências da infecção por flavivirus sobre o citoesqueleto celular e se poderia consistir num parâmetro de atenuação viral.

Outra alteração morfológica observada em neurônios de ratos infectados com VDEN2 Bel61082 foi a presença de núcleos pequenos com condensação da cromatina em 72 H p.i. e em 96 H p.i. com a fragmentação internucleosomal do DNA (Figuras 25 e 26). Essa degradação é característica de núcleos apoptóticos, o que não foi observado em células de glioma humano infectado com o mesmo vírus decorrido o mesmo tempo de infecção (figuras 37, e 38). Em células de glioma humano houve drástica destruição celular que se iniciou 72 H p.i. e se acentou em 96 H p.i. (Figuras 37 a 38 e tabela 13).

As características morfológicas das células de glioma humano U87 infectadas com flavivirus mostram uma alta susceptibilidade à infecção viral. Os dois tempos (72 e 96 H.) coletados no estudo apresentaram diferentes alterações. O vírus 44-2 mostrou marcação fluorescente em todo o citoplasma e o núcleo pareceu aumentar de volume quando comparado ao controle negativo (figuras 35 e 36). Para o vírus Bel61082 observamos a fluorescência em todo o citoplasma que se intensificou a partir das 96 H p.i, com intensa destruição celular semelhante ao que ocorreu com o vírus VDEN2 NGC (figuras 38 e 39). Esses resultados foram confirmados com a titulação desses vírus por análise de PFU (unidade formadora de placa). A curva de crescimento mostrou uma elevada produção de partículas virais do vírus VDEN2 NGC, cepa neuroadaptada, e uma acentuada produção no vírus selvagem VDEN2 Bel61082 semelhante ao ocorrido com o vírus VFA 17DD, enquanto que os demais vírus VDEN2 44-2 e quimérico 17D-D2, mostraram-se com baixa poder de replicação, onde não foi detectado nas primeiras 24 H pi, ainda com rápida e baixa multiplicidade (Tabela 12 e figura).

Dessa forma podemos dizer que os *Flavivirus* possuem um bom desempenho de infecção e replicação em células neuronais, variando de cepa

para cepa. Esses resultados nos permitem dizer que há uma susceptibilidade desses vírus em células neuronais, o que é muito importante no estudo de neurovirulência, pois os mecanismos pelos quais os vírus desenvolvem o tropismo ainda são pouco esclarecidos. Sabemos que há várias evidências já confirmadas da presença do VDEN2 na área cinzenta do cérebro, com predomínio de astrócitos infectados (Miagostovich *et al.*, 1997; Kunishige *et al.*, 2004), contudo a maior indicação da gravidade é provavelmente a indução de apoptose em células neuronais pelo vírus VDEN2 (Deprès *et al.*, 1996; Miagostovich *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2002, Catteau *et al.*, 2002).

A apoptose decorrente de infecção por VDEN1 e VDEN2 foi descrita anteriormente em tecido nervoso (Deprès *et al.*, 1996; Miagostovich *et al.*, 1997; Nogueira *et al.*, 2002, Catteau *et al.*, 2002), no entanto pouco tem sido descrito sobre o mecanismo de desencadeamento da morte celular por apoptose induzida por VDEN. A análise dos tamanhos de núcleos dos neurônios primários infectados com os vírus Bel61082, NGC e 17D/D2 mostram que não houve diferença significativa, com o diâmetro nuclear variando de 20 a 40 μm , como nas células não infectadas. Entretanto, a infecção com os vírus 44-2 e VFA-17DD levou a um aumento de volume nuclear que variou na faixa de 60 a 130 μm quando analisados 72 H p.i. No entanto, esses mesmos vírus apresentaram uma pequena diferença, entre eles. Em 96 H p.i., o vírus 44-2 provocou uma redução de tamanho nuclear (10 a 90 μm) enquanto o vírus Bel61082 levou a um aumento da frequência de núcleos pequenos em torno de 8 μm (Figura 44). Os demais vírus não induziam variação no tamanho do núcleo das células infectadas.

Essa variação morfométrica poderia ser decorrente da hiperatividade metabólica da célula induzida pela infecção viral. Como visto anteriormente na infecção do vírus vaccinia, na terceira hora p.i. foi observada em microscópio confocal, filamentos de vimentina ao redor núcleo celular da maioria das células infectadas, agindo como carreador de moléculas virais, induzindo alterações no metabolismo celular (Ferreira *et al.*, 1994). Resumidamente podemos ver na tabela 13 as principais características das células neuronais infectadas com os flavivirus.

Tabela 22: Principais características encontradas nas células neuronais primárias e gliais infectadas com *Flavivirus*.

Vírus	Tempo de infecção 72 H				Tempo de infecção 96 H			
	Alteração da forma	Alteração do volume	Destruição celular	Núcleo fragmentado	Alteração da forma	Alteração do volume	Destruição celular	Núcleo fragmentado
MOCK	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
VDEN2-	++	+	++	-	+	++	++	+
NGC	+++	-	+++	-	+++	+++	+++	-
VDEN2-	+	++	+	++	+	+++	+	++
44/2	-	-	-	-	-	-	-	-
VDEN2-	+++	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Bel61082	+	-	+	-	+++	+++	+++	-
FA17DD	++	+	++	-	++	+	++	-
	++	-	++	-	++	+	++	-
17D-D2	+	+	+	-	++	+	+	-
	+	-	+	-	+	-	-	-

As alterações morfométricas dos núcleos de células infectadas com os diversos vírus, figuras 44 e 45 (anexo); incluindo presença de cromatina condensada e fragmentação internucleosomal sugere indução de apoptose ou necrose nas células neuronais decorrente da infecção pelos vírus VDEN2 Bel61082 e NGC (figuras 25, 26, 27 e 28).

No entanto, apesar de todas as evidências morfológicas, não pudemos confirmar que essas alterações nucleares detectadas sejam de apoptose ou necrose, mesmo sabendo que a coloração nuclear nos permite sugerir que esse tipo de fragmentação e condensação da cromatina seja típico de núcleo apoptótico (Cai *et al.*, 2005). Dessa forma, para evidenciarmos e confirmarmos o desencadeamento de apoptose, técnicas específicas de detecção da fragmentação do ADN pelo BrdU (túnel) deve ser utilizadas futuramente. Esta técnica fundamenta-se na exploração das quebra dos ADNs que expõe um grande número de radicais 3'-hidroxil em células apoptóticas. Os grupos hidroxil servem como iniciadores dos pontos terminais da deoxinucleotidil transferase (TdT) que atua na adição de nucleotídeos do ADN molde. A adição da 5'-bromo-2'-deoxiuridina 5' –trifosfato (BrdUTP) análogo da desoxitimidina reage com o TdT marcando os sítios de quebras (Trends Cell Biol 5, 21, 1995; Informe técnico do Kit APO-BrdU TUNEL – Molecular Probes, 2001).

A produção intracelular de proteínas virais é essencial para a indução de apoptose pelos flavivirus (Deprès *et al.*, 1996; Duarte dos Santos *et al.*, 2000; Prikhod'ko *et al.*, 2001, 2002). Dentre as proteínas virais responsáveis pelo desencadeamento da cascata apoptótica da célula hospedeira, o ectodominio M foi identificado participando diretamente nesse mecanismo de ativação (Catteau *et al.*, 2003).

Foi demonstrado por Catteau *et al.*, (2003) que a produção intracelular do ectodominio M (resíduos de M1-M40) de todos os quatro sorotipos iniciou o processo de apoptose em células hospedeiras tais como, células de neuroblastomas. A região de nove aminoácidos carboxi terminal (resíduos M-32 a M-40) foi designado como *ApoptoM* (Catteau *et al.*, 2003).

Neste sentido quando analisamos a seqüência de aminoácidos obtida do vírus Bel61082 observamos uma variação no resíduo M28 (Lys-Glu), que está presente na cepa NGC neuroadaptada e não está presente no vírus 44-2 (Figura 46). Porém, percebemos que o aminoácido Lys está presente nos vírus

de origem Asiática e não naqueles pertencentes ao genótipo Americano (Tabela 14 e Figura 12).

Tabela 23: Distribuição da variação de aminoácido no gene da proteína M do vírus VDEN2.

Vírus	POSIÇÃO NO GENE DA POTEINA M DO VIRUS VDEN2		
	28	31	39
Jam 83	E	V	I
44-2	K	V	I
NCG	E	V	M
Bel61082	E	V	I
Ror1811	E	V	M
Af100464 –Tai-96	E	V	M
Af100467-Per-95	K	T	M
Af100469-Mex-92	K	T	M

Note: Os vírus apresentados na tabela são os usados no estudo de neurovirulência e representantes do vírus VDEN2 pertencentes ao genótipo II, III e IV .

No que se refere á proteína E, não foi possível detectar a alteração descrita por Bray e colaboradores (Bray *et al.*, 1998) que mostraram que uma mudança de Glu-Lis no resíduo E126, estava relacionada com o aumento foi de neurovirulência da cepa NGC de VDEN2.

Permanece em aberto se essa alteração poderia explicar a indução de sinais de apoptose por estes vírus, mas não pelo 44-2. Para confirmarmos a importância dessa alteração no resíduo M-28 na neurovirulência e/ou apoptose, estudos posteriores devem ser realizados via mutagênese do clone infeccioso (Caufour *et al.*, 2001).

Neste particular, nossos resultados sobre o neutropismo das variantes dos vírus VDEN2 são pioneiros no Brasil. Pioneiros pelo detalhamento do processo infectivo e sua consequência sobre a viabilidade celular, alteração de relação volumétrica núcleo/citoplasma, arredondamento da forma de células gliais e neuronais, perda de neuritos, aparente fragmentação de citoesqueleto de vimentina de células gliais, alterações citoplasmáticas precedidas de condensação de cromatina e fragmentação nuclear. Estas, resumidamente,

são as alterações celulares que aparecem progressivamente durante o processo da infecção dos *Flavivirus* estudados *in vitro*.

Este é o primeiro utilizando-se neurônios, porque trabalha com neurônios sadios, normais, submetidos à infecção por *Flavivirus*. É pioneiro para o estudo da infecção glial, uma vez que utilizando uma linhagem tumoral, também analisa a infecção de uma célula glial humana.

Nosso estudo não é completo, apontamos inclusive como continuá-lo. Mas, ele permite um grande avanço no conhecimento do neurotropismo do vírus VDEN e certamente contribui para o esclarecimento de sua ação no sistema nervoso. Estes estudos constituem também a base para o estabelecimento de sistemas celulares para a avaliação da atenuação de *Flavivirus* com ênfase nos vírus quiméricos.

9-CONCLUSÃO

Parte I

- Os 11 vírus VDEN2 estudados de origem geográfica distinta e de diferentes períodos de circulação em surtos e epidemias ocorridas no Brasil mostram que há uma forte ocorrência de mutações silenciosas, porém essas mutações não induziram alterações significativas na atividade biológica desse vírus;
- O percentual médio de identidade nucleotídica e aminoácido de entre os 11 VDEN2 comparados entre si e com 16 outros vírus VDEN2 foi de 89,5 a 99,8%, respectivamente.
- Estudos filogenéticos realizados com os 11 vírus VDEN2 juntamente com outros vírus VDEN2, mostram que estão todos agrupados no genótipo III, de origem Asiática;
- As mutações *in situ* ocorridas pelo vírus VDEN2 desde sua entrada no Brasil, originam agrupamentos dentro do genótipo III no Brasil, e são diferentes geograficamente;
- A região gênica estrutural usada no estudo é a que mais sofre pressão seletiva do sistema imune, pois a glicoproteína E é a mais exposta na superfície do vírus. Nesse sentido podemos sugerir que as alterações ocorridas nessa região gênica possuem potencial de desencadear o quadro clínico de FHD, no entanto associados a outros fatores externos, como da ativação de anticorpos heterólogos;
- O resíduo E-390 (L→E) que diferenciou os genótipos Americano e Asiático, nos vírus VDEN2 estudados foram semelhantes ao de origem Asiática, que estão relacionados a maior gravidade da doença;
- A presença do aminoácido E no vírus 44-2 e o seu perfil genético semelhante ao do genótipo Americano podem ser devido às sucessivas passagens sofridas em cultura de células Vero;
- A análise de patogenicidade dos vírus VDEN2 estudados, de acordo com seu perfil de doença, mostra que as alterações de aminoácidos ocorridas semelhantes ao dos VDEN2 do sudeste Asiático, não foram responsáveis pelas graves manifestações clínicas ocorridas em epidemias no Brasil;

- Análise de identidade nucleotídica e de aminoácidos, entre os 10 VDEN3 do estudo comparados entre si e com 27 outros vírus mostrou um percentual médio de 89,6 a 100%, respectivamente;
- Os estudos filogenéticos realizados com os 10 VDEN3 mostraram que no Brasil há um genótipo circulante que é o genótipo III, proveniente do Sudeste Asiático, como ocorrido em todo o continente Americano;
- As seqüências dos VDEN3 brasileiros formaram agrupamentos em quatro subgrupos dentro do genótipo III;
- No que diz respeito a sua virulência podemos observar que há alteração significativa no domínio III da proteína E (E-391) do vírus AM2394, que está relacionado com receptor de ligação e deve participar do perfil de patogenicidade do vírus circulante naquele Estado;
- Foram detectadas alterações importantes no domínio II (E-321), como nos vírus AM2394 e RGN576, os dois vírus são procedentes da mesma região geográfica e com quadro clínico similar;
- O aumento da dispersão do vírus no país levou a uma diminuição no número de casos graves como FHD, com conseqüente diminuição da patogenicidade.

10- CONCLUSÃO

Parte II

- No estudo de neurovirulência de VDEN2 com vírus isolado de paciente com manifestações neurológicas (Bel61082), em camundongo neonato inoculado intracerebralmente (IC), observamos que apenas o vírus controle neurovirulento adaptado cepa NGC acarretou sinais de distúrbios neurológicos, os demais vírus Bel61082 e 44-2 não causou nenhum sinal aparente;
- Podemos detectar a presença do vírus VDEN2 Bel61082 e NGC por RT-semi-nested-PCR, do quarto ao sexto após inoculação IC, entretanto não foi detectado o vírus controle 44-2, esses resultados indicam o neutropismo do VDEN2 selvagem mesmo com ausência de manifestações clínicas de encefalite nos animais;
- Nos estudos de infecção *in vitro* em cultura primária de astrócito de camundongo e neurônio de rato, podemos dizer que há um neurotropismo elevado para VDEN2 nas duas culturas usadas, como podemos ver pelo efeito citopatogênico induzido;
- Estudos de imunocitoquímica em cultura primária de neurônios de rato infectados com *Flavivirus* mostraram que há grandes alterações morfológicas, tanto no citoplasma como no núcleo das células infectadas com os vírus VDEN2 NGC e Bel61082 em dois tempos de coleta. Já os vírus VDEN2 44-2, vírus VFA 17DD e o quimérico 17D-D2, não mostraram fortes modificações morfológicas;
- Podemos observar mais detalhadamente nas células infectadas com os vírus Bel61082 e VDEN2 NGC, alterações morfológicas no núcleo dos neurônios, como diminuição de tamanho e condensação com fragmentação da cromatina, essa característica é típica de célula em apoptose;
- Análise comparativa do tamanho do núcleo nos *Flavivirus* estudados mostra que o tamanho do núcleo pode estar relacionado a sinais de apoptose, contudo deve-se observar a presença de fragmentação da cromatina;
- Os estudos *in vitro* realizados em células de glioma humano linhagem U87 mostraram uma alta susceptibilidade à infecção dos *Flavivirus*, pois os tempos coletados mostraram diferentes alterações morfológicas;

- Não há evidências de sinais de apoptose nas células de glioma humano U87 infectadas com *Flavivirus*;
- Nosso estudo de neurovirulência de *Flavivirus* estabeleceu um método de sistemas celulares para avaliação da atenuação viral com ênfase nos vírus quiméricos, baseados em neurônios primários de rato e glioma humano;
- A análise molecular do vírus Bel61082 mostrou que o vírus possui uma alteração específica na região M28, próxima ao sítio pro-apoptótico determinado anteriormente por Catteau e colaboradores (2003) e que está presente na cepa NGC.
- Não detectamos nenhuma alteração no resíduo E-126, descrito por Bray e colaboradores. (1998) como sendo o principal indutor de neurovirulência por VDEN2.

9-PERSPECTIVAS FUTURAS

- 1- Estabelecer o monitoramento das cepas circulantes de VDEN 1, 2 e 3 no Brasil, inclusive aquelas isoladas em artrópodes por sequenciamento nucleotídico;
- 2- Ampliar estudos moleculares usando técnicas mais avançadas da engenharia genética para relacionar alguns pontos de mutação com o grau de virulência e patogenicidade;
- 3- Ampliar os estudos com um maior número de vírus VDEN, inclusive com isolados mais antigos para estudo de evolução e possível recombinação;
- 4- Analisar outras regiões gênicas codificadoras ou não codificadoras do genoma de VDEN;
- 5- Ampliar estudos de neurovirulência com outras linhagens celulares primárias ou contínuas de tecido nervoso;
- 6- Realizar estudos de apoptose usando testes específicos para esclarecer o desencadeamento do processo de morte celular;
- 7- Realizar estudo de mutagenese do clone infeccioso para estabelecermos se as mutações detectadas estão envolvidas na atividade de neurovirulência.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN M, PADMANABHAN R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. **J Biol Chem.** 2001; 276(43):39926-37.

ALLISON, S.L.; SCHALICH, J.; STIASNY, K.; MANDL, C.W.; HEINZ, F.X. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. **J Virol** 2001; 75 (9): 4268-4275.

ALLISON, S.L.; SCHALICH, J.; STIASNY, K.; MANDL, C.W.; KUNZ, C.; HEINZ, F.X. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. **J. Virol.**, 1995; 69:695-700.

AMBERG, S.M.; NESTOROWICZ, A.; McCOURT, D.W.; RICE, C.M. NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: In vitro and in vivo studies. **J Virol** 1994, 68: 3794-3802.

ARIAS, C.F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J.H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology** 1993, 193: 888-889.

BALMASEDA, A.; SANDOVAL, E.; PEREZ, L.; GUTIERREZ, C.M.; HARRIS, E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 1999, 61:893-897.

BARBOSA DA SILVA J JR, SIQUEIRA JB JR, COELHO GE, VILARINHOS PT, PIMENTA FG JR. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiol Bull.** 2002; 23(1):3-6.

BAZAN, J.F.; FLETTERICK, R.J. Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. **Semin. Virol.**, 1990, 1: 311-322.

BEATY B, CALISHER CH, SHOPE RE. Arboviruses. In: Schmidt NJ, Emmons RW(eds) Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infections, 6th edition. **American Public Health Association, Washington**, p. 797-855, 1989.

BLOCK, J.; SAMUEL, S.; GIBBS, A.J.; VITARANA, U.T. Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequences of the envelope gene from eight dengue 2 viruses. **Arch. Virol**, 1989, 105: 39-53.

BOEGE, U.; HEINZ, F.X.; WENGLER, G.; KUNZ, C. Amino acid compositions and amino terminal sequences of the structural proteins of a flavivirus, European tick-borne encephalitis virus. **Virology** 1983, 126: 651-657.

BRANDT, W.E.; CHIEWSLIP, D.; HARRIS, D.L.; RUSSEL, P.K. Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. **J Immunol** 1970, 105(6): 1565-1568.

BRAY, M.; MEN, R.; TOKIMATSU, I.; LAI, C-J. Genetic determinants responsible for acquisition of dengue type 2 virus mouse neurovirulence. **J Virol** 1998, 72(2): 1647-1651.

BRINTON, M.A.; DISPOTO, J.H. Sequence and secondary structure analysis of the 5' -terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology** 1988, 162(2): 290-299.

BRINTON, M.A.; FERNANDEZ, A.V.; AMATO, J. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. **Virology** 1986, 153: 113-121.

BURKE, D.S.; NISALAK, A.; JOHNSON, D.E.; SCOTT, R.M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **Am. Trop. Med. Hyg** 1988, 38: 172-180.

BUTRAPET S, HUANG CY, PIERRO DJ, BHAMARAPRAVATI N, GUBLER DJ, KINNEY RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. **J Virol.** 2000; 74(7):3011-9

CAI, Q.; NATALIA, I.D.; JOAN, D.F.; HEDDWEN, L.B.; BAS, W.M.V.B.; BURG, M. Pax2 expression occurs in renal medullary epithelial cells in vivo and in cell culture, is osmoregulated, and promotes osmotic tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2005, 102(2): 503-508.

CALISHER, C.H. AND GOULD, E.A. Taxonomy of the virus family *Flaviviridae*. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.**, California, Academic Press; 2003. v. 59. p. 1-19.

CAHOUR, A.; PLETENEV, A.; VAZIELLE, F.M.; ROSEN, L., LAI, C.J. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. **Virology** 1995, 207(1): 68-76.

CARVALHO, Z.G.; DE MATTOS, A.P.A.; RODRIGUEZ-POUSADA, C. Association of African swine fever virus with the cytoskeleton. **Virus Res.**, 1988, 11: 175-192.

CASALS, J. The arthropod-borne group of animals viruses. **Trans. N. Y. Acad. Scie**, 1957, Ser 2, 19:219-235.

CATTEAU, A.; KALININA, O.; WAGNER, M-C.; DEUBEL, V.; COURAGE, M-P.; DESPRÉS, P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as Apopto M. **J. Gen. Virol.**, 2003, 84: 2781-2793.

CAUFOR, P.S.; MOTTA, M.C.A.; YAMAMURA, A.M.Y.; VAZQUES, S.; FERREIRA, I.I.; JABOR, A.V.; BONALDO, M.C.; FREIRE, M.S.; GALLER, R. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. **Virus Research** 2001, 79: 1-14.

CECILIA D, GOULD EA. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. **Virology**. 1991;181(1):70-7

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Imported dengue – United States, 1993-1994. *Morb. Mortal. Wekl. Rep.*, 1995; 44: 353-356.

CHAMBERS, T.J.; NESTOROWICZ, A.; AMBERG, S.M.; RICE, C.M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. **J Virol**, 1993, 67: 6797-6807.

CHAMBERS, T.J.; GRAKOU, A., RICE, C.M. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: A catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. **J Virol**, 1991, 65: 6042-6050.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R., RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Ann Microbiol**, 1990a, 44: 649-688.

CHAMBERS, T.J.; WEIR, R.C.; GRAKOU, A.; McCOURT, D.W.; BAZAN, J.F.; FLETTERICK, R.J.; RICE, C.M. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site –specific cleaves in the viral polyprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1990b, 87: 8898-8902.

CHANG, H.H.; SHYU, H.F.; WANG, Y.M.; SUN, D.S.; SHUY, R.H.; TANG, S.S.; HUANG Y.S. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral

nonstructural protein 1 (NS1): Arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. **J Infect Dis**, 2002, 186(6): 743-751.

CHEN, C.J.; KUO, M.D.; CHIEN, L.J.; HSU, S.L.; WANG, Y.M.; LIN, J.H. RNA-protein interactions: Involvement of NS3, NS5 and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **J. Virol.**, 1997, 71(5): 346-3473.

CHIMELLI, L.; DUMAS, H.M.; BARRETO NETTO, M.; GRANDELLE, R.; DIAS, M.; GRAY, F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. **Clin Neuropathol.**, 1990, 9:157-162.

CHUNGUE, E.; DEUBEL, V.; CASSAR, O.; LAILLE, M.; MARTIN, P.M. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with wild or severe form for dengue fever in French Polynesia. **J. Gen. Virol.**, 1993, 74:2765-2770.

CHU, M.C.; O'ROURKE, E.J.; TRENT, D.W. Genetic relatedness among structural protein genes of dengue 1 virus strains. **J. Gen. Virol** 1989, 70: 1701-1712.

CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E.; SCHILESINGER, R.W. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**, 1981, 111: 73-83.

CLUM, S.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3 (pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. **J. Biol. Chem.**, 1997, 272(49): 30715-30723.

COLOGNA R. AND RICO-HESSE R. American genotype structure decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. **J Virol** 2003, 77: 3929-3938.

COLOGNA R.; ARMSTRONG P.M. AND RICO-HESS R. Selection for virulent dengue viruses occurs in human and mosquitoes. **J Virol** 2005, 79(2): 853-859.

CRILL, W.D.; ROEHRIG, J.T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **J. Virol.**, 2001, 75(16): 7769-7773.

CROOKS, A.J.; LEE, J.M.; DOWSETT, A.B., STEPHENSON, J.R. Purification and analysis of infectious virions and native non-structural antigens from cells infected with tick-borne encephalitis virus. **J Chromatogr** 1990, 502(1): 59-68.

CRUZ A.C.R., TRAVASSOS DA ROSA A.P.A., FERREIRA I.I., ALBUQUERQUE M.M. AND GALLER R. Ilheus virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) is closely related to Japanese encephalitis virus complex. **Intervirology** 1997, 40: 220-225.

CUI, T.; SUNGUE, R.J.; XU, Q.; LEE, A.K.; CHAN, Y.C.; FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, 1998, 246(2): 409-417.

CUNHA, R.V.; MIAGOSTOVICH, M.; SCHATZMAYR, H.G.; *et al.* Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 1999, 93: 247-249.

DE SIMONE, T.S.; NOGUEIRA, R.M.; ARAÚJO, E.S.; GUIMARÃES, F.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G.; SOUZA, R.V.; TEIXEIRA FILHO, G.; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV1, DENV2 and DENV3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Méd Hyg**, 2004, 98: 553-62.

DESPRÉS, P.; FLAMAND, M.; CECCALDI, P-E; DEUBEL, V. Human Isolates of Dengue Type 1 Virus Induce Apoptosis in Mouse Neuroblastoma Cells. **J. Virol.** 1996, 70(6): 4090-4096.

DESPRÉS, P.; FRENKIEL, M-P.; CECCALDI, P-E.; SANTOS, C.D.; DEUBEL, V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J Virol**, 1998., 72(1): 823-829.

DIAS, L. B. Patologia natural e experimental de arbovirus e vírus correlatos isolados na Amazônia. *In: Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical*. Belém, Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986: 439-450.

DOS SANTOS CL, BASTOS MA, SALLUM MA, ROCCO IM. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 2003; 45(1): 11-6

EDELMAN, G.M. Antibody structure and molecular immunology. **Science**, 1973, 180(88): 830-840.

EGLOFF, M.P.; BENARROCH, D.; SELISKO, B.; ROMETTE, J.L.; CANARD, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-) methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. **EMBO J.**, 2002, 21(11): 2757-2768.

FALCONAR, A.K. The Dengue virus nonstructural-1 (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin protein and bind to human endothelial cells: Potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol** 1997, 142(5): 897-916.

FALGOUT, B. AND MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **J Virol**, 1995, 69(11): 7232-7243.

FALGOUT, B.; MILLER, R.H.; LAI, C.-J. Deletion analysis of Dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 proteinase activity. **J Virol**, 1993, v. 67, p.2034-2042.

FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y.-M.; LAI, C.-L. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. **J. Virol.**, 1991, 65: 2467-2475.

FALGOUT, B.; BRAY, M.; SCHLESINGER, J.J.; LAI, C.-J. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus lethal dengue virus encephalitis. **J Virol** 1990, 64(9): 4356-4363.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C.-J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequences and the downstream nonstructural protein NS2a. **J Virol** 1989; 63(5): 1852-1860.

FERRER I., SARMIENTO J. (). Nascent Microglia In The Developing Brain. **Acta Neuropathol.** 1980; 1:61-67.

FERREIRA, L.R.L; MOUSSATCHÉ, N.; MOURA-NETO, V. Rearrangement of intermediate filament network of BHK-21 cells infected with vaccinia vírus. **Arch. Virol.**, 1994, 138: 273-285.

FLAMAND M, MEGRET F, MATHIEU M, LEPAULT J, REY FA, DEUBEL V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **J Virol.** 1999;73(7):6104-10

FUNASA/CENEPI/MS. **Relatório Técnico.** 2004

GALLER R, PUGACHEV KV, SANTOS CLS, OCHRAN SW, JABOR AV, RODRIGUES SG, MARCHEVSKY RS, FREIRE MS, ALMEIDA LFC, CRUZ ACR, YAMAMURA AMY, ROCCO IM, ROSA EST, SOUZA LTM, VASCONCELOS PFC, GUIRAKHOO F, MONATH TP. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. **Virology**, 2001, 290:309-319.

GALLER, R.; MARCHEVSKY, R.S.; CARIDE, E.; ALMEIDA, L.F.; YAMAMURA, A.M.Y.; JABOR, A.V.; MOTTA, M.C.A.; BONALDO, M.C.; COUTINHO, E.S.F.; FREIRE, M.S. Recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus: attenuation and immunogenicity for rhesus monkeys. *In press*.

GARCIA-ABREU J, MOURA NETO V, CARVALHO SL, CAVALCANTE LA. Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. **Glia**. 1995; 3:260-72.

GenBank/ncbi/nlm/nih/gov. Acesso em: 2005.

GEORGE, R.; GEETHAN, R.; FOO, L.S.; LIAM, C.K.; CHUA, C.T.; PANG, T.; LAM, S.K. Unusual clinical manifestations of dengue virus infection. **Dengue Newsletter WHO**, 1989, 14: 40-41.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J.S. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: Effects of pH and ammonium chloride. **J. Gen. Virol.**, 1986, 67: 1941-1950.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J.S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. **J. Gen. Virol.**, 1985, 66: 1969-1982.

GOMES, F.C.; MAIA, C.G.; DE MENEZES, J.R.; MOURA NETO, V. Cerebelar astrocytosis treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. **Glia** 1999; 3: 247-255.

GONÇALVES, A.P.; ESCALANTE, A.A.; PUJOL, F.H.; LUDERT, J.E.; TOVAR, D.; SALAS, R.; LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, 2002, 303: 110-119.

GORBALENYA, A.E.; DONCHENKO, A.P.; KOONIN, E.V.; BLINOV, V.M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. **Nucleic Acids Res.**, 1989, 17(10):3889-3897.

GRANGE, T.; BOULOY, M.; GIRARD, M. Stable secondary structure at the 3' end of the genome of yellow fever virus (17D vaccine strain). **FEBS Lett** 1985; 188: 159-163.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; SATHER, G.E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg.**, 1984, 33(1): 9ss-13ss.

GUBLER DJ. Dengue in the United States, 1982. **MMWR CDC Surveill Summ.** 1984;33(1):9SS-13SS.

GUBLER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990's: Top down or bottom up. **Am J Trop Med Hyg**, 1989, v. 40: 571-578.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler, D.J; Kuno, G. (eds.) **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Nova York, University Press, Cambridge, 1997. p. 1- 22.

GUBLER , D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev** 1998; 11: 480-496.

GUBLER, D.J.; MELTEZER, M. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) **Advances in Virus Research: Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world**, California, Academic Press; 2003. v. 59. p. .

GUZMÁN, M.G., KOURI, G.; BRAVO, J.; SOLER, M.; VASQUEZ, S.; MORIER, L. Dengue hemorrhagic in Cuba, 1981: A retrospective seroepidemiologic study. **Am J Trop Med Hyg**, 1990, 19: 500-512.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clin. Diagnostic Immunol.**, 1996, 3: 621-627.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G., VALDES, et al. Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. **Am J Epidemiol** 2000; 152: 793-99.

GUZMÁN, M.G., KOURI, G. Dengue: An update. **The Lancet**, 2002, 2: 33-42.

GUYATT, K.J.; WESTAWAY, E.G., KHROMYKH, A.A. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. **J. Virol. Methds**, 2001, 92(1): 27-44.

HAHN CS, DALRYMPLE JM, STRAUSS JH, RICE CM. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. **Proc Nati Acad Sci U S A**. 1987; 84(7): 2019-23

HAHN, K.A.; HAHN, Y.S.; RICE, C.M.; LEE, E.; DALGARNO, L.; STRAUSS, E.G., STRAUSS J.H. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **J Mol Biol** 1987; 198(1): 33-41.

HALL, R.A.; KHRAROMYKH, A.A.; MACKENZIE, J.M.; SCHERRET, J.H.; KHROMYKH, T.I.; MACKENZIE, J.S. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. **Virology** 1999; 264(1): 66-75.

HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S.; YAMARATA, C.; RUSSEL, P.K. Hemorrhagic fever in Thailand: newer, knowledge regarding etiology. **J Med Sci Biol.**, 1967; 17: 96-103.

HALSTEAD, S.B. Observation related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: VI. Hypothesis and discussion. **Yale J. Biol. Med.**, 1970, 42: 350-362.

HALSTEAD SB, PORTERFIELD JS, O'ROURKE. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. **EJ Am J Trop Med Hyg**. 1980; 29(4):638-42.

HALSTEAD, S.B. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue. **Rev Infect Dis.** 1984; 6 (2): 251-64.

HALSTEAD, S.B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, 1988, 239: 476-481.

HALSTEAD, S.B. PATHOPHYSIOLOGY AND PATHOGENESIS OF DENGUE HEMORRHAGIC FEVER. In Thongchuroen P., ed. Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever. **WHO Regional publication.** SEARO, 1993; 3: 80-103.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Curr Opin Infect Dis.** 2002;15(5):471-6.

HARRIS , E.; ROBERTS, T.G.; SMITH, L.; SELLE, J.; KRAMER, L.D.; VALLE, S.; SANDOVAL, E.; BALMASEDA, A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **J. Clin. Microb.** 1998, 36: 2634-2639.

HARRIS, E.; VIDEA, E.; PEREZ, L.; SANDOVAL, E.; TELLEZ, Y.; PEREZ, M.L.; CUADRA, R.; ROCHA, J.; IDIAQUEZ, W.; ALONSO, R.E.; DELGADO, M.A.; CAMPO, L.A.; ACEVEDO, F.; GONZALEZ, A.; AMADOR, J.J., BALMASEDA, A. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 in Nicaragua. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2000, 63:5-11.

HEINZ FX, STIASNY K, PUSCHNER-AUER G, HOLZMANN H, ALLISON SL, MANDL CW, KUNZ C. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. **Virology.** 1994 (a);198(1):109-17.

HEINZ FX, AUER G, STIASNY K, HOLZMANN H, MANDL C, GUIRAKHOO F, KUNZ C. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. **Arch Virol Suppl.** 1994 (b);9:339-48.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Curr Opin Microbiol.**, 2001, 4(4): 450-5.

HENCHAL, E.A.; HENCHAL, L.S.; SCHLESINGER, J.J. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. **J Gen Virol** 1988; 69(pt. 8): 2101-2107.

HILLS, D.M. Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias. **Syst. Biol.** 1989; 47: 3-8.

HOLMES, E.C. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. **Br. Med. Bull.** 1998; 54: 533-543.

HOWARD, J.M.; ECKERT, B.S.; BOURGUIGNON, L.Y.W. Comparison of cytoskeletal organization in Canine Distemper virus-infected and uninfected cells. **J. Gen. Virol.**, 1983, 64: 2379-2385.

HAMMON, W.M. Dengue haemorrhagic fever – do we know its cause?. **Am J Trop Med Hyg.**, 1973; 22: 82-90.

HENDARTO, S.K. AND HADENIGORO, S.R. Dengue encephalopathy. **Acta Paediatr. Jpn.**, 1992, 34: 350-357.

HOMMEL, D.; TALARMIN, A.; DEUBEL, V.; REYNES, J.M.; DROUET, M.T.; EARTHOU, J.L.; HULIN, . Dengue encephalitis in French Guiana. **Res Virol**, 1998, 149: 235-238.

HURRELBRINK, R.J.; McMINN, P.C. Molecular Determinants of virulence the structural and functional basis for flavivirus attenuation. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.**, California, Academic Press; 2003. v. 59. p. 01-42.

JACOBS, M.G.; ROBINSON, P.J.; BLETCHLY, C., MACKENZIE, J.M.; YOUNG, P.R. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-

phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **FASEB J.**, 2000, 14(11): 1603-1610.

JACOBS, S.C.; STEPHENSEN, J.R.; WILKINSON, G.W. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: Protection elicited in a murine model. **J Virol**, 1992; 66(4): 2086-2095.

JAN, L.R.; YANG, C.S.; TRENT, D.W.; FALGOUT, B.; LAI, C.J. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous protease. **J Gen Virol**, 1995; 76(pt. 3): 573-580.

JIANG, W.R.; LOWE, A.; HIGGS, S.; REID, S.; GOULD, E.A. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. **J. Gen. Virol.** 1993; 74: 931-935.

KAPOO, M.; ZHANG, L.; RAMACHANDRA, M.; KUSUKAWA, J.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J. Bio. Chem.**, 1995, 270: 19100-19106.

KERSCHNER, J.H.; VORNDAM, A.V.; MONATH, T.P.; TRENT, D.W. Genetic and epidemiological studies of dengue type 3 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. **J. Gen. Virol.** 1986; 67: 2645-2661.

KHROMYKH, A.A.; WESTAWAY, E.G. RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. **Arch Virol** 1996; 141(3-4): 685-699.

KIMURA, M. A single method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.**, 1998, 16: 111-120.

KOFLER, R.M.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.W. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. **J Virol**, 2002; 76(7): 3534-3543.

KOONIN, E.V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **J. Gen. Virol.**, 1993, 74(Pt.4): 733-740.

KOURI, G.; GUZMAN, M.G.; BRAVO, J.R. Why dengue hemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1987; 81(5): 821-3.

KOURI, G.; DE LOS REYES, J.; ACEVEDO, F. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Américas. **Bol. Oficina Sanit. Panam.** 1996; 121: 102-110.

KÛMMERER, B.M.; RICE, C.M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J Virol** 2002; 76(10): 4773-4784.

KUNISHIGE, M., MITSUI, T., LEONG, H.N.; TAKASAKI, T.; KURANE, J.; MIHARA, A.; MATSUMOTO, T. Preferential gray matter involvement in dengue myelitis. **Neurology**, 2004, 63(2): 1980.

KUO, M.D.; CHIN, C.; HSU, S.L.; SHIAO, J.Y.; WANG, T.M.; LIN, J.H. Characterization of the NTPase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. **J. Gen. Virol.**, 1996, 77(Pt.9): 2077-2084.

LANCIOTTI R. S., CALISHER C. H., GUBLER D. J., CHANG G., VORNDAM V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 1992; 30(3): 545-551.

LANCIOTTI, R.S.; LEWIS, J.G.; GUBLER, D.; TRENT, D.W. Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses. **J. Gen. Virol.**, 1994; 75: 65-75.

LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue – 4 viruses. **J Gen Virol**, 1997; 78: 2279-2284.

LEÃO, R.N.Q.; OIKAWA, T.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; YAMAKI, J.T., RODRIGUES S.G.; VASCONCELOS, H.B.; SOUSA, M.R.S.; TSUKIMATA, J.K.; AZEVEDO, R.S.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Isolation of dengue 2 virus from a patient with central nervous system involvement (transverse myelitis). **Rev Soc Bras Med Trop**, 2002; 35(4): 401-404.

LEE, J.M.; CROOKS, A.J.; STEPHENSON, J.R. The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. **J Gen Virol**, 1989; 70: 335-343.

LEITMEYER K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.G.; SALAS, R.; de CHACON, I.V.; RAMOS, C. AND RICO-HESS, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J Virol**, 1999; 73(6): 738-4747.

LEMMON, A.R. AND MILINKOVITCH, M.C. The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2002; 99: 10516-10521.

LEUNG, D.; SCHRODER, K.; WHITE, H.; FANG, N.X.; STOERMER, M.J.; ABBENANTE, G.; MARTIN, J.L.; YOUNG, P.R.; FAIRLIE. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small, peptide substrate, and inhibitors. **J Biol Chem** 2001; 276(49): 45762-45771.

LEWIS, J.A.; CHANG, G.J.; LANCIOTTI, R.S.; KINNEY, R.M.; MAYER, L.W.; TRENT, D.W. Phylogenetic relationships of dengue 2 viruses. **Virology** 1993; 197: 216-22,.

LI, H.; CLUM, S.; YOU, S.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. The serine protease and RNA – Estimated nucleoside triphosphatase and RNA helicase

functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **J Virol.**, 1999; 73(4): 3108-3116.

LIN YL, LIU CC, CHUANG JI, LEI HY, YEH TM, LIN YS, HUANG YH, LIU HS. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. **Virology**, 2000; 276(1): 114-26.

LIN, Y.L.; CHEN, L.K.; LIAO, C.L.; YEH, C.T.; MA, S.H.; CHEN, J.L.; HUANG, Y.L.; CHEN, S.S.; CHIANG, H.Y. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. **J Virol** 1998; 72(1): 191-200.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of Flavivirus. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.**, California, Academic Press; 2003. v. 59. p. 23-61.

LOBIGS, M.R.; USHA, A.; NESTOROWICZ, I.D.; MARSHALL, R.C.; WEIR, R.C.; DALGARNO L. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. **Virology** 1990; 176: 587-5

LOBIGS, M. Proteolytic processing of a Murray Valley encephalitis virus nonstructural polyprotein segment containing the viral proteinase: Accumulation of a NS3-4A precursor which requires mature NS3 for efficient processing. **J Gen Virol.**, 1992, 73(pt.9): 2305-12.

LOBIGS, M. Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion requires the function of the viral proteinase NS3. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90: 6218-6222.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; VAZEILLE, M.; FILIPPIS, A.M.B.; FAILLOUX, A.B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high

susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 2004, 98: 53-54.

LUM, L.C.S; LAM, S.K.; CHOY, Y.S.; GEORGE, R.; HARUN, F. Dengue encephalitis: a true entity?. *Am J Trop Med Hyg.*, 1996; 54:256-2590.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*, 1996; 220: 232-240.

MANDL, C.W.; HOLZMANN, H.; MEIXNER, T.; RAUSCHER, S.; STADLER, P.F.; ALLISON, S.L.; HEINZ, F.X. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: Construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. **J. Virol.**, 1998, 72(3): 2132-2140.

MANDL, C.W.; ALLISON, S.L.; HOLZMANN, H.; MEIXNER, T.; HEINZ, F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. **J Virol** 2000; 74(20): 9601-9609.

MANGADA, M.N. AND IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology** 1998; 244: 458-466.

MARKOFF, L. 5' – and 3' –noncoding regions in flavivirus RNA. **Adv Virus Res.**, 2003, 59: 177-228.

MARKOFF, L.; PANG, X.; HOUNG, H-S.; FALGOUT, B.; OLSEN, R.; JONES, E.; POLO, S. Derivation and characterization of a dengue type 1 host range-restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys. **J. Virol.**, 2002, 76(7): 3318-3328.

MARKOFF, L.; FALGOUT, B.; CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology** 1997; 233(1): 105-117.

MASON, P.W. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. **Virology**, 1989; 169(2): 354-364.

MESSER, W.B.; VITARANA, U.T.; SIVANANTHAN, K.; ELVTGALA, J.; PREETHIMALA, L.D.; RAMESH, R.; WITHANA, N.; GUBLER, D.J.; DE SILVA, A.M. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2002; 66: 765-773.

MESSER, W.B.; GUBLER, D.J.; HARRIS, E.; SIVANANTHAN, K.; DE SILVA, A.M. Emergence and global spread of a dengue serotypes 3, subtype III virus. **Emerg. Infect. Disease** 2003; 9(7): 800-809.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.R.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; MARCHEVSKY, R.S.; MESQUITA, R.P.; SCHATZMAYR, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical Neuropathology**; 1997, 16(4): 204-208.

MIAGOSTOVICH, M.P.; SEQUEIRA, P.C.; SANTOS, F.B.; MAIA, A.; NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR H.G.; HARRIS, E.; RILEY, L.W. Molecular typing of dengue virus type 2 in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 2003; 45(1):

MILLER, R.H.; RAFF, M.C.. Fibrous And Protoplasmic Astrocytes Are Biochemically And Developmentally Distinct. **J Neurosci.** 1984; 2:585-92

MODIS, Y; OGATA, S.; CLEMENTS, D; HARRISON, S.C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **J Virol.**, 2005; 79(2):1223-31.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**. 2004; 427 (6972): 313-9.

MORENS, D.M. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. **Clin, Inf. Dis.**, 1994; 19: 500-512.

MOROZOVA, O.V.; TSEKHANOSKAYA, N.A.; MAKSIKOVA, T.G.; BACHVALOVA, V.N.; MATNEEVA, V.A.; KIT, Y. Phosphorylation of tick-borne encephalitis virus NS5 protein. **Virus Res.**, 1997; 49(1): 9-15.

MOURA NETO, V.; MALLAT, M.; PROCHIANTZ A. Microheterogeneity of tubulin proteins in neuronal and glial cells from the mouse brain in culture. **EMBO J.**, 1983, 2:1243-1301.

MS/FUNASA/CENEPI. 2003. Relatório Técnico.

MS/SVS/2004. Relatório Técnico.

MS/SVS/2005. Relatório Técnico

MUYLAERT, I.R.; CHAMBERS, T.J.; GALLER, R.; RICE, C.M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. **Virology**, 1996; 222: 159-168.

MURPHY, F.A.. Togavirus: Morphology and Morphogenesis. **New York: Academic**. 1980, 41-316.

MURTIS, K.H.; GOORGA, R. Interaction of Frog virus 3 with the cytoskeleton. I. Altered organization of microtubules, intermediate filaments and microfilaments. **J. Cell Biol.**, 1983, 96: 1248-1257.

MUTEBI, J.P.; RIJUBRANDT, R.C.A; WANG, H.; RYMAN, K.; WANG, E.; FULOP, L.D.; FITBALL, R; BARRET, A.D.T. Genetic relationship and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the Flavivirus genus based on the 3' noncoding region. **J Virol.**, 2004, 78: 9652-9665.

NIMMANNITYA, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. **Southeast Asian J Trop Med Pub Health** 1987; 20: 325-30.

NICKELLS M.; CHAMBERS, T.J. Neuroadapted Yellow Fever Virus 17D: Determinants in the Envelope Protein Govern Neuroinvasiveness for SCID Mice. **J Virol**, 2003, 77(22): 12232–12242.

NOGUEIRA, R.M.R; FILIPPIS, A.M.B.; COELHO, J.M.O.; SEQUEIRA, P.C.; SCHATZMAYR, H.G.; PAIVA, F.G.; RAMOS, A.M.O.; MIAGOSTOVICH, M.P. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): A case report from Brazil. **Southeast Asian J Trop Med Pub Health.**, 2002; 33(1): 68-71.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; DE FILIPPIS, .A.M.; PEREIRA, M.A.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2001; 96: 925-926.

NOWAK, T.; WENGLER, G. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. **Virology** 198; 156(1): 127-137.

OSANAI C.H., TRAVASSOS DA ROSA A.P.A., TANG A.T. *et al.* Surto de dengue em Boa Vista, Roraima nota prévia. **Revista Inst. Med. Trop. São Paulo**, 1983, 25:53-4.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and Dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines.** Washington: PAHO, 1994.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and Dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines**. Washington: PAHO, 2000.

PANDEY, B.D. AND IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. **Microbiol. Immunol.** 2000; 44: 179-188.

PARTON, M.; DOWSETT, M.; SMITH, J. Studies of apoptosis in breast cancer. **BMJ**, 2001, 322: 1528-1532.

PATEY, O.; OLLIVAUD, L., BREULI, J.; LAFAIX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am J Trop Med Hyg.**, 1993, 48(6):793-802.

PIRES NETO RJ, LIMA DM, DE PAULA SO, LIMA CM, ROCCO IM, FONSECA BA. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Braz J Med Bioi Res.** 2005; 38(6): 843-52. Epub 2005 Jun 1.

PLETNEV, A.G.; BRAY, M.; LAI, C-J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type a viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. **J. Virol.** 1993; 67: 4956-4963.

PINHEIRO, F.P.; CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the America. **World Health Stat. O.**, 1997; 50: 161-169.

POST, P.R.; CARVALHO, R.; GALLER, R. Glycosilation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. **Virus Res** 1991; 18(2-3): 291-302.

POST, P.R.; SANTOS, C.N.D.; CARAVALHO, R.; CRUZ, A.C.R.; RICE, C.M.; GALLER, R. Heterogeneity in envelope protein sequence and N-linked glycosylation among yellow fever virus vaccine strains. **Virology**, 1992, 188(1): 160-7.

PREUGSCHAT, F.; YAO, C.-W.; STRAUSS, J.H. In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B and NS3. **J Virol**, 1990; 64: 4364-4374.

PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J.H. Processing of nonstructural protein NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. **Virology**, 1991, 185: 689-697.

PRIKHOD'KO GG, PRIKHOD'KO EA, PLETNEV AG, COHEN JI. Langat flavivirus protease NS3 binds caspase-8 and induces apoptosis. **J Virol**. 2002 ;76(11):5701-10.

PRIKHOD'KO, G.G.; PROKHOD'KO, E.A.; COHEN, J.L.; PLETNEV, A.G. Infection with Langat flavivirus or expression of the envelope protein induces apoptotic cells death. **Virology**, 2001; 286:328-335.

PROUTSKI V, GAUNT MW, GOULD EA, HOLMES EC. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. **J Gen Virol**. 1997; 78 (pt.7): 1543-9.

PRYOR, M.J.; WRIGHT, P.J. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specific by dengue virus. **Virology** 1993; 194(2): 769-780.

PUGACHEV, K.V.; NOMOKONOVA, N.Y.; DOBRINOVA, E.Y.; WOLF, Y.I. Site-directed mutagenesis of the tick-borne encephalitis virus NS3 gene reveals the putative serine protease domain of the NS3 protein. **FEBS Lett.**, 1993, 328(1-2): 115-118.

QU, X.; CHEN, W.; MAGUIRE, T.; AUSTIN, F. Immunoreactivity and protective effects in mice of a recombinant dengue 2 Tongva virus NS1 protein produced in a baculovirus expression system. **J Gen Virol** 1993; 74(pt. 1): p. 89-97.

RAFF M.C., ABNEY E.R., COHEN J., LINDSAY R., NOBLE M.. Two Types Of Astrocytes In Cultures Of Developing Rat White Matter: Differences In

Morphology, Surface Gangliosides, And Growth Characteristics. **J Neurosci.** 1983; **6**:1289-1300.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, R.H.; BAQUERA, J.; HERNANDEZ, D.; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSAS, E. Dengue virus in the brain of a fatal case hemorrhagic dengue fever. **J of Neurovirology**, 1998; 4: 465-468.

RAUSCHER, S.; FLAMM, C.; MANDL, C.W.; HEINZ, F.X.; STADLER, P.F. Secondary structure of the 3'-noncoding region of flavivirus genomes: Comparative analysis of base pairing probabilities. **RNA**1997; 3(7): 779-791.

REED, K.E.; GORBALENYA, A.E.; RICE, C.M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. **J Virol**, 1998, 72: 6199-6206.

REHLE TM. Classification, distribution and importance of arboviruses. **Trop Med Parasitol.** 1989; 40(4):391-5.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**1995; 375(6529): 291-298.

REPIK, P.M.; DALRYMPLE, J.M.; BRANDT, W.E.; McCOWN, J.M.; RUSSEL, P.K. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. **Am. Trop. Med. Hyg.** 1983; 32: 577-589.

RODHAIN F. Problems posed by the spread of *Aedes albopictus*. **Bull Soc Pathol Exot.** 1996; 89(2):137-40.

RODHAIN F. The idea of natural reservoir in arbovirology. **Bull Soc Pathol Exot.** 1998;91(4):279-82.

ROW, D.; WEISTEIRN, P.; MURRAY-SMITH, S. Dengue fever with encephalopathy in Australia. *Am J Trop Med Hyg.*, 1996, 54: 253-255.

RICE, C.M.; LENCHES, E.M.; EDDY, S.R.; SHIN, S.J.; SHEETS, R.L.; STRAUSS, J.H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science** 1985; 229: 726-733.

RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology** 1990; 174: 479-493.

RICO-HESSE R., HARRISON L.M., SALAS R.A., TOVAR D., NISALAK A., RAMOS C., BOSHELL J., MESA M.T.R., NOGUEIRA R. M. R. AND TRAVASSOS DA ROSA A. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology** 1997; 230: 224-251.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; NISALAK, A.; VAUGHN, D.W.; KALAYANAROG, S.; GREEN, S.; ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. **Am J Trop Med Hyg.**, 1998; 58: 96-101.

RICO-HESSE , R. Microevolution and virulence of dengue virus. In: Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.) **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.**, California, Academic Press 2003, v. 59. p. 316-341.

ROCCO, J.M.; KAUAKAMA, B.B.; SANTOS, C.L. First isolation of dengue 3 in the Brazil from an imported case. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 2001; 43: 55-57.

ROTHMAN, A.L.. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The J of Clinical Investigation** 2004; 113(7): 946-951.

ROTHMAN AL, ENNIS FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**. 1999; 257(1):1-6.

RUSSEL, P.K. AND McCOWN, J.M. Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue 3. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1972; 21: 97-99.

SANCHEZ, I.J.; RUIZ, R.H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. **J. Gen. Virol.** 1996; 77: 2541-2545.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.L. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1977, **74**:5463-5467.

SANTOS, C.L.S.; SALLUM, M.A.M.; FOSTER, P.G.; ROCCO, I.M. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** May-June 2004; 46(3):145-152.

SIQUEIRA JB JR, MARTELLI CM, COELHO GE, SIMPLICIO AC, HATCH DL. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis.** 2005 Jan; 11(1): 48-53.

SCHLESINGER, R.W. The Togaviridae: Biology, structure, replication. New York. Academic. Ed. 1980.

SCHLESINGER, J.J.; FOLTZER, M.; CHAPMAN, S. The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. **Virology** 1993; 192(1): 132-141.

SHI, P.Y.; LI, W.; BRINTON, M.A. Cell proteins bind specifically to West Nile virus minus-strand 3' stem-loop RNA. **J Virol** 1996; 70(9): 6278-6287.

SHURTLEFF, A.C.; BEASLEY, D.W.; CHEN, J.J.; NI, H.; SUDERMAN, M.T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S.C.; WATTS, D.M.; RUSSEL, K.L.,

BARRET, A.D. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. **Virology** 2001; 281: 75-87.

SMITH, T.J.; BRANDT, W.E.; SWASON, J.L.; McCOWN, J.M.; BUESCHER, E.L. Physical and biological properties of dengue 2 virus and associated antigens. **J Virol** 1970; 5: 524-532.

SOLOMON, T.; DINIZ, N.M.; VAUGH, D.W. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, 2000; 355: 1053-1059.

STADLER, K.; ALLISON, S.L.; SCHALICH, J.; HEINZ, F.X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **J Virol** 1997; 71: 8475-8481.

STANISLAWSKI, L.; MONGIAT, F.; MOURA-NETO, V. Presence of actin in Oncornaviruses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1984, 118: 580-586.

STIASNY, K.; ALLISON, S.L.; MARCHLER-BAUER, A.; KUNZ, C.; HEINZ, F.X. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. **J. Virol.**, 1996: 8142-8147.

SUMARMO, H.W.; WUHUR, H.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SINTOMOMGGOTO, T.S.; SAROSO, J.S. Encephalopathy associated with dengue infection. **Lancet**, 1978, 1: 449-450.

SUMIYOSHI, H.; MORI, C.; FUKU, I.; MORITA, K.; KUHARA, S.; KONDOU, J.; KIKUCHI, Y.; NAGAMATU, H.; IGARASHI, A. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. **Virology** 1987; 161(2): 497-510.

SUMIYOSHI, H.; TIGNOR, G.H.; SHOPE, R. Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecularly cloned cDNA. **J. Infect. Dis.** 1995; 171:1144-1151.

TAKEGAMI, T.; SAKAMURO, D.; FURUKAWA, T. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. **Virus Genes**, 1995, 9(2):105-112.

TAN, B.H.; FU, J.; SUGRUE, R.J.; YAP, E.H.; CHAN, Y.C.; TAN, Y.H. Recombinant dengue type1 NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, 1996, 216(2): 317-325.

THEILER, M.; DOWNS, W.G. The arthropod-borne viruses of vertebrate. **Yale University Press**, New Haven, CT, 1973.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C. Dengue infections with unusual manifestations. **J Med Assoc Thai.**, 1994; 77: 410-413.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., ROCHA, J.M., SILVA, O.V., LINS, Z.C. Surto de dengue em Boa Vista, território de Roraima, Brasil. **Bol Epidemiol (MS)**, 1982, 14:93-104,

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., SHOPE, R.E., PINHEIRO, F.P. *et al.* **Arbovirus Research in the Brazilian Amazon.** In: Uren, MF, Blok J and Manderson LH, eds. Proceedings Fifth Symposium on Arbovirus Research in Australia, 4-8, 1989.

TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G. Dengue. In: LEÃO, R.N.Q. *et al.* (Eds.) **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico.** Belém: CEJUP Press, 1997. p. 227-241.

TRENT, D.W. Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. **J Virol** 1977; 22(3): 608-618.

TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, M.C.; KLIKS, S.; MONATH, T.P. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. **Appl. Virol. Res.** 1990; 2: 293-315.

USUKU, S.; CASTILLO, L.; SUGIMOTO, C.; NOGUCHI, Y.; YOGO, Y.; KOBAYASHI, N. Phylogenetic analysis of dengue 3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. **Arch. Virol.** 2001; 146: 1381-1390.

UZCATEGUI, N.Y.; CAMACHO, D.; COMACH, G.; CUELLO DE UZCATEGUI, R.; HOLMES, E.C.; GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: Evidence for in situ virus evolution and recombination. **J. Gen. Virol.** 2001; 82: 2845-2953.

UZCATEGUI, N.Y.; COMACH, G.; CAMACHO, D.; SALCEDO M.; CABELLO DE QUINTANA, M.; JIMENEZ, M.; SIERRA, G.; CUELLO DE UZCATEGUI, R.; JAMES, W.S.; TURNER, S.; HOLMES, E.C.; GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **J. Gen. Virol.** 2003; 84:1569-1575.

USUKU, S.; CASTILLO, L.; SUGIMOTO, C.; NOGUCHI, Y.; YOGO, Y.; KOBAYASHI, N. Phylogenetic analysis of dengue 3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. **Arch. Virol.** 2001, 146: 1381-1390.

VALLE, R.P.C; FALGOUT B. Mutagenesis of the NS3 Protease of Dengue Virus Type 2. **J Virol**, 1998; 72(1): 624–632.

VARMA, M.G.R.; WEBB, H.E (1985). Arboviruses. In: Holland, W.W., Detels, R.; Knox, G.; Breeze, E., (eds.): **Oxford textbook of public health**, Vol.3, Investigative Methods in Public health. Oxford, New York, Toronto:Oxford University Press : 262-283.

VASCONCELOS, P.F.C.; MENEZES, D.B.; MELO, L.P; PAULA PESSOA, E.T.F.; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TIMBÓ, M.J.; COELHO, I.C.B.; MONTENEGRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S.; ANDRADE, F.M.O.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A. A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceara state, Brazil, **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 1995, 43: 11-17.

VASCONCELOS PF, DA ROSA AP, COELHO IC, MENEZES DB, DA ROSA ES, RODRIGUES SG, DA ROSA JF. Involvement of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza Ceara, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1998 ;40(1):35-9.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler D.J.; Kuno, G., eds. **Dengue and dengue haemorrhagic fever**. New York: CAB International, 1997: 313-33.

WENGLER, G.; CASTLE, E. Analysis of structural properties which possibly are characteristics for the 3'-terminal sequences of the genome RNA of flaviviruses. **J Gen Virol** 1986; 67: 1183-1188.

WENGLER, G.; WENGLER, G. Cell-Associated West Nile Flavivirus Is Covered with E+Pre-M Protein Heterodimers Which Are Destroyed and Reorganized by Proteolytic Cleavage during Virus Release. **J Virol**, 1989; 63(6), p. 2521-2526

WENGLER G, WENGLER G. The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. **Virology**, 1991 ;184(2):707-15.

WENGLER, G.; CZAYA, G.; FARBER, P.M.; HEGEMANN, J.H. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. **J. Gen. Virol.**, 1991, 72(4): 851-858.

WENGLER G, WENGLER G. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. **Virology**. 1993, 197(1):265-73.

WESTAWAY, E.G.; MACKENZIE, J.M.; KENNEY, M.T.; JONES, M.K.; KHROMYKH, A.A. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: Colocalization of

NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **J. Virol.**, 1997, 71(9): 6650-6661.

World health organization (WHO)- **Dengue hemorrhagic fever: Diagnosis, Treatment, Control.** Geneva, 1986.

WHO- **Scientific Group. Arthrop-borne and rodent-borne viral disease.** Technical Report Serien, N.º 719. Word Health Organization, Geneva, 1985

WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control.** Geneva, 1997.

WINKLER, G.; MAXWELL, S.E.; RUEMMLER, C.; STOLLAR, V. Newly synthesized dengue 2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. **Virology** 1989; 171(1): 302-305.

WINKLER, G.; RANDOLPH, V.B.; CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E.; STOLLAR, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology** 1988; 162(1): 187-196.

WINKLER, G.; HEINZ, F.X.; KUNZ, C. Studies on the glycosilation of flavivirus E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure. **Virology** 1987; 159(2): 237-243.

YAMSHCHIKOV, V.F.; COMPANS, R.W. Processing of the intracellular form of the West Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: An in vitro study. **J Virol** 1994; 69(9): 5765-5771.

YOU, S.; FALGOUT, B.; MARKOFF, L.; PADMANABHAN, R. In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5' – and 3' –terminal regions that influence RNA structure. **J. Biol. Chem.**, 2001, 276(19): 15581- 15591.

YUSOF, R.; CLUM, S.; WETZEL, M.; MURTHY, H.M., PADMANABHAN, R. Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrate with dibasic amino acids in vitro. **J Biol Chem** 2000; 275(14): 9963-9969.

ZAGNE, S.M.O.; ALVES, V.G.F; NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; LAMPE, E.; TAVARES, W. Dengue hemorrhagic fever in the state in Rio de Janeiro, Brazil: a study of 56 confirmed cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1994; 88: 677-79.

ZANNOTO, P.M.; GOULD, E.A.; GAO, G.F.; HARVEY, P.H.; HOLMES, E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1996; 93: 548-553.

ZHAO, B.; MACKOW, E.; BUCKLER-WHITE, A.; MARKOFF, L.; CHANNOCK, R.M.; LAI, C.-J; MAKINO, Y. Cloning full length dengue 4 viral DNA sequence: Analysis of genes coding for structural proteins. **Virology** 1986; 155: 77-88.

APÊNDICE 01

1.1 Símbolos e siglas dos aminoácidos

Letra	Sigla	2 Nomes dos aminoácidos	3 Caráter
A	Ala	alanina	Não polar
C	Cis	cisteína	Não polar
D	Asp	ácido aspártico	Ácido
E	Glu	ácido glutâmico	Ácido
F	Fen	fenilalanina	Não polar
G	Gli	glicina	Não polar
H	His	histidina	Básico
I	Ile	isoleucina	Não polar
K	Lis	lisina	Básico
L	Leu	leucina	Não polar
M	Met	metionina	Não polar
N	Asn	asparagina	Polar
P	Pro	prolina	Não polar
Q	Gln	glutamina	Polar
R	Arg	arginina	Básico
S	Ser	serina	Polar
T	Tre	treonina	Polar
V	Val	valina	Não polar
W	Trp	triptofano	Não polar
Y	Tir	tirosina	Polar

O código genético padrão

Primeira base	3.1.1 Segunda base								Terceira base
	U		C		A		G		
U	UUU	Fen	UCU	Ser	UAU	Tir	UGU	Cis	U
	UUC	Fen	UCC	Ser	UAC	Tir	UGC	Cis	
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Terminação	UGA	Terminação	
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Terminação	UGC	Trp	
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
A	AUU	Ile	ACU	Tre	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC	Ile	ACC	Tre	AAC	Asn	AGC	Ser	
	AUA	Ile	ACA	Tre	AAA	Lis	AGA	Arg	
	AUG*	Met	ACG	Tre	AAG	Lis	AGG	Arg	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gli	U
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gli	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gli	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gli	

* AUG também é sinal de iniciação da tradução e codon da metionina interna.

APÊNDICE 02

Alinhamento nucleotídico das seqüências de VDEN2 que geraram as árvores filogenéticas.

	Capsideo										prM															
	ATT	ATG	TTG	ATT	CCA	ACA	GCG	ATG	GCG	TTC	CAT	TTA	ACC	ACA	CGT	AAT	GGA	GAA	CCA	CAC	ATG	ATC	GTT	GGT	AGG	CAA
M20558-Jamaica-1983																										
44-2_-_Brasil_-_1990							A																			
bel61082-Brasil-2001							A																			
bel63650-Brasil-2002							A																			
cea2440-BR-1994							A																G	G		
cea2462-BR-1994							A																GG	GG		
cea2463-BR-1994				C			A																GG	GG		
GOI4191-BR-2002			C				A																GG			
MIG1269-Brasil-1995							A																			
RGN53-BR-1994							A																GG	GG		
ROR1811-BR-1996			C				A																C			
ror1812-BR-1996			C				T								C								C	A	A	
toc2016-BRASIL-1991			CA				A																			A
AF100466_-_Venezuela			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
M32941-Nova_Guine_C-1944			C				T								C								C	A	A	
af100464-Tailandia-1996			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
AF100459_-Tailandia-1994			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
AF100460_-Tailandia-1994			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
AF100461_-Tailandia-1995			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
af100462-Tailandia-1995			C				T					C			C								C	A	A	
af100463-Tailandia-1996			C				TA					C.G			C	C					T		C	A	TA	
AF100469_-Mexico-1992		C	C				T			T		C.G			C	C							C	A	A	
af100467-Peru-1995		C	C				T			T		C.G			C	C							C	A	A	
af100468-Peru-1996		C	C				T			T		C.G			C	C							C	A	A	
L04561_-Mexico_-_1983		C	C				T		C	T		C.G			C	C							C	AT	A	G
D00345_-Tailandia_-_1980			C				TA					C			C								C	A	A	
U3195_1_-_Tailandia_-_1993			C				T			T		C			C								C	A	TT	

	GAG	AAA	GGG	AAA	AGT	CTT	CTG	TTC	AAA	ACA	GAG	GAT	GGT	GTT	AAC	ATG	TGT	ACC	CTC	ATG	GCC	ATA	GAT	CTT	GGT	GAA	
M20558-Jamaica-1983																											
44-2_-_Brasil_-_1990								T			A				C									C			
bel61082-Brasil-2001								T																C			
bel63650-Brasil-2002								T																C			
cea2440-BR-1994														C										C			
cea2462-BR-1994																								C			
cea2463-BR-1994																								C			
GOI4191-BR-2002								T																C			
MIG1269-Brasil-1995								T																C			
RGN53-BR-1994																								C			

M20558-Jamaica-1983	TCT	ACG	TCC	ACA	TGG	GTA	ACT	TAT	GGG	ACA	TGT	GCC	ACC	ACA	GGA	GAA	CAC	AGA	AGA	GAA	AAA	AGA	TCA	GTG	GCA	CTC
44-2_-_Brasil_-_1990	..C	A..
bel61082-Brasil-2001	A..
bel63650-Brasil-2002	A..
cea2440-BR-1994	A..
cea2462-BR-1994	A..
cea2463-BR-1994	A..
GOI4191-BR-2002	A..
MIG1269-Brasil-1995	A..
RGN53-BR-1994	A..
ROR1811-BR-1996	A..G	...
ror1812-BR-1996G	A..
toc2016-BRASIL-1991	A..
AF100466_-_Venezuela	A..G	...
M32941-Nova_Guine_C-1944G	A..
af100464-Tailandia-1996	..CGCT	A..GT
AF100459_-_Tailandia-1994	..CGCT	A..GT
AF100460_-_Tailandia-1994	..CGCT	A..GT
AF100461_-_Tailandia-1995	..CGCT	A..GT
af100462-Tailandia-1995	..CGCT	A..GTT	...
af100463-Tailandia-1996	..CGCT	A..GT
AF100469_-_Mexico-1992	..CC	..A	A..GG	..T	...
af100467-Peru-1995	..CC	A..GG	..T	...
af100468-Peru-1996	..CC	A..GG	..T	...
L04561_-_Mexico_-_1983	..C	A..GGT	...
D00345_-_Tailandia_-_1980	..CGCT	A..GT
U3195_1_-_Tailandia_-_1993	..CGCT	A..GT

M20558-Jamaica-1983	GTT	CCA	CAT	GTG	GGT	ATG	GGA	CTG	GAG	ACA	CGA	ACT	GAA	ACA	TGG	ATG	TCA	TCA	GAA	GGG	GCC	TGG	AAA	CAT	GTT	CAG
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994	C..
ROR1811-BR-1996

Continua


```

ror1812-BR-1996      . . . . .
toc2016-BRASIL-1991  . . . . .A . . . . .
AF100466_-Venezuela . . . . .
M32941-Nova_Guine_C-1944 . . . . .A . . . . .
af100464-Tailandia-1996 . . . . .A . . . . .A .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
AF100459_-Tailandia-1994 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
AF100460_-Tailandia-1994 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
AF100461_-Tailandia-1995 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
af100462-Tailandia-1995 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
af100463-Tailandia-1996 . . . . .A . . . . .A .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
AF100469_-Mexico-1992 . . . . .C . . . . .A . . . . .T . . . . .A . . . . .C . . . . .CC . . . . .
af100467-Peru-1995 . . . . .C . . . . .A . . . . .T . . . . .C . . . . .CC . . . . .
af100468-Peru-1996 . . . . .C . . . . .A . . . . .T . . . . .C . . . . .CC . . . . .
L04561_-Mexico_-1983 . . . . .C . . . . .A . . . . .T . . . . .C . . . . .CC . . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 . . . . .A . . . . .G . . . . .C . . . . .T . . . . .CC . . . . .

```

```

M20558-Jamaica-1983      AGA ATT GAA ACC TGG ATC TTG AGA CAT CCA GGC TTT ACC ATA ATG GCA GCA ATC CTG GCA TAC ACC ATA GGA ACG ACA
44-2_-Brasil_-1990      . . . . .G . . . . .
bel61082-Brasil-2001 . . . . .G . . . . .
bel63650-Brasil-2002 . . . . .G . . . . .
cea2440-BR-1994 . . . . .G . . . . .
cea2462-BR-1994 . . . . .G . . . . .
cea2463-BR-1994 . . . . .G . . . . .
GOI4191-BR-2002 . . . . .G . . . . .
MIG1269-Brasil-1995 . . . . .G . . . . .
RGN53-BR-1994 . . . . .G . . . . .
ROR1811-BR-1996 . . . . .G . . . . .
ror1812-BR-1996 . . . . .G . . . . .
toc2016-BRASIL-1991 . . . . .G . . . . .
AF100466_-Venezuela . . . . .G . . . . .
M32941-Nova_Guine_C-1944 . . . . .T . . . . .
af100464-Tailandia-1996 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
AF100459_-Tailandia-1994 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
AF100460_-Tailandia-1994 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
AF100461_-Tailandia-1995 . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .G . . . . .
af100462-Tailandia-1995 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
af100463-Tailandia-1996 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
AF100469_-Mexico-1992 . . . . .T . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .
af100467-Peru-1995 . . . . .T . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .G . . . . .
af100468-Peru-1996 . . . . .T . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .G . . . . .
L04561_-Mexico_-1983 . . . . .T . . . . .T . . . . .C . . . . .T . . . . .G . . . . .G . . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 . . . . .TT . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .G . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 . . . . .T . . . . .C . . . . .C . . . . .G . . . . .G . . . . .

```

Env

M20558-Jamaica-1983	CAT	TTC	CAA	AGG	GCC	TTG	ATT	TTC	ATC	TTA	CTG	ACA	GCT	GTC	GCT	CCT	TCA	ATG	ACA	ATG	CGT	TGC	ATA	GGA	ATA	TCA
44-2_-_Brasil_-_1990A
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002G
cea2440-BR-1994T
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996TG
ror1812-BR-1996T
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944AC
af100464-Tailandia-1996G	..ACG
AF100459_-_Tailandia-1994G	..ACG
AF100460_-_Tailandia-1994G	..ACG
AF100461_-_Tailandia-1995G	..ACC
af100462-Tailandia-1995G	..ACC
af100463-Tailandia-1996G	..ACG
AF100469_-_Mexico-1992A	..T	..C	..ACC	..AC
af100467-Peru-1995A	..T	..C	..ACC	..AC
af100468-Peru-1996A	..T	..C	..ACC	..AC
L04561_-_Mexico_-_1983A	..T	..C	..ACC	..AC
D00345_-_Tailandia_-_1980G	..A	..A	..C
U3195_1_-_Tailandia_-_1993G	..ACC

M20558-Jamaica-1983	AAT	AGA	GAC	TTT	GTA	GAA	GGG	GTT	TCA	GGA	GGA	AGC	TGG	GTT	GAC	ATA	GTC	TTA	GAA	CAT	GGA	AGT	TGT	GTG	ACG	ACG
44-2_-_Brasil_-_1990C
bel61082-Brasil-2001C
bel63650-Brasil-2002C
cea2440-BR-1994C
cea2462-BR-1994C
cea2463-BR-1994C
GOI4191-BR-2002C
MIG1269-Brasil-1995C
RGN53-BR-1994C
ROR1811-BR-1996CG

M20558-Jamaica-1983	TGT	ATA	GAA	GCA	AAG	CTG	ACC	AAT	ACA	ACA	ACA	GAA	TCT	CGT	TGC	CCA	ACA	CAA	GGG	GAA	CCC	AGT	CTA	AAT	GAA	GAG
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944GCTCACC
af100464-Tailandia-1996	..CACCA
AF100459_-_Tailandia-1994	..CACCA
AF100460_-_Tailandia-1994	..CACCA
AF100461_-_Tailandia-1995	..CACCA
af100462-Tailandia-1995	..CACCA
af100463-Tailandia-1996	..CACCA
AF100469_-_Mexico-1992G	..T	..AC	..GC	..G	..CCC	..G
af100467-Peru-1995G	..C	..AC	..GC	..GCC	..G
af100468-Peru-1996G	..C	..AC	..GC	..GCC	..G
L04561_-_Mexico_-_1983G	..T	..AC	..GC	..G	..CCC	..G
D00345_-_Tailandia_-_1980GACC
U3195_1_-_Tailandia_-_1993	..CACCA

M20558-Jamaica-1983	CAG	GAC	AAA	AGG	TTC	CTC	TGC	AAA	CAC	TCC	ATG	GTA	GAC	AGA	GGA	TGG	GGA	AAT	GGA	TGT	GGA	TTA	TTT	GGA	AAG	GGA	
44-2_-_Brasil_-_1990AA
bel61082-Brasil-2001AA
bel63650-Brasil-2002AA
cea2440-BR-1994AA
cea2462-BR-1994AA
cea2463-BR-1994AA
GOI4191-BR-2002AA
MIG1269-Brasil-1995AA
RGN53-BR-1994AA
ROR1811-BR-1996AA

Continua

M20558-Jamaica-1983	ACC	ATC	GTG	ATA	ACA	CCT	CAC	TCA	GGA	GAA	GAG	CAC	GCT	GTA	GGT	AAT	GAC	ACA	GGA	AAA	CAT	GGC	AAG	GAA	ATC	AAA
44-2_-_Brasil_-_1990	G..
bel61082-Brasil-2001	G..
bel63650-Brasil-2002	G..
cea2440-BR-1994	G..
cea2462-BR-1994	G..
cea2463-BR-1994	G..
GOI4191-BR-2002C	G..
MIG1269-Brasil-1995	G..
RGN53-BR-1994	G..
ROR1811-BR-1996C	G..
ror1812-BR-1996C	G..
toc2016-BRASIL-1991TC
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944TGT	..A	..C	..A
af100464-Tailandia-1996T	...	G..GT	..G	..C	..A
AF100459_-_Tailandia-1994T	..A	G..GT	..G	..C	..A
AF100460_-_Tailandia-1994T	..A	G..GT	..G	..C	..A
AF100461_-_Tailandia-1995T	...	G..GT	..G	..C	..A
af100462-Tailandia-1995T	...	G..GT	..G	..C	..A
af100463-Tailandia-1996T	...	G..GT	..G	..C	..A
AF100469_-_Mexico-1992	..T	G..TGA	..T	..A	..C	..AT	..A	...	G..	..G	
af100467-Peru-1995	..T	G..GA	..T	..A	..C	..AT	..A	...	G..	..G	
af100468-Peru-1996	..T	G..GA	..T	..A	..C	..AT	..A	...	G..	..G	
L04561_-_Mexico_-_1983GA	..T	..A	..C	..A	..TT	..A	...	G..	..G	
D00345_-_Tailandia_-_1980T	...	G..CGT	..G	..C	..A
U3195_1_-_Tailandia_-_1993T	...	G..GT	..G	..C	..A

M20558-Jamaica-1983	ATA	ACA	CCA	CAG	AGT	TCC	ATC	ACA	GAA	GCA	GAA	CTG	ACA	GGC	TAT	GGC	ACT	GTC	ACG	ATG	GAG	TGC	TCT	CCG	AGA	ACG
44-2_-_Brasil_-_1990G
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002	G..
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996

Continua

```

ror1812-BR-1996      . . . . .
toc2016-BRASIL-1991 . . . . .
AF100466_-Venezuela . . . . .
M32941-Nova_Guine_C-1944 . . . . .G T. . . . .
af100464-Tailandia-1996 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
AF100459_-Tailandia-1994 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
AF100460_-Tailandia-1994 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
AF100461_-Tailandia-1995 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
af100462-Tailandia-1995 G. . . . .C . . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
af100463-Tailandia-1996 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . .A
AF100469_-Mexico-1992 . . . . .C . . . . .G .G . . . . .T . . . . .A . . . . .
af100467-Peru-1995 . . . . .C . . . . .G .G . . . . .A . . . . .A . . . . .
af100468-Peru-1996 . . . . .C . . . . .G .G . . . . .A . . . . .A . . . . .
L04561_-Mexico_-1983 . . . . .C . . . . .C .G . . . . .T . . . . .A . . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 G. . . . .T. . . . .T . . . . . . . . . . .A . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 G. . . . .T. . . . .T . . . . .C . . . . . . . . . . .A

```

```

M20558-Jamaica-1983      GGC CTC GAC TTC AAT GAG ATG GTG CTG CTG CAG ATG GAA GAC AAA GCT TGG CTG GTG CAC AGG CAA TGG TTC CTA GAC
44-2_-Brasil_-1990      . . . . .
bel61082-Brasil-2001 . . . . .A . . . . .G . . . . .
bel63650-Brasil-2002 . . . . .A . . . . .G . . . . .
cea2440-BR-1994 . . . . .A . . . . .G . . . . .
cea2462-BR-1994 . . . . . . . . . .G . . . . .
cea2463-BR-1994 . . . . .A . . . . .G . . . . .A. . . . .
GOI4191-BR-2002 . . . . .A . . . . .G . . . . .
MIG1269-Brasil-1995 . . . . .A . . . . .G . . . . .
RGN53-BR-1994 . . . . .A . . . . .G . . . . .
ROR1811-BR-1996 . . . . .C . . . . .T. . . . .A . . . . .A.T . . . . .
ror1812-BR-1996 . . . . .C . . . . .T. . . . .A . . . . .A.T . . . . .
toc2016-BRASIL-1991 . . . . .A . . . . .T. . . . .G . . . . .
AF100466_-Venezuela . . . . . . . . . .G . . . . .C . . . . .T
M32941-Nova_Guine_C-1944 . . . . .T. . . . .A . . . . .A.T . . . . .
af100464-Tailandia-1996 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .
AF100459_-Tailandia-1994 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .
AF100460_-Tailandia-1994 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .
AF100461_-Tailandia-1995 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T. . . . .T . . . . .
af100462-Tailandia-1995 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .
af100463-Tailandia-1996 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .
AF100469_-Mexico-1992 . . . . .T. . . . .A . . . . . . . . . .A . . . . .
af100467-Peru-1995 . . . . .T. . . . .A . . . . . . . . . .A . . . . .
af100468-Peru-1996 . . . . .T. . . . .A . . . . . . . . . .A . . . . .
L04561_-Mexico_-1983 . . . . .T. . . . .A . . . . .A.T . . . . .A . . . . .A . . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .A . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 . . . . .T. . . . .A.T . . . . .T . . . . .T . . . . .

```

Continua

M20558-Jamaica-1983	CTG	CCG	TTA	CCA	TGG	CTA	CCC	GGA	GCG	GAC	ACA	CAA	GGA	TCA	AAT	TGG	ATA	CAG	AAA	GAG	ACA	TTG	GTC	ACT	TTC	AAA
44-2_-_Brasil_-_1990	G..
bel61082-Brasil-2001A
bel63650-Brasil-2002A
cea2440-BR-1994A
cea2462-BR-1994A
cea2463-BR-1994A
GOI4191-BR-2002A
MIG1269-Brasil-1995A
RGN53-BR-1994A
ROR1811-BR-1996GG
ror1812-BR-1996GG
toc2016-BRASIL-1991A
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944GGG
af100464-Tailandia-1996AGTGAC
AF100459_-Tailandia-1994AGTGAC
AF100460_-Tailandia-1994AGTGAC
AF100461_-Tailandia-1995AGTGACG	...
af100462-Tailandia-1995AGTGAC
af100463-Tailandia-1996AGTGAC
AF100469_-Mexico-1992	..AGGAC
af100467-Peru-1995	..AGGC
af100468-Peru-1996	..AGGC
L04561_-_Mexico_-_1983	..AGGA	AG.	..GCC
D00345_-_Tailandia_-_1980GGAAC
U3195_1_-_Tailandia_-_1993AGTGAAC

M20558-Jamaica-1983	AAT	CCC	CAC	GCG	AAG	AAA	CAA	GAT	GTC	GTT	GTT	TTA	GGA	TCT	CAA	GAA	GGG	GCC	ATG	CAC	ACG	GCA	CTC	ACA	GGG	GCC
44-2_-_Brasil_-_1990	..CG
bel61082-Brasil-2001G
bel63650-Brasil-2002G
cea2440-BR-1994G
cea2462-BR-1994G
cea2463-BR-1994G
GOI4191-BR-2002GTGCAA
MIG1269-Brasil-1995G
RGN53-BR-1994G
ROR1811-BR-1996TGTGCAT	T..AT	T..

Continua


```

ror1812-BR-1996      ... ..T ... ..G ... ..T ... ..G ... ..C ... ..A ... ..
toc2016-BRASIL-1991 ... ..G ... ..T ... ..G ... ..C ... ..A ... ..
AF100466_-Venezuela ... ..G ... ..T ... ..G ... ..C ... ..A ... ..
M32941-Nova_Guine_C-1944 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..G ... ..C ... ..A ... ..
af100464-Tailandia-1996 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
AF100459_-Tailandia-1994 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
AF100460_-Tailandia-1994 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
AF100461_-Tailandia-1995 ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
af100462-Tailandia-1995 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
af100463-Tailandia-1996 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..A ... ..A ...
AF100469_-Mexico-1992 ... ..T ... ..A ... ..G ... ..T ... ..C ... ..C ... ..A ... ..
af100467-Peru-1995 ... ..T ... ..A ... ..G ... ..T ... ..C C... ..C ... ..G ... ..T ..A ... ..
af100468-Peru-1996 ... ..T ... ..A ... ..G ... ..T ... ..C C... ..C ... ..G ... ..T ..A ... ..
L04561_-Mexico_-1983 ... ..G. ..T ... ..A ... ..G ... ..T ... ..C ... ..T ..C ... ..G ... ..A ... ..T ..A ... ..T
D00345_-Tailandia_-1980 ... ..T ..T ... ..G ... ..T ... ..C ... ..A ... ..
U3195_1_-Tailandia_-1993 ... ..T ... ..G ... ..T ... ..T ... ..C ... ..G ... ..A ... ..A ...

```

```

M20558-Jamaica-1983   ACA GAA ATC CAG ATG TCA TCA GGA AAC TTA CTG TTC ACA GGA CAT CTC AAG TGC AGG CTG AGA ATG GAC AAA CTA CAG
44-2_-Brasil_-1990   ... ..T ... ..
bel61082-Brasil-2001 ... ..T ... ..
bel63650-Brasil-2002 ... ..
cea2440-BR-1994       ... ..A... ..C ... ..G. ... ..
cea2462-BR-1994       ..T ... ..C ... ..
cea2463-BR-1994       ... ..G... ..
GOI4191-BR-2002       ... ..T... ..
MIG1269-Brasil-1995 ... ..
RGN53-BR-1994        ..T ... ..C ... ..
ROR1811-BR-1996       ... ..
ror1812-BR-1996       ... ..
toc2016-BRASIL-1991 ... ..
AF100466_-Venezuela ... ..
M32941-Nova_Guine_C-1944 ... ..G ... ..
af100464-Tailandia-1996 ..G ... ..A ... ..G ... ..C ... ..T ... ..G ... ..
AF100459_-Tailandia-1994 ... ..A ... ..G ... ..C ... ..T ... ..G ... ..
AF100460_-Tailandia-1994 ... ..A ... ..G ... ..C ... ..T ... ..G ... ..
AF100461_-Tailandia-1995 ... ..A ... ..G ... ..G ... ..C ... ..T ... ..T ..G ... ..
af100462-Tailandia-1995 ... ..A ... ..C ... ..T ... ..G ... ..
af100463-Tailandia-1996 ..G ... ..A ... ..G ... ..C ... ..T ... ..G ... ..
AF100469_-Mexico-1992 ..G ... ..A ... ..C.G ... ..A ... ..T ... ..A ... ..
af100467-Peru-1995   ..G ... ..A ... ..C.G ... ..A ... ..T ... ..A ... ..
af100468-Peru-1996   ..G ... ..A ... ..C.G ... ..A ... ..T ... ..A ... ..
L04561_-Mexico_-1983 ..G ... ..C.G ... ..T ... ..AG ... ..T ... ..A ... ..
D00345_-Tailandia_-1980 ... ..A ... ..C ... ..G ... ..
U3195_1_-Tailandia_-1993 ... ..G ... ..G ... ..C ... ..T ... ..G ... ..

```

Continua

M20558-Jamaica-1983	CTC	AAA	GGA	ATG	TCA	TAC	TCT	ATG	TGT	ACA	GGA	AAG	TTT	AAA	ATT	GTG	AAG	GAA	ATA	GCA	GAA	ACA	CAA	CAT	GGA	ACA
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002C
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002C	T..
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991C
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944C	G..
af100464-Tailandia-1996C	G..
AF100459_-_Tailandia-1994C	G..
AF100460_-_Tailandia-1994C	G..
AF100461_-_Tailandia-1995GCC	G..G	...
af100462-Tailandia-1995C	G..G	...
af100463-Tailandia-1996C	G..
AF100469_-_Mexico-1992	..TGCC
af100467-Peru-1995	..TGCCAG
af100468-Peru-1996	..TGCCAGG	...
L04561_-_Mexico_-_1983	..TGCC	G..A
D00345_-_Tailandia_-_1980C	G..
U3195_1_-_Tailandia_-_1993C	G..G	...

M20558-Jamaica-1983	ATA	GTT	ATC	AGA	GTA	CAA	TAT	GAA	GGG	GAC	GGC	TCT	CCA	TGT	AAG	ATC	CCT	TTT	GAG	ATA	ATG	GAT	TTG	GAA	AAA	AGA
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002T
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996

Continua

```

ror1812-BR-1996      . . . . .
toc2016-BRASIL-1991 . . . . .T . . . . .
AF100466_-Venezuela . . . . .
M32941-Nova_Guine_C-1944 . . . . .T . . . . .
af100464-Tailandia-1996 . . .C . . . .G . . . . .A G. . . . .
AF100459_-Tailandia-1994 . . . . .G . . . . .A G. . . . .
AF100460_-Tailandia-1994 . . . . .G . . . . .A G. . . . .
AF100461_-Tailandia-1995 . . .C .T . . . .G . . . .C . . . .A . . . . .
af100462-Tailandia-1995 . . . . .G . . . . .A . . . . .
af100463-Tailandia-1996 . . .C . . . .G . . . . .A G. . . . .
AF100469_-Mexico-1992 . . .C .T . . . .G .A . . . .C . . . .C . . . .C. . . . .
af100467-Peru-1995 . . .C .T . . . .A . . . .C . . . .C . . . .C.A . . . . .
af100468-Peru-1996 . . .C .T . . . .A . . . .C . . . .C . . . .C.A . . . . .
L04561_-Mexico_-1983 . . .C .T . . . .A . . . .C . . . .C . . . .C. . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 . . . . .G .G .G . . . . .A . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 . . . . .G . . . . .GA . . . . .

```

```

M20558-Jamaica-1983      CAC GTC TTA GGT CGC CTG ATT ACA GTT AAC CCG ATC GTA ACA GAA AAA GAT AGC CCA GTC AAC ATA GAA GCA GAA CCT
44-2_-Brasil_-1990      . . . . .A . . . . .
bel61082-Brasil-2001     . . . . .A . . . . .
bel63650-Brasil-2002     . . . . .A . . . . .
cea2440-BR-1994          . . . . .C . . . . .A . . . . .
cea2462-BR-1994          . . . . .A . . . . .
cea2463-BR-1994          . . . . .A . . . . .
GOI4191-BR-2002          . . . . .A . . . . .
MIG1269-Brasil-1995      . . . . .A . . . . .
RGN53-BR-1994            . . . . .A . . . . .
ROR1811-BR-1996          . . . . .A . . . . .
ror1812-BR-1996          . . . . .C . . . . .A . . . . .
toc2016-BRASIL-1991     . . . . .C . . . . .A . . . . .
AF100466_-Venezuela      . . . . .A . . . . .C . . . . .
M32941-Nova_Guine_C-1944 .T .T . . . . .C . . . . .A . . . . .
af100464-Tailandia-1996  T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A G.T .G . . . . .
AF100459_-Tailandia-1994 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .
AF100460_-Tailandia-1994 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .
AF100461_-Tailandia-1995 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .
af100462-Tailandia-1995 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .
af100463-Tailandia-1996 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A G.T .G . . . . .
AF100469_-Mexico-1992   .T .T .G .C . . . . .C . . . . .A .T . . . . .G .C .T . . . . .
af100467-Peru-1995      .T .T .G .C . . . . .C . . . . .T .A .T . . . . .G .C .T . . . . .
af100468-Peru-1996      .T .T .G .C . . . . .C . . . . .T .A .T . . . . .G .C .T . . . . .
L04561_-Mexico_-1983    .T .T .G .C . . . . .CC . . . . .A .T . . . . .G .C .T . . . . .C. . . . .
D00345_-Tailandia_-1980 .T .T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .
U3195_1_-Tailandia_-1993 T.T . . . . .C . . . . .C . . . . .A .T .G . . . . .

```

Continua

M20558-Jamaica-1983	CCA	TTC	GGA	GAC	AGC	TAC	ATC	ATC	ATA	GGA	GTA	GAG	CCG	GGA	CAA	TTG	AAA	CTC	AAC	TGG	TTT	AAG	AAA	GGA	AGT	TCC
44-2_-_Brasil_-_1990TTG
bel61082-Brasil-2001TG
bel63650-Brasil-2002TG
cea2440-BR-1994TG
cea2462-BR-1994TG
cea2463-BR-1994TG
GOI4191-BR-2002TG
MIG1269-Brasil-1995CTG
RGN53-BR-1994TG
ROR1811-BR-1996TG
ror1812-BR-1996TG
toc2016-BRASIL-1991TG
AF100466_-_VenezuelaTG
M32941-Nova_Guine_C-1944GT	...
af100464-Tailandia-1996C	..GCT	...
AF100459_-_Tailandia-1994C	..GCT	...
AF100460_-_Tailandia-1994C	..GCT	...
AF100461_-_Tailandia-1995TC	..GCT	...
af100462-Tailandia-1995TC	..GCT	...
af100463-Tailandia-1996C	..GCT	...
AF100469_-_Mexico-1992G	..A	..AG	..A	..GC
af100467-Peru-1995A	..AA	..G	..G	..GC
af100468-Peru-1996C	..A	..AA	..G	..G	..GC
L04561_-_Mexico_-_1983G	..A	..AG	..G	..GCC
D00345_-_Tailandia_-_1980C	..GCT	...
U3195_1_-_Tailandia_-_1993C	..GCT	...

M20558-Jamaica-1983	ATC	GGC	CAA	ATG	TTT	GAG	ACA	ACA	ATG	AGA	GGA	GCG	AAG	AGA	ATG	GCC	ATT	TTA	GGT	GAC	ACA	GCC	TGG	GAT	TTT	GGA
44-2_-_Brasil_-_1990AC
bel61082-Brasil-2001A
bel63650-Brasil-2002A
cea2440-BR-1994A
cea2462-BR-1994A
cea2463-BR-1994A
GOI4191-BR-2002C
MIG1269-Brasil-1995A
RGN53-BR-1994A
ROR1811-BR-1996A
ror1812-BR-1996A
toc2016-BRASIL-1991GA

Continua

M20558-Jamaica-1983	GGG	GTC	TCA	TGG	ACT	ATG	AAA	ATC	CTC	ATA	GGA	GTC	ATC	ATC	ACA	TGG	ATA	GGA	ATG	AAT	TCA	CGT	AGC	ACC	TCA	CTG
44-2_-_Brasil_-_1990
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002
MIG1269-Brasil-1995
RGN53-BR-1994
ROR1811-BR-1996
ror1812-BR-1996
toc2016-BRASIL-1991
AF100466_-_Venezuela
M32941-Nova_Guine_C-1944
af100464-Tailandia-1996T
AF100459_-_Tailandia-1994TT	..TC	..C
AF100460_-_Tailandia-1994TT	..TC	..C
AF100461_-_Tailandia-1995TT	..TC	..C
af100462-Tailandia-1995TT	..TC	..C
af100463-Tailandia-1996TT	..TC	..C
AF100469_-_Mexico-1992AGTA	..TC	..CA	...
af100467-Peru-1995TGTC	..CA	...
af100468-Peru-1996TGTC	..CA	...
L04561_-_Mexico_-_1983GA
D00345_-_Tailandia_-_1980T	..TC	..C
U3195_1_-_Tailandia_-_1993TT	..TC	..C

M20558-Jamaica-1983	TCT	GTG	TCA	CTA	GTA	TTG	GTG	GGA	GTC	GTG	ACA	CTG	TAC	CTG	GGA	GCT	ATG	GTG	CA
44-2_-_Brasil_-_1990GTT
bel61082-Brasil-2001
bel63650-Brasil-2002GA
cea2440-BR-1994
cea2462-BR-1994
cea2463-BR-1994
GOI4191-BR-2002C
MIG1269-Brasil-1995G

Continua

APÊNCIDE 03

Alinhamento nucleotídico das seqüências de VDEN3 que geraram as árvores filogenéticas.

	prM																										
	TTC	CAC	TTA	ACT	TCA	CGA	GAT	GGA	GAG	CCG	CGC	ATG	ATT	GTG	GGG	AAG	AAT	GAA	AGA	GGA	AAA	TCC	CTA	CTT	TTT	AAG	
M93130-H87-Filipinas-1956	
AM2394-BR-2002
be170617-BR-2002
BEL73318-BR-2003
CEA4739-BR-2002
GOI099-BR-2003
GOI100-BR-2003
MTO3103-BR-2001
RGN576-BR-2003
ror3832-BR-2002
ROR3845-BR-2002
AB189126_-Indonesia-1998
AB189127-Indonesia-1998
AY038605-RJ-BR-2001
AY679147-RJ-BR
L11433_-Porto_Rico_-1963
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978
L11428_-Indonesia_-1985
L11429_-Malasia_-1974
L11430_-Mocambique_-1985
L11431_-SriLanka_-1981
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992
L11436_-SriLanka_-1985
L11437_-SriLanka_-1989
L11438_-SriLanka_-1991
L11439_-Tahiti_-1965
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986
L11442_-Tailandia_-1987
L11619_-Tahiti_-1989
L11620_-Tailandia_-1973
L11435_-Samoa_-1986

Continua

	ACA	GCC	TCT	GGA	ATC	AAC	ATG	TGC	ACA	CTC	ATA	GCC	ATG	GAT	TTG	GGA	GAG	ATG	TGT	GAT	GAC	ACG	GTC	ACT	TAC	AAA
M93130-H87-Filipinas-1956	ACA	GCC	TCT	GGA	ATC	AAC	ATG	TGC	ACA	CTC	ATA	GCC	ATG	GAT	TTG	GGA	GAG	ATG	TGT	GAT	GAC	ACG	GTC	ACT	TAC	AAA
AM2394-BR-2002TC
bel70617-BR-2002TC
BEL73318-BR-2003TC
CEA4739-BR-2002TC
GOI099-BR-2003TC
GOI100-BR-2003TC
MTO3103-BR-2001C
RGN576-BR-2003TC
ror3832-BR-2002C
ROR3845-BR-2002TC
AB189126_-Indonesia-1998	A
AB189127-Indonesia-1998	A
AY038605-RJ-BR-2001C
AY679147-RJ-BRC
L11433_-Porto_Rico_-1963CTTC	A	A	C	...
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984C
L11425_-Indonesia_-1973
L11426_-Indonesia_-1978
L11427_-Indonesia_-1978
L11428_-Indonesia_-1985
L11429_-Malasia_-1974
L11430_-Mocambique_-1985TTC
L11431_-SriLanka_-1981TC
L11432_-Filipinas_-1983
L11422_-Fiji_-1992
L11436_-SriLanka_-1985TC	A
L11437_-SriLanka_-1989TC
L11438_-SriLanka_-1991TC
L11439_-Tahiti_-1965CT	A	A
L11440_-Tailandia_-1962T
L11441_-Tailandia_-1986TC
L11442_-Tailandia_-1987TC
L11619_-Tahiti_-1989
L11620_-Tailandia_-1973TC
L11435_-Samoa_-1986TC	..A

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	TGC	CCC	CAC	ATT	ACC	GAA	GTG	GAG	CCT	GAA	GAC	ATT	GAC	TGT	TGG	TGC	AAC	CTT	ACA	TCG	ACA	TGG	GTG	ACT	TAT	GGA
AM2394-BR-2002ACA
bel70617-BR-2002ACA
BEL73318-BR-2003ACA
CEA4739-BR-2002ACA
GOI099-BR-2003ACA
GOI100-BR-2003ACAC
MTO3103-BR-2001ACAC
RGN576-BR-2003ACA
ror3832-BR-2002ACA
ROR3845-BR-2002ACA
AB189126_-Indonesia-1998TTCCGC	..C
AB189127-Indonesia-1998TTCCGC	..C
AY038605-RJ-BR-2001ACAC
AY679147-RJ-BRACAC
L11433_-Porto_Rico-_1963	..TCC	..T	..CT	T.G
L11423_-Filipinas-_1956C
L11424_-India-_1984ACAG
L11425_-Indonesia-_1973TTCC	..C
L11426_-Indonesia-_1978TTCC	..C
L11427_-Indonesia-_1978TTTCC	..C
L11428_-Indonesia-_1985TTCCGC	..C
L11429_-Malasia-_1974TTCC	..C
L11430_-Mocambique-_1985ACA
L11431_-SriLanka-_1981TAC
L11432_-Filipinas-_1983TTCCCC	..C
L11422_-Fiji-_1992TTCC	..C
L11436_-SriLanka-_1985AC
L11437_-SriLanka-_1989ACA
L11438_-SriLanka-_1991ACA
L11439_-Tahiti-_1965CC	..T	..CCT	T.G
L11440_-Tailandia-_1962	G..ACA
L11441_-Tailandia-_1986T	...	G..C
L11442_-Tailandia-_1987T	...	G..AC
L11619_-Tahiti-_1989TTCC	..C
L11620_-Tailandia-_1973	G..AC
L11435_-Samoa-_1986ACGC

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	ACA	TGC	AAT	CAA	GCT	GGA	GAG	CAT	AGA	CGC	GAT	AAG	AGA	TCA	GTG	GCG	TTA	GCT	CCC	CAT	GTC	GGC	ATG	GGA	CTG	GAC
AM2394-BR-2002	..GC	..AT	
bel70617-BR-2002	..GGCTA	
BEL73318-BR-2003	..GGC	..ATA	
CEA4739-BR-2002	..GC	..AT	
GOI099-BR-2003	..GGCTA	
GOI100-BR-2003	..GCCT	
MTO3103-BR-2001	..GCGCTA	
RGN576-BR-2003	..GC	..AT	
ror3832-BR-2002	..GCT	
ROR3845-BR-2002	..GCT	
AB189126_-Indonesia-1998	..GCGT	
AB189127-Indonesia-1998	..GCGT	
AY038605-RJ-BR-2001	..GCGCTA	
AY679147-RJ-BR	..GCGCTA	
L11433_-Porto_Rico_-1963T	..C	..GGTA	
L11423_-Filipinas_-1956T	
L11424_-India_-1984	..GCT	
L11425_-Indonesia_-1973	..GCGT	
L11426_-Indonesia_-1978	..GG	..C	..CT	
L11427_-Indonesia_-1978	..GGT	
L11428_-Indonesia_-1985	..GCGT	
L11429_-Malasia_-1974	..GGT	
L11430_-Mocambique_-1985	..GCT	
L11431_-SriLanka_-1981	..GCCT	
L11432_-Filipinas_-1983	..GCT	
L11422_-Fiji_-1992	..GCGTA	
L11436_-SriLanka_-1985	..GCCTTT	...	
L11437_-SriLanka_-1989	..GCC	..AT	
L11438_-SriLanka_-1991	..GCC	..AT	
L11439_-Tahiti_-1965T	..C	..GGTA	
L11440_-Tailandia_-1962	..GCT	
L11441_-Tailandia_-1986	..GGCT	
L11442_-Tailandia_-1987	..GGCT	
L11619_-Tahiti_-1989	..GCGTA	
L11620_-Tailandia_-1973	..GGCCT	
L11435_-Samoa_-1986	..GCT	

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	ACA	CGC	ACT	CAA	ACC	TGG	ATG	TCG	GCT	GAA	GGA	GCT	TGG	AGA	CAA	GTC	GAG	AAG	GTA	GAG	ACA	TGG	GCC	CTT	AGG	CAC
AM2394-BR-2002CC	
be170617-BR-2002CGC	
BEL73318-BR-2003CC	
CEA4739-BR-2002CC	
GOI099-BR-2003CGC	
GOI100-BR-2003CGC	
MTO3103-BR-2001CC	
RGN576-BR-2003CC	
ror3832-BR-2002CGC	
ROR3845-BR-2002CGC	
AB189126_-Indonesia-1998	G..CA	T..	
AB189127-Indonesia-1998	G..CA	T..	
AY038605-RJ-BR-2001CG	
AY679147-RJ-BRCG	
L11433_-Porto_Rico_-1963	..G	..ATGT	T..	
L11423_-Filipinas_-1956C	
L11424_-India_-1984CT	
L11425_-Indonesia_-1973CT	
L11426_-Indonesia_-1978CT	
L11427_-Indonesia_-1978CAT	
L11428_-Indonesia_-1985T	..CT	
L11429_-Malasia_-1974T	..CT	
L11430_-Mocambique_-1985C	
L11431_-SriLanka_-1981C	
L11432_-Filipinas_-1983CGGT	
L11422_-Fiji_-1992CGT	
L11436_-SriLanka_-1985C	
L11437_-SriLanka_-1989CC	
L11438_-SriLanka_-1991CC	
L11439_-Tahiti_-1965	..G	..ATGT	T..	
L11440_-Tailandia_-1962CAA	
L11441_-Tailandia_-1986C	
L11442_-Tailandia_-1987CT	
L11619_-Tahiti_-1989CGT	
L11620_-Tailandia_-1973C	
L11435_-Samoa_-1986C	

M93130-H87-Filipinas-1956	CCA	GGG	TTT	ACC	ATA	CTA	GCC	CTA	TTT	CTT	GCC	CAT	TAC	ATA	GGC	ACT	TCC	TTG	ACC	CAG	AAA	GTG	GTT	ATT	TTT	ATA
AM2394-BR-2002CG
be170617-BR-2002CAG
BEL73318-BR-2003CG
CEA4739-BR-2002CG
GOI099-BR-2003CAG
GOI100-BR-2003CAG
MTO3103-BR-2001CAG
RGN576-BR-2003CG
ror3832-BR-2002CG
ROR3845-BR-2002CG
AB189126_-Indonesia-1998C	..AGCC	...
AB189127-Indonesia-1998C	..AGCC	...
AY038605-RJ-BR-2001CAG
AY679147-RJ-BRCAG
L11433_-Porto_Rico_-1963C	..T	C..AGCC	...
L11423_-Filipinas_-1956CG
L11424_-India_-1984CG
L11425_-Indonesia_-1973C	..AAGC	...
L11426_-Indonesia_-1978C	..A	...	T..GCC	...
L11427_-Indonesia_-1978C	..AGCC	..C
L11428_-Indonesia_-1985C	..ATGCC	...
L11429_-Malasia_-1974C	..AGCC	...
L11430_-Mocambique_-1985CG
L11431_-SriLanka_-1981CGCG	..G
L11432_-Filipinas_-1983C	..AGCC	...
L11422_-Fiji_-1992C	..AGCC	...
L11436_-SriLanka_-1985CTGCC	...
L11437_-SriLanka_-1989CTGCC	...
L11438_-SriLanka_-1991CG
L11439_-Tahiti_-1965C	..T	C..TAGCC	...
L11440_-Tailandia_-1962CCG
L11441_-Tailandia_-1986CTCG
L11442_-Tailandia_-1987CTCG
L11619_-Tahiti_-1989C	..AGCC	...
L11620_-Tailandia_-1973CTG
L11435_-Samoa_-1986CGCC	...



Continua

Env

	CTA	TTA	ATG	CTG	GTT	ACC	CCA	TCC	ATG	ACA	ATG	AGA	TGT	GTG	GGA	GTA	GGA	AAC	AGA	GAT	TTT	GTG	GAA	GGC	CTA	TCG
M93130-H87-Filipinas-1956	...	C..C	A..TA
AM2394-BR-2002	...	C..CTA
bel70617-BR-2002	...	C..CTA
BEL73318-BR-2003	...	C..CTA
CEA4739-BR-2002	...	C..C	A..TA
GOI099-BR-2003	...	C..CTA
GOI100-BR-2003	...	C..CTA
MTO3103-BR-2001	...	C..C	A..TA
RGN576-BR-2003	...	C..C	A..TA
ror3832-BR-2002	...	C..C	A..TA
ROR3845-BR-2002	...	C..C	A..TA
AB189126_-Indonesia-1998	...	C..CTA
AB189127-Indonesia-1998	...	C..CTA
AY038605-RJ-BR-2001	...	C..	?..CTA
AY679147-RJ-BR	...	C..CTA
L11433_-Porto_Rico_-1963	...	C.G	...	T..	..CCG
L11423_-Filipinas_-1956	...	C..C
L11424_-India_-1984	...	C..CTA
L11425_-Indonesia_-1973	...	C..CA
L11426_-Indonesia_-1978	...	C..CA
L11427_-Indonesia_-1978	...	C..CA
L11428_-Indonesia_-1985	...	C..C	..TA
L11429_-Malasia_-1974	...	C..CA
L11430_-Mocambique_-1985	...	C..CTA
L11431_-SriLanka_-1981	...	C..CCTA
L11432_-Filipinas_-1983	...	C..CA
L11422_-Fiji_-1992	...	C..CA
L11436_-SriLanka_-1985	...	C..CTA
L11437_-SriLanka_-1989	...	C..CTA
L11438_-SriLanka_-1991	...	C..C	A..TA
L11439_-Tahiti_-1965	...	C.G	...	T..	..CCG
L11440_-Tailandia_-1962	...	C..C
L11441_-Tailandia_-1986	...	C..C	..T	G..CT	..G	...
L11442_-Tailandia_-1987	...	C..C	..TCT	..G	...
L11619_-Tahiti_-1989	...	C..CA
L11620_-Tailandia_-1973	...	C..	..AC	..T	G..CT
L11435_-Samoa_-1986	...	C..CTA

Continua

	GGA	GCT	ACG	TGG	GTT	GAC	GTG	GTG	CTC	GAG	CAC	GGT	GGG	TGT	GTG	ACT	ACC	ATG	GCT	AAG	AAC	AAG	CCC	ACG	CTG	GAC	
M93130-H87-Filipinas-1956																											
AM2394-BR-2002GT
be170617-BR-2002GT
BEL73318-BR-2003GT
CEA4739-BR-2002GT	..T
GOI099-BR-2003GT
GOI100-BR-2003GT
MTO3103-BR-2001GT
RGN576-BR-2003GT
ror3832-BR-2002GT
ROR3845-BR-2002GT
AB189126_-Indonesia-1998CA
AB189127-Indonesia-1998CA
AY038605-RJ-BR-2001GT
AY679147-RJ-BRAT
L11433_-Porto_Rico_-1963C	..ATCAT
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984GT
L11425_-Indonesia_-1973T
L11426_-Indonesia_-1978TT
L11427_-Indonesia_-1978AA
L11428_-Indonesia_-1985AT
L11429_-Malasia_-1974TT
L11430_-Mocambique_-1985GT
L11431_-SriLanka_-1981T
L11432_-Filipinas_-1983T
L11422_-Fiji_-1992TT	..T
L11436_-SriLanka_-1985TT
L11437_-SriLanka_-1989GT
L11438_-SriLanka_-1991GT
L11439_-Tahiti_-1965C	..ATCCT	..T	..T
L11440_-Tailandia_-1962
L11441_-Tailandia_-1986TCT
L11442_-Tailandia_-1987TTCT
L11619_-Tahiti_-1989TT	..T	..T
L11620_-Tailandia_-1973C
L11435_-Samoa_-1986AT

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	ATA	GAG	CTT	CAG	AAG	ACT	GAG	GCC	ACT	CAG	CTG	GCG	ACC	CTA	AGG	AAG	CTA	TGC	ATT	GAG	GGA	AAA	ATT	ACC	AAC	ATA
AM2394-BR-2002CC	..AG
be170617-BR-2002C	..AC	..ATG
BEL73318-BR-2003C	..AC	..AG
CEA4739-BR-2002CC	..A	A..	T..GT
GOI099-BR-2003C	..AC	..ATG
GOI100-BR-2003C	..AC	..A	T..G
MTO3103-BR-2001C	..AC	..ATG
RGN576-BR-2003CC	..A	A..	T..GTT
ror3832-BR-2002CC	..AG
ROR3845-BR-2002CC	..AG
AB189126_-Indonesia-1998CCC	..AAACG	..G
AB189127-Indonesia-1998CCC	..AAACG	..G
AY038605-RJ-BR-2001C	..AC	..A	T..TG
AY679147-RJ-BRCC	..A	T..G
L11433_-Porto_Rico_-1963T	..C	..A	T..G	..C	..GC	...
L11423_-Filipinas_-1956CC	..AG
L11424_-India_-1984CC	..AG
L11425_-Indonesia_-1973CCC	..AA	..TG	..
L11426_-Indonesia_-1978CCC	..AA	..AG	..
L11427_-Indonesia_-1978CG	..CC	..A	T..G	..
L11428_-Indonesia_-1985CCC	..AAG	..
L11429_-Malasia_-1974CCC	..AAG	..
L11430_-Mocambique_-1985CC	..AAG	..
L11431_-SriLanka_-1981CCC	..AG
L11432_-Filipinas_-1983CCC	..ATAG	..
L11422_-Fiji_-1992CCC	..AA	..TG	..
L11436_-SriLanka_-1985CCC	..AG
L11437_-SriLanka_-1989CCC	..AG
L11438_-SriLanka_-1991CCC	..AG
L11439_-Tahiti_-1965CC	..A
L11440_-Tailandia_-1962CC	..A
L11441_-Tailandia_-1986CC	..AT
L11442_-Tailandia_-1987CC	..AT
L11619_-Tahiti_-1989CCC	..AATG
L11620_-Tailandia_-1973CC	..AT
L11435_-Samoa_-1986CC	..AAG

Continua

	ACA	ACC	GAC	TCA	AGA	TGT	CCC	ACC	CAA	GGG	GAA	GCG	ATT	TTA	CCT	GAG	GAG	CAG	GAC	CAG	AAC	TAC	GTG	TGT	AAG	CAT
M93130-H87-Filipinas-1956TTG	..G
AM2394-BR-2002TTG	..G
bel70617-BR-2002TTC	..G	..GAC
BEL73318-BR-2003TTC	..G	..GA
CEA4739-BR-2002TTG	..G
GOI099-BR-2003TTC	..G	..GAC
GOI100-BR-2003TTC	..G	..GA
MTO3103-BR-2001TTC	..G	..GAC
RGN576-BR-2003TTG	..G
ror3832-BR-2002TTG	..G
ROR3845-BR-2002TTG	..G
AB189126_-Indonesia-1998G	..CCC
AB189127-Indonesia-1998G	..CCC
AY038605-RJ-BR-2001TTC	..G	..GAC
AY679147-RJ-BRTTG	..G
L11433_-Porto_Rico_-1963GTGCATC
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984TTG	..G
L11425_-Indonesia_-1973G	..CC
L11426_-Indonesia_-1978G	..CAC
L11427_-Indonesia_-1978G	..CC
L11428_-Indonesia_-1985G	..CC
L11429_-Malasia_-1974G	..CC
L11430_-Mocambique_-1985G	..CC
L11431_-SriLanka_-1981TTG	..G
L11432_-Filipinas_-1983GCC
L11422_-Fiji_-1992G	..CC
L11436_-SriLanka_-1985TC	..TG	..C	..G
L11437_-SriLanka_-1989T	..TTG	..G
L11438_-SriLanka_-1991TTG	..G
L11439_-Tahiti_-1965TG
L11440_-Tailandia_-1962TGT
L11441_-Tailandia_-1986TGTGA	..C
L11442_-Tailandia_-1987TGTGAC	...
L11619_-Tahiti_-1989G	..CC
L11620_-Tailandia_-1973TGTA
L11435_-Samoa_-1986TTG	..GC

Continua

	ACA	TAC	GTG	GAC	AGA	GGC	TGG	GGA	AAC	GGT	TGT	GGT	TTG	TTT	GGC	AAG	GGA	AGC	TTG	GTG	ACA	TGC	GCG	AAA	TTT	CAA
M93130-H87-Filipinas-1956	ACA	TAC	GTG	GAC	AGA	GGC	TGG	GGA	AAC	GGT	TGT	GGT	TTG	TTT	GGC	AAG	GGA	AGC	TTG	GTG	ACA	TGC	GCG	AAA	TTT	CAA
AM2394-BR-2002	A	G	C	A	G	T
bel70617-BR-2002	A	G	...	A	...	C	A	...	T
BEL73318-BR-2003	A	G	...	A	...	C	A	...	T
CEA4739-BR-2002	A	G	C	A	G	T
GOI099-BR-2003	A	G	...	A	...	C	A	...	T
GOI100-BR-2003	A	G	...	A	...	C	A	G	T
MTO3103-BR-2001	A	G	...	A	...	C	A	...	T
RGN576-BR-2003	A	G	C	A	G	T
ror3832-BR-2002	A	G	C	A	G	T
ROR3845-BR-2002	A	G	C	A	G	T
AB189126_-Indonesia-1998	...	T	A
AB189127-Indonesia-1998	...	T	A
AY038605-RJ-BR-2001	A	G	...	A	A	...	T
AY679147-RJ-BR	A	G	...	A	A	...	T
L11433_-Porto_Rico_-1963	G	T	T	C	T	C	C
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984	A	G	A	...	T
L11425_-Indonesia_-1973	A
L11426_-Indonesia_-1978	A	G
L11427_-Indonesia_-1978	A
L11428_-Indonesia_-1985	A	...	T
L11429_-Malasia_-1974	A
L11430_-Mocambique_-1985	A	A
L11431_-SriLanka_-1981	A	G	A	...	T
L11432_-Filipinas_-1983	A
L11422_-Fiji_-1992	C	...	A	G
L11436_-SriLanka_-1985	A	G	A	...	T
L11437_-SriLanka_-1989	A	G	C	A	G	T
L11438_-SriLanka_-1991	A	G	C	A	G	T
L11439_-Tahiti_-1965	A	A
L11440_-Tailandia_-1962	C	A	A
L11441_-Tailandia_-1986	T	A	A	C
L11442_-Tailandia_-1987	T	...	T	A	A
L11619_-Tahiti_-1989	C	...	A
L11620_-Tailandia_-1973	T	A
L11435_-Samoa_-1986	A	G	C	...	A	...	T

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	TGT	TTA	GAA	TCA	ATA	GAG	GGA	AAA	GTG	GTG	CAA	CAT	GAG	AAC	CTC	AAA	TAC	ACC	GTC	ATC	ATC	ACA	GTG	CAC	ACA	GGA
AM2394-BR-2002	..C	C.G	...	C..	T..T
bel70617-BR-2002	..C	C.G	...	C..G	T..
BEL73318-BR-2003	..C	C.G	...	C..G	T..T
CEA4739-BR-2002	..C	C.G	...	C..	T..T
GOI099-BR-2003	..C	C.G	...	C..G	T..
GOI100-BR-2003	..C	C.G	...	C..G	T..T
MTO3103-BR-2001	..C	C.G	...	C..G	T..
RGN576-BR-2003	..C	C.G	...	C..	T..T
ror3832-BR-2002	..C	C.G	...	C..G	T..
ROR3845-BR-2002	..C	C.G	...	C..G	T..
AB189126_-Indonesia-1998GTG
AB189127-Indonesia-1998GTG
AY038605-RJ-BR-2001	..C	C.G	...	C..G	T..
AY679147-RJ-BR	..C	C.G	...	C..G	T..
L11433_-Porto_Rico_-1963	CT.A	A..TT
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984	..C	C.G	...	C..	T..T
L11425_-Indonesia_-1973GG
L11426_-Indonesia_-1978GG
L11427_-Indonesia_-1978GTAGT
L11428_-Indonesia_-1985GG
L11429_-Malasia_-1974GG
L11430_-Mocambique_-1985G	T..T
L11431_-SriLanka_-1981	..C	C.G	T..T
L11432_-Filipinas_-1983G
L11422_-Fiji_-1992GCG
L11436_-SriLanka_-1985	..C	C.G	T..T
L11437_-SriLanka_-1989	..C	C.G	...	C..	T..T
L11438_-SriLanka_-1991	..C	C.G	...	C..	T..T
L11439_-Tahiti_-1965T
L11440_-Tailandia_-1962GT
L11441_-Tailandia_-1986TT
L11442_-Tailandia_-1987	...	C..	...	C..TT
L11619_-Tahiti_-1989GCG
L11620_-Tailandia_-1973	..CTT
L11435_-Samoa_-1986	..C	C.GT

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	GAC	CAA	CAC	CAG	GTG	GGA	AAT	GAA	ACG	CAG	GGA	GTT	ACG	GCT	GAG	ATA	ACA	TCC	CAG	GCA	TCA	ACC	GCT	GAA	GCC	ATT
AM2394-BR-2002AC	C.T	A..C
bel70617-BR-2002C	C.T	A..C
BEL73318-BR-2003C	C.T	A..C
CEA4739-BR-2002AC	C.T	A..C
GOI099-BR-2003C	C.T	A..C
GOI100-BR-2003	..TC	C.T	A..C
MTO3103-BR-2001AC	C.T	A..C
RGN576-BR-2003AC	C.T	A..C
ror3832-BR-2002	..TAC	C.T	A..C
ROR3845-BR-2002	..TAC	C.T	A..C
AB189126_-Indonesia-1998C	C..TCC
AB189127-Indonesia-1998C	C..TCC
AY038605-RJ-BR-2001	..TC	C.T	A..C
AY679147-RJ-BR	..TC	C.T	A..C
L11433_-Porto_Rico_-1963	A..CA	C..TT	..CC
L11423_-Filipinas_-1956C	C..TT	..CC
L11424_-India_-1984C	C.T	A..C
L11425_-Indonesia_-1973	..TC	C..TC
L11426_-Indonesia_-1978C	C..TC
L11427_-Indonesia_-1978CA	C..TC
L11428_-Indonesia_-1985C	C..A	..TCC
L11429_-Malasia_-1974C	C..TC
L11430_-Mocambique_-1985C	C.T	A..C
L11431_-SriLanka_-1981C	C.T	A..C
L11432_-Filipinas_-1983C	C..TC
L11422_-Fiji_-1992	..TC	C..TC
L11436_-SriLanka_-1985C	C.T	A..C
L11437_-SriLanka_-1989AC	C.T	A..C
L11438_-SriLanka_-1991AC	C.T	A..C
L11439_-Tahiti_-1965C	C.T	A..C
L11440_-Tailandia_-1962AC	C..	A..C
L11441_-Tailandia_-1986CCT	C..TT	..C
L11442_-Tailandia_-1987CCT	C..TT	..C
L11619_-Tahiti_-1989	..TC	C..TC
L11620_-Tailandia_-1973C	C..TT	..C
L11435_-Samoa_-1986C	C.T	A..	...	A..	..C

Continua

	TTA	CCT	GAA	TAT	GGA	ACC	CTC	GGG	CTA	GAA	TGC	TCA	CCA	CGG	ACA	GGT	TTG	GAT	TTC	AAT	GAA	ATG	ATT	TTA	TTG	ACA
M93130-H87-Filipinas-1956	..GTC	...	C.A	...
AM2394-BR-2002	..GTC	..G	C.A	...
bel70617-BR-2002	..GTC	..G	C.A	...
BEL73318-BR-2003	..GTC	..G	C.A	...
CEA4739-BR-2002	..GTC	...	C.A	...
GOI099-BR-2003	..GTC	..G	C.A	...
GOI100-BR-2003	..GTC	..G	C.A	...
MTO3103-BR-2001	..GTC	..G	C.A	...
RGN576-BR-2003	..GTC	...	C.A	...
ror3832-BR-2002	..GTC	...	C.A	...
ROR3845-BR-2002	..GTC	...	C.A	...
AB189126_-Indonesia-1998TG
AB189127-Indonesia-1998TG
AY038605-RJ-BR-2001	..GTC	..G	C.A	...
AY679147-RJ-BR	..GTC	..G	C.A	...
L11433_-Porto_Rico_-1963CT	..A	T..C	..CC	..C	C.A	...
L11423_-Filipinas_-1956TG
L11424_-India_-1984	..GTC	...	C.A	...
L11425_-Indonesia_-1973TAG
L11426_-Indonesia_-1978TAC	..G
L11427_-Indonesia_-1978T	..TG	..C	..AG
L11428_-Indonesia_-1985TG
L11429_-Malasia_-1974TAG
L11430_-Mocambique_-1985	..GTAC	...	C.A	...
L11431_-SriLanka_-1981	..GTC	...	C.A	...
L11432_-Filipinas_-1983GTA	?	??G
L11422_-Fiji_-1992	..GTTC	..AG
L11436_-SriLanka_-1985	..GTTC	...	C.A	...
L11437_-SriLanka_-1989	..GTC	...	C.A	...
L11438_-SriLanka_-1991	..GTC	...	C.A	...
L11439_-Tahiti_-1965	..GTC	...	C..	...
L11440_-Tailandia_-1962	..GTC
L11441_-Tailandia_-1986	..GTC
L11442_-Tailandia_-1987	..GTG
L11619_-Tahiti_-1989	..GTTC	..AG
L11620_-Tailandia_-1973	..GTC
L11435_-Samoa_-1986	..GTC	...	C.A	...

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	ATG	AAG	AAC	AAA	GCA	TGG	ATG	GTA	CAT	AGA	CAA	TGG	TTC	TTT	GAC	TTA	CCC	CTA	CCA	TGG	ACA	TCA	GGA	GCT	ACA	ACA
AM2394-BR-2002	C..	..T
bel70617-BR-2002	C..	..TC
BEL73318-BR-2003	C..	..TC
CEA4739-BR-2002	C..	..T
GOI099-BR-2003	C..	..TC
GOI100-BR-2003T	...	C..	..TC
MTO3103-BR-2001	C..	..TC
RGN576-BR-2003	C..	..T
ror3832-BR-2002	C..	..TC
ROR3845-BR-2002	C..	..T
AB189126_-Indonesia-1998T	...	C..	..TG
AB189127-Indonesia-1998T	...	C..	..TG
AY038605-RJ-BR-2001T	...	C..	..T	T..C
AY679147-RJ-BRT	...	C..	..TG	...
L11433_-Porto_Rico_-1963G	..C	C..	..TG	...
L11423_-Filipinas_-1956	C..	..T
L11424_-India_-1984	C..	..T
L11425_-Indonesia_-1973T	C..	..T
L11426_-Indonesia_-1978T	C..	..TG
L11427_-Indonesia_-1978CT	C..	..T
L11428_-Indonesia_-1985T	C..	..TG	..C
L11429_-Malasia_-1974T	C..	..TG
L11430_-Mocambique_-1985T	C..	..T
L11431_-SriLanka_-1981	C..	..T
L11432_-Filipinas_-1983G	C..	..T
L11422_-Fiji_-1992T	C.G	..T	T..
L11436_-SriLanka_-1985	C..	..T
L11437_-SriLanka_-1989T	C..	..T
L11438_-SriLanka_-1991	C..	..T
L11439_-Tahiti_-1965	C..	..T
L11440_-Tailandia_-1962	C..	..TCG	...
L11441_-Tailandia_-1986	C..	..T
L11442_-Tailandia_-1987GC
L11619_-Tahiti_-1989	C.G	..T	T..
L11620_-Tailandia_-1973	C..	..T
L11435_-Samoa_-1986	C..	..T

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	AAA	ACA	CCA	ACT	TGG	AAC	AGG	AAA	GAG	CTT	CTT	GTG	ACA	TTT	AAA	AAT	GCA	CAT	GCA	AAA	AAG	CAA	GAA	GTA	GTT	GTC
AM2394-BR-2002	G..	..GCGCCG	..G	..A
bel70617-BR-2002	G..CGCCG	..G	..A	..C
BEL73318-BR-2003	G..CGCCG	..G	..A	..C
CEA4739-BR-2002	G..	..GCGCCG	..G	..A	..C
GOI099-BR-2003	G..CGCCG	..G	..A	..C
GOI100-BR-2003	G..CGCCG	..G	..A	..C
MTO3103-BR-2001	G..CGCCG	..G	..A	..C
RGN576-BR-2003	G..	..GCGCCG	..G	..A	..C
ror3832-BR-2002	G..CGCCG	..G	..A	..C
ROR3845-BR-2002	G..CGCCG	..G	..A	..C
AB189126_-Indonesia-1998	G..CT	..ACCCG	..G	..AA	...
AB189127-Indonesia-1998	G..CT	..ACCCG	..G	..AA	...
AY038605-RJ-BR-2001	G..CGCCG	..G	..A	..C
AY679147-RJ-BR	G..CGCCG	..G	..A
L11433_-Porto_Rico_-1963	G..	GT.CG	..G	..AGT
L11423_-Filipinas_-1956	G..
L11424_-India_-1984	G..	C.CGC	..G	..CGA
L11425_-Indonesia_-1973	G..CT	..ACCA	...
L11426_-Indonesia_-1978	G..CT	..ACCA	..GA	...
L11427_-Indonesia_-1978	G..CT	..ACCAA	...
L11428_-Indonesia_-1985	G..CT	..ACCCAA	...
L11429_-Malasia_-1974	G..CT	..ACCGAA	...
L11430_-Mocambique_-1985	G..CGCC
L11431_-SriLanka_-1981	G..CGCCA
L11432_-Filipinas_-1983	G..CT	..ACCAA	..T
L11422_-Fiji_-1992	G..CT	..ACCAA	...
L11436_-SriLanka_-1985	G..CGCCA
L11437_-SriLanka_-1989	G..	..GCTGCCA
L11438_-SriLanka_-1991	G..	..GCGCCA
L11439_-Tahiti_-1965	G..CC
L11440_-Tailandia_-1962	G..CC
L11441_-Tailandia_-1986	G..C
L11442_-Tailandia_-1987	G.GC
L11619_-Tahiti_-1989	G..CT	..ACCA	...
L11620_-Tailandia_-1973	G.GC
L11435_-Samoa_-1986	G..CGCCGAT

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	CTT	GGA	TCA	CAA	GAG	GGA	GCA	ATG	CAT	ACA	GCA	CTG	ACA	GGA	GCT	ACA	GAG	ATC	CAA	ACC	TCA	GGA	GGC	ACA	AGT	ATT
AM2394-BR-2002	..AT	...	A.AC	...	T..CAA	
bel70617-BR-2002TAC	...	T..CAA	
BEL73318-BR-2003TAC	...	T..CAA	
CEA4739-BR-2002TAC	...	T..CAAC	...	
GOI099-BR-2003TAC	...	T..CAA	
GOI100-BR-2003GC	...	T..CAAC	...	
MTO3103-BR-2001TAC	...	T..CAAC	...	
RGN576-BR-2003T	...	A.AC	...	T..CAA	
ror3832-BR-2002	..ATAC	...	T..	C..CAA	
ROR3845-BR-2002TAC	...	T..CAA	
AB189126_-Indonesia-1998GCC	
AB189127-Indonesia-1998GCC	
AY038605-RJ-BR-2001TAC	...	T..CAA	
AY679147-RJ-BRGC	...	T..CAA	
L11433_-Porto_Rico_-1963GCCTT	
L11423_-Filipinas_-1956	
L11424_-India_-1984GCCAAC	...	
L11425_-Indonesia_-1973GCC	
L11426_-Indonesia_-1978GCCC	...	
L11427_-Indonesia_-1978GCC	
L11428_-Indonesia_-1985GC	...	T..C	
L11429_-Malasia_-1974GCC	
L11430_-Mocambique_-1985GCCAAC	...	
L11431_-SriLanka_-1981GTCAC	...	
L11432_-Filipinas_-1983GCCG	
L11422_-Fiji_-1992GCC	
L11436_-SriLanka_-1985GCCAC	...	
L11437_-SriLanka_-1989GACCAAC	...	
L11438_-SriLanka_-1991GCCAAC	...	
L11439_-Tahiti_-1965GCCTT	
L11440_-Tailandia_-1962GCCAC	...	
L11441_-Tailandia_-1986GC	..GCATC	
L11442_-Tailandia_-1987GC	..GCTATC	
L11619_-Tahiti_-1989GCC	
L11620_-Tailandia_-1973GC	..GCAC	
L11435_-Samoa_-1986GCCAAC	...	

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	TTT	GCG	GGG	CAC	TTA	AAA	TGT	AGA	CTC	AAG	ATG	GAC	AAA	TTG	AAA	CTC	AAG	GGG	ATG	AGC	TAT	GCA	ATG	TGC	TTG	AAT
AM2394-BR-2002T	G..	AC.	...
bel70617-BR-2002T	G..	AC.	...
BEL73318-BR-2003T	G..	AC.	...
CEA4739-BR-2002T	G..	AC.	...
GOI099-BR-2003T	G..	AC.	...
GOI100-BR-2003T	G..	AC.	...
MTO3103-BR-2001TT	G..	AC.	...
RGN576-BR-2003T	G..	AC.	...
ror3832-BR-2002T	G..	AC.	...
ROR3845-BR-2002T	G..	AC.	...
AB189126_-Indonesia-1998GC	G..CA	...
AB189127-Indonesia-1998GC	G..CA	...
AY038605-RJ-BR-2001TT	G..	AC.	...
AY679147-RJ-BRGT	G..	AC.	...
L11433_-Porto_Rico_-1963	..CA	..T	C..T	..A	C..	G..CA	GGC
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984T	G..	AC.	...
L11425_-Indonesia_-1973	G..
L11426_-Indonesia_-1978C	G..
L11427_-Indonesia_-1978G	G..
L11428_-Indonesia_-1985C	G..A	...
L11429_-Malasia_-1974C	C..	G..T
L11430_-Mocambique_-1985T	G..	AC.	...
L11431_-SriLanka_-1981T	G..	AC.	...
L11432_-Filipinas_-1983	G..
L11422_-Fiji_-1992	G..
L11436_-SriLanka_-1985T	G..	AC.	...
L11437_-SriLanka_-1989T	G..	AC.	...
L11438_-SriLanka_-1991T	G..	AC.	...
L11439_-Tahiti_-1965	..CA	..T	C..T	..A	C..	G..ACA	GGC
L11440_-Tailandia_-1962GT	G..A
L11441_-Tailandia_-1986GTA	G..
L11442_-Tailandia_-1987GT	G..
L11619_-Tahiti_-1989	G..
L11620_-Tailandia_-1973GT	G..C	...
L11435_-Samoa_-1986T	G..	AC.	...

Continua

	ACC	TTT	GTG	TTG	AAG	AAA	GAA	GTC	TCC	GAA	ACG	CAG	CAT	GGG	ACA	ATA	CTC	ATT	AAG	GTT	GAG	TAC	AAA	GGG	GAA	GAT
M93130-H87-Filipinas-1956AC
AM2394-BR-2002AC
bel70617-BR-2002AC
BEL73318-BR-2003AC
CEA4739-BR-2002AC
GOI099-BR-2003AC
GOI100-BR-2003AC
MTO3103-BR-2001ACC
RGN576-BR-2003AC
ror3832-BR-2002AC
ROR3845-BR-2002ACT
AB189126_-Indonesia-1998	G..TA	..AC	...
AB189127-Indonesia-1998	G..TA	..AC	...
AY038605-RJ-BR-2001A	G..C
AY679147-RJ-BRAC
L11433_-Porto_Rico_-1963C	...	C..	..AT	..TGTAC
L11423_-Filipinas_-1956AC
L11424_-India_-1984AGC
L11425_-Indonesia_-1973	G..	..CAC
L11426_-Indonesia_-1978	G..	..CAC
L11427_-Indonesia_-1978	G..	..CAAC
L11428_-Indonesia_-1985	G..A	..ATC
L11429_-Malasia_-1974	G..AC
L11430_-Mocambique_-1985AC
L11431_-SriLanka_-1981GAGC
L11432_-Filipinas_-1983	G..AC
L11422_-Fiji_-1992	G..	..CTAGC
L11436_-SriLanka_-1985AC
L11437_-SriLanka_-1989AC
L11438_-SriLanka_-1991AG	..CG
L11439_-Tahiti_-1965C	..C	C..	..AT	..TC	..C	..G	..T	..AC
L11440_-Tailandia_-1962AC
L11441_-Tailandia_-1986	..TTC
L11442_-Tailandia_-1987AC
L11619_-Tahiti_-1989	G..	..CTAGC
L11620_-Tailandia_-1973GC
L11435_-Samoa_-1986AGC

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	GCA	CCC	TGC	AAG	ATT	CCT	TTC	TCC	ACG	GAG	GAT	GGA	CAA	GGG	AAA	GCT	CAC	AAT	GGC	AGA	CTG	ATC	ACA	GCC	AAT	CCA
AM2394-BR-2002TATC	...	
bel70617-BR-2002TATC	...	
BEL73318-BR-2003TATC	...	
CEA4739-BR-2002TATC	...	
GOI099-BR-2003TATC	...	
GOI100-BR-2003TATC	...	
MTO3103-BR-2001TATC	...	
RGN576-BR-2003TA	T..C	...	
ror3832-BR-2002TATC	...	
ROR3845-BR-2002TATC	...	
AB189126_-Indonesia-1998TCCT	..C	...	
AB189127-Indonesia-1998TCCT	..C	...	
AY038605-RJ-BR-2001TATC	...	
AY679147-RJ-BRTATC	...	
L11433_-Porto_Rico_-1963TAC	..TTT	..C	
L11423_-Filipinas_-1956T	
L11424_-India_-1984TAC	...	
L11425_-Indonesia_-1973TCT	..C	...	
L11426_-Indonesia_-1978TT	..C	...	
L11427_-Indonesia_-1978TCT	..C	...	
L11428_-Indonesia_-1985TCT	..C	...	
L11429_-Malasia_-1974TCT	..C	...	
L11430_-Mocambique_-1985TAC	
L11431_-SriLanka_-1981TAC	
L11432_-Filipinas_-1983T	..TGCT	..C	...	
L11422_-Fiji_-1992TCT	..C	...	
L11436_-SriLanka_-1985TAC	
L11437_-SriLanka_-1989TAC	
L11438_-SriLanka_-1991TAC	
L11439_-Tahiti_-1965TAC	..TTTT	..C	
L11440_-Tailandia_-1962TC	
L11441_-Tailandia_-1986TATC	
L11442_-Tailandia_-1987TATC	
L11619_-Tahiti_-1989TCT	..C	
L11620_-Tailandia_-1973TTC	
L11435_-Samoa_-1986AC	

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	GTG	GTG	ACC	AAG	AAG	GAG	GAG	CCT	GTC	AAC	ATT	GAG	GCT	GAA	CCT	CCT	TTT	GGG	GAA	AGT	AAT	ATA	GTA	ATT	GGA	ATT
AM2394-BR-2002TTG	
be170617-BR-2002TTG	
BEL73318-BR-2003TTG	
CEA4739-BR-2002TTG	
GOI099-BR-2003TTG	
GOI100-BR-2003TT	..CG	
MTO3103-BR-2001TTG	
RGN576-BR-2003TTG	
ror3832-BR-2002TTG	
ROR3845-BR-2002TTG	
AB189126_-Indonesia-1998TAC	..A	
AB189127-Indonesia-1998TAC	..A	
AY038605-RJ-BR-2001TTG	
AY679147-RJ-BRTTG	
L11433_-Porto_Rico_-1963	..AAC	..T	..GC	
L11423_-Filipinas_-1956	
L11424_-India_-1984T	
L11425_-Indonesia_-1973TA	
L11426_-Indonesia_-1978TAG	
L11427_-Indonesia_-1978TT	..T	..TA	
L11428_-Indonesia_-1985TAC	...	
L11429_-Malasia_-1974GTA	
L11430_-Mocambique_-1985TT	
L11431_-SriLanka_-1981TT	
L11432_-Filipinas_-1983T	..C	..AG	
L11422_-Fiji_-1992	A.AA	
L11436_-SriLanka_-1985TTC	
L11437_-SriLanka_-1989TT	
L11438_-SriLanka_-1991TT	
L11439_-Tahiti_-1965	..AAC	..T	..GC	
L11440_-Tailandia_-1962TT	
L11441_-Tailandia_-1986C	..G	
L11442_-Tailandia_-1987C	..G	
L11619_-Tahiti_-1989	A.AC	..A	
L11620_-Tailandia_-1973C	..G	
L11435_-Samoa_-1986TATCC	

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	GGA	GAC	AAA	GCC	CTG	AAA	ATC	AAC	TGG	TAC	AGG	AAG	GGA	AGC	TCG	ATT	GGG	AAG	ATG	TTC	GAG	GCC	ACT	GCC	AGA	GGT
AM2394-BR-2002C	...	T..T	..A	..AT
be170617-BR-2002C	...	T..T	..A	..AT
BEL73318-BR-2003C	...	T..T	..A	..AT
CEA4739-BR-2002C	...	T..T	..A	..AT
GOI099-BR-2003C	...	T..T	..A	..AT
GOI100-BR-2003C	...	T..T	..A	..AT
MTO3103-BR-2001C	..T	T..T	..A	..ATA
RGN576-BR-2003C	...	T..T	..A	..AT
ror3832-BR-2002C	...	T..T	..A	..AT
ROR3845-BR-2002C	...	T..T	..A	..AT
AB189126_-Indonesia-1998	T..TA
AB189127-Indonesia-1998	T..TA
AY038605-RJ-BR-2001C	...	T..T	..A	..AT
AY679147-RJ-BRT
L11433_-Porto_Rico_-1963	T..	..G	..TT
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984C	...	T..T	..A
L11425_-Indonesia_-1973	T..AT
L11426_-Indonesia_-1978	T..A
L11427_-Indonesia_-1978	T..AA
L11428_-Indonesia_-1985	T..A
L11429_-Malasia_-1974	T..A
L11430_-Mocambique_-1985C	..T	T..A	..AT
L11431_-SriLanka_-1981C	...	T..A
L11432_-Filipinas_-1983	T..TT	..A
L11422_-Fiji_-1992	T..A	..A
L11436_-SriLanka_-1985C	...	T..A
L11437_-SriLanka_-1989C	...	T..AT
L11438_-SriLanka_-1991C	...	T..AT
L11439_-Tahiti_-1965	T..	..G	..TAT
L11440_-Tailandia_-1962	T..TA	..A
L11441_-Tailandia_-1986	T..TAA
L11442_-Tailandia_-1987	T..TA
L11619_-Tahiti_-1989	T..A
L11620_-Tailandia_-1973	T..TA
L11435_-Samoa_-1986C	...	T..A

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	GCA	AGG	CGC	ATG	GCC	ATC	TTG	GGA	GAC	ACA	GCC	TGG	GAC	TTT	GGA	TCA	GTG	GGT	GGT	GTT	TTG	AAT	TCA	TTA	GGG	AAA
AM2394-BR-2002T	C..	..CC	...
be170617-BR-2002	C..T	C..	..CC	...
BEL73318-BR-2003	C..T	C..	..CC	...
CEA4739-BR-2002T	C..	..CC	...
GOI099-BR-2003	C..T	C..	..CC	...
GOI100-BR-2003T	C..	..CC	...
MTO3103-BR-2001T	C..	..CC	...
RGN576-BR-2003T	C..	..CC	...
ror3832-BR-2002T	C..	..CC	...
ROR3845-BR-2002T	C..	..CC	...
AB189126_-Indonesia-1998AA	C..
AB189127-Indonesia-1998AA	C..
AY038605-RJ-BR-2001T	C..	..CC	...
AY679147-RJ-BRT	C..	..CC	...
L11433_-Porto_Rico_-1963TGGCT	..A	...
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984	C..	..CC	...
L11425_-Indonesia_-1973AAA	...
L11426_-Indonesia_-1978AAA	...
L11427_-Indonesia_-1978	..GCAAA	...
L11428_-Indonesia_-1985AA
L11429_-Malasia_-1974AAA	...
L11430_-Mocambique_-1985T	C..	..CC	...
L11431_-SriLanka_-1981	C..	..CC	...
L11432_-Filipinas_-1983T	...	C..AA
L11422_-Fiji_-1992AAA	G..
L11436_-SriLanka_-1985	C..	..CG	..C	...
L11437_-SriLanka_-1989T	C..	..CC	...
L11438_-SriLanka_-1991T	C..	..CC	...
L11439_-Tahiti_-1965TGCCT	..A	...
L11440_-Tailandia_-1962A	C..
L11441_-Tailandia_-1986	C..
L11442_-Tailandia_-1987	C..A
L11619_-Tahiti_-1989AAA	...
L11620_-Tailandia_-1973	C..
L11435_-Samoa_-1986	C..	..CA

Continua

M93130-H87-Filipinas-1956	ATG	GTC	CAC	CAA	ATA	TTT	GGG	AGT	GCT	TAC	ACA	GCC	CTA	TTT	AGT	GGA	GTC	TCC	TGG	ATA	ATG	AAA	ATT	GGA	ATA	GGT
AM2394-BR-2002GC	..ACT	...	G..CA	
bel70617-BR-2002TC	..ACCT	...	G..A	
BEL73318-BR-2003GC	..ACT	...	G..CA	
CEA4739-BR-2002GC	..ACT	...	G..CA	
GOI099-BR-2003TC	..ACCT	...	G..A	
GOI100-BR-2003GC	..ACT	...	G..CA	
MTO3103-BR-2001GC	..ACT	...	G..CA	
RGN576-BR-2003GC	..ACT	...	G..CA	
ror3832-BR-2002GC	..ACT	...	G..CA	
ROR3845-BR-2002GC	..ACT	...	G..CA	
AB189126_-Indonesia-1998GAGT	
AB189127-Indonesia-1998GAGT	
AY038605-RJ-BR-2001GC	..ACT	...	G..CA	
AY679147-RJ-BRGC	..ACT	...	G..CA	
L11433_-Porto_Rico_-1963GCT	..TCT	..TC	
L11423_-Filipinas_-1956	
L11424_-India_-1984GACT	...	G..G	
L11425_-Indonesia_-1973GA	
L11426_-Indonesia_-1978GA	
L11427_-Indonesia_-1978GAA	
L11428_-Indonesia_-1985GAG	
L11429_-Malasia_-1974GAG	
L11430_-Mocambique_-1985GC	..ACT	...	G..G	
L11431_-SriLanka_-1981GACT	...	G..G	
L11432_-Filipinas_-1983GAT	
L11422_-Fiji_-1992GA	
L11436_-SriLanka_-1985GACT	...	G..G	
L11437_-SriLanka_-1989GC	..ACT	...	G..G	
L11438_-SriLanka_-1991GC	..ACT	...	G..G	
L11439_-Tahiti_-1965GCT	..TCT	..T	
L11440_-Tailandia_-1962GAT	
L11441_-Tailandia_-1986GC	..AGA	
L11442_-Tailandia_-1987GC	..AGA	
L11619_-Tahiti_-1989GA	
L11620_-Tailandia_-1973GAGA	
L11435_-Samoa_-1986GAGT	..T	...	G..G	

Continua

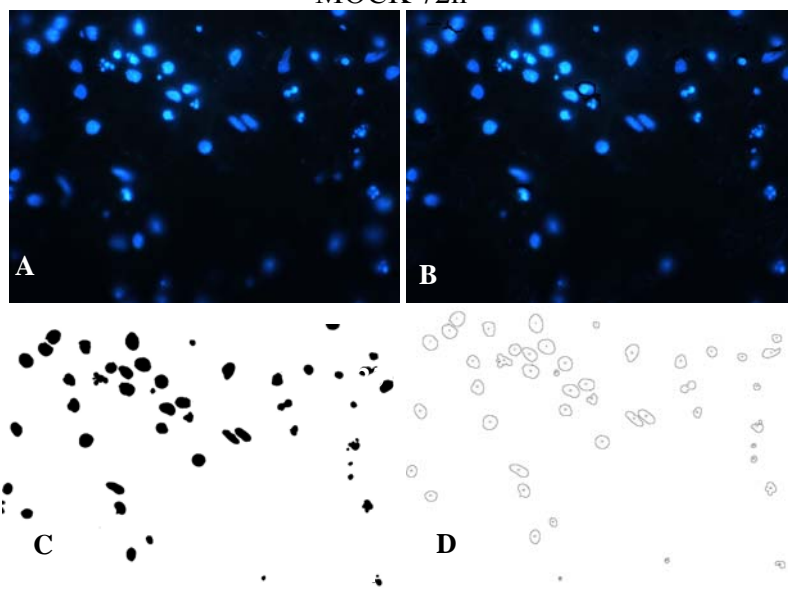
M93130-H87-Filipinas-1956	GTC	CTC	TTA	ACC	TGG	ATA	GGG	TTG	AAT	TCA	AAA	AAC	ACT	TCT	ATG	TCA	TTT	TCA	TGC	ATT	GCG	ATA	GGA	ATC	ATT	ACA
AM2394-BR-2002	..TG	..TA	..C
bel70617-BR-2002	..TG	..TA	..C
BEL73318-BR-2003	..TG	..TA	..C
CEA4739-BR-2002	..TG	..TA	..C
GOI099-BR-2003	..TG	..TA	..C
GOI100-BR-2003	..TG	..TA	..C
MTO3103-BR-2001	..TG	..TA	..C
RGN576-BR-2003	..TG	..TA	..C
ror3832-BR-2002	..TG	..TA	..C
ROR3845-BR-2002	..TG	..TA	..C
AB189126_-Indonesia-1998TTTC	...
AB189127-Indonesia-1998TTGTC	...
AY038605-RJ-BR-2001	..TG	..TA	..C
AY679147-RJ-BR	..TG	..TA	..C
L11433_-Porto_Rico_-1963	A..TTCCT
L11423_-Filipinas_-1956
L11424_-India_-1984G	..TA	..C
L11425_-Indonesia_-1973TT
L11426_-Indonesia_-1978TT
L11427_-Indonesia_-1978TT
L11428_-Indonesia_-1985TC	...
L11429_-Malasia_-1974TT
L11430_-Mocambique_-1985	..TG	..TA	..CT
L11431_-SriLanka_-1981G	..TA	..C
L11432_-Filipinas_-1983TT
L11422_-Fiji_-1992TT
L11436_-SriLanka_-1985G	..TA	..C
L11437_-SriLanka_-1989	..TG	..TCA	..C
L11438_-SriLanka_-1991	..TG	..TCA	..C
L11439_-Tahiti_-1965	A..TTCCT
L11440_-Tailandia_-1962TCT
L11441_-Tailandia_-1986	G..CT
L11442_-Tailandia_-1987CT
L11619_-Tahiti_-1989T	G..T
L11620_-Tailandia_-1973CTT
L11435_-Samoa_-1986G	..TA	..CT

Continua

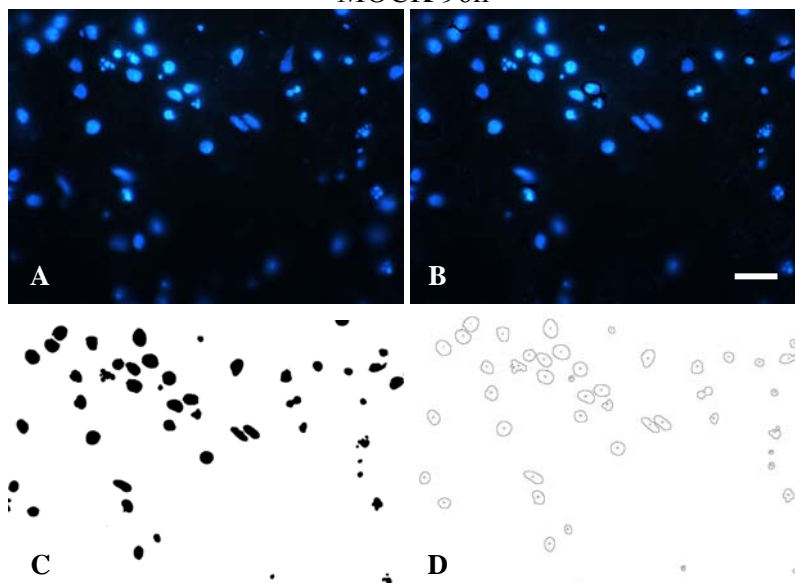
M93130-H87-Filipinas-1956	CTC	TAT	CTG	GGG	GTC	GTG	GTG	CAA	GCT	?
AM2394-BR-2002A	.CTA	?
bel70617-BR-2002A	.CT	?
BEL73318-BR-2003A	.CT	?
CEA4739-BR-2002A	.CT	G
GOI099-BR-2003A	.CT	?
GOI100-BR-2003A	.CT	?
MTO3103-BR-2001A	.CT	?
RGN576-BR-2003A	.CT	G
ror3832-BR-2002A	.CT	?
ROR3845-BR-2002A	.CT	?
AB189126_-_Indonesia-1998A	.C.	?
AB189127-Indonesia-1998A	.C.	?
AY038605-RJ-BR-2001A	.CT	?
AY679147-RJ-BRA	.CT	?
L11433_-_Porto_Rico_-_1963A	..A	.CTG	...	?
L11423_-_Filipinas_-_1956A	?
L11424_-_India_-_1984A	.CTA	?
L11425_-_Indonesia_-_1973A	.C.	?
L11426_-_Indonesia_-_1978A	.C.	?
L11427_-_Indonesia_-_1978A	.C.	?
L11428_-_Indonesia_-_1985A	.C.	?
L11429_-_Malasia_-_1974A	.C.	?
L11430_-_Mocambique_-_1985A	.CTA	?
L11431_-_SriLanka_-_1981A	.C.CA	?
L11432_-_Filipinas_-_1983A	.C.	?
L11422_-_Fiji_-_1992A	.C.	?
L11436_-_SriLanka_-_1985A	.C.A	?
L11437_-_SriLanka_-_1989A	.CTA	?
L11438_-_SriLanka_-_1991A	.CTA	?
L11439_-_Tahiti_-_1965A	..A	.CTG	...	?
L11440_-_Tailandia_-_1962	T..	..A	.C.A	?
L11441_-_Tailandia_-_1986A	.C.A	?
L11442_-_Tailandia_-_1987A	.C.A	?
L11619_-_Tahiti_-_1989A	.C.	?
L11620_-_Tailandia_-_1973A	.C.A	?
L11435_-_Samoa_-_1986A	.C.A	?

APÊNDICE 04

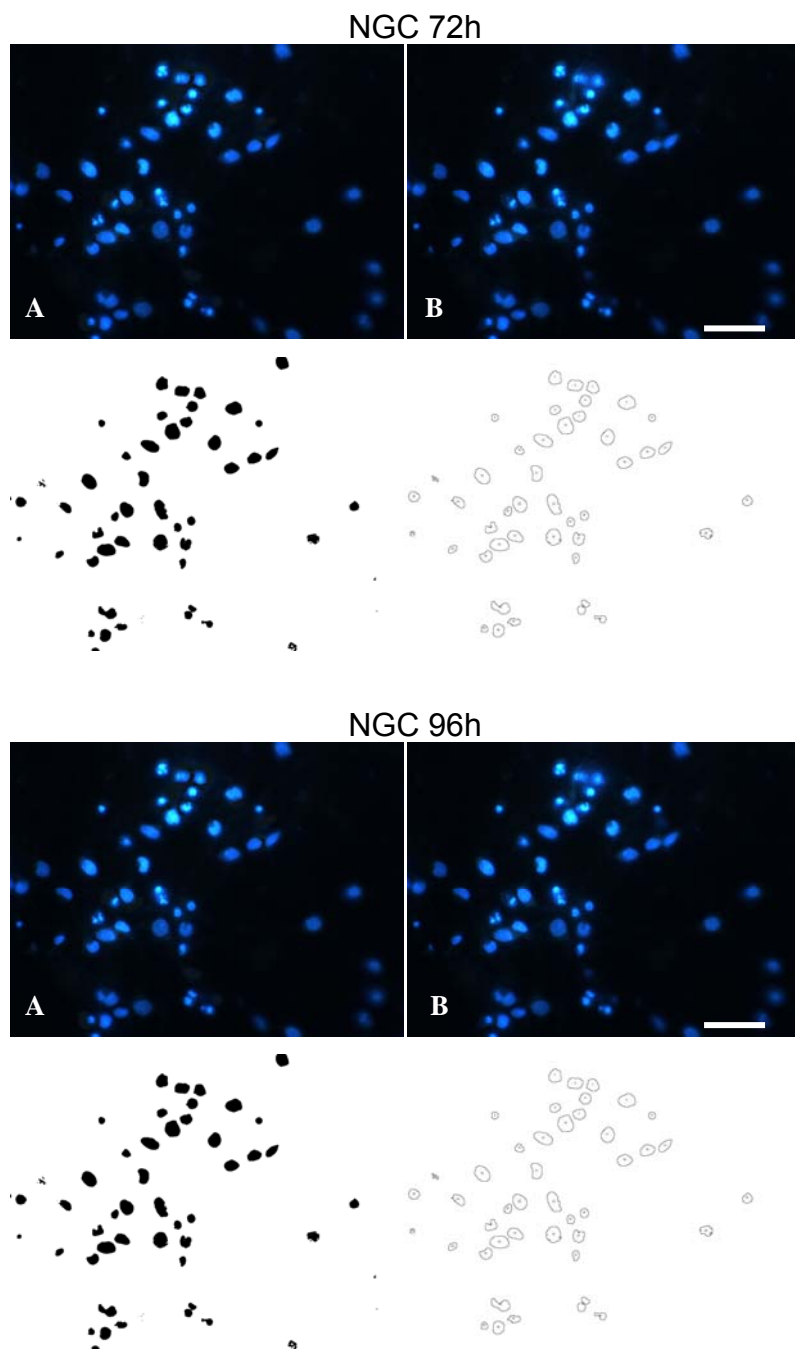
MOCK 72h



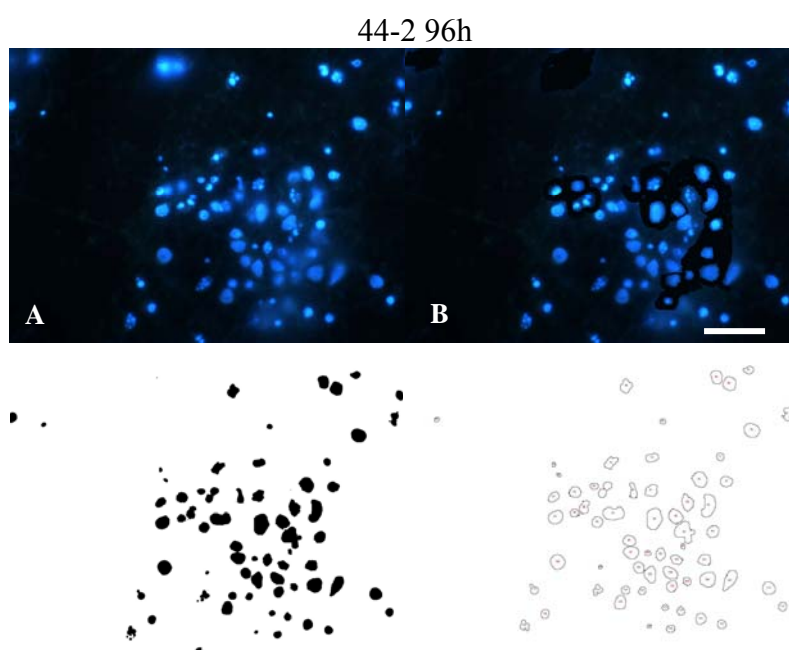
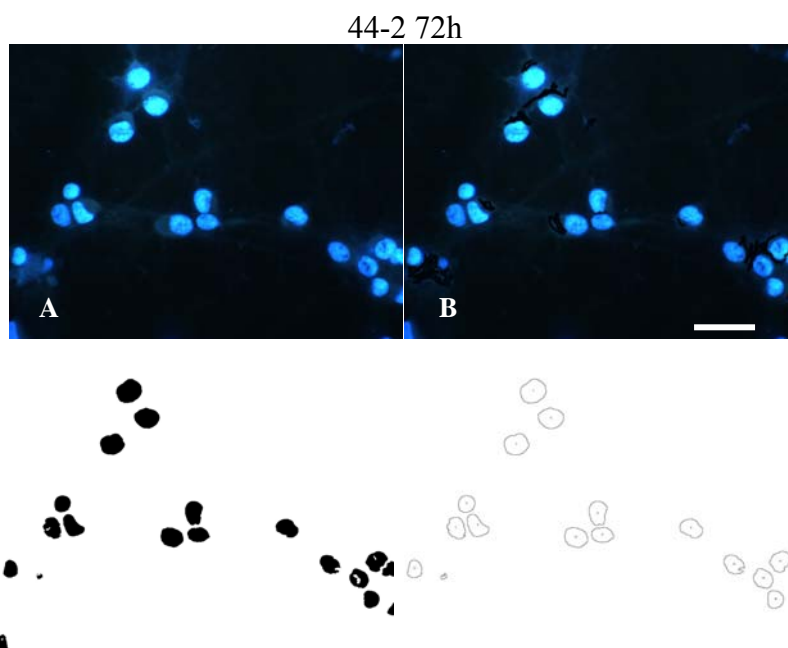
MOCK 96h



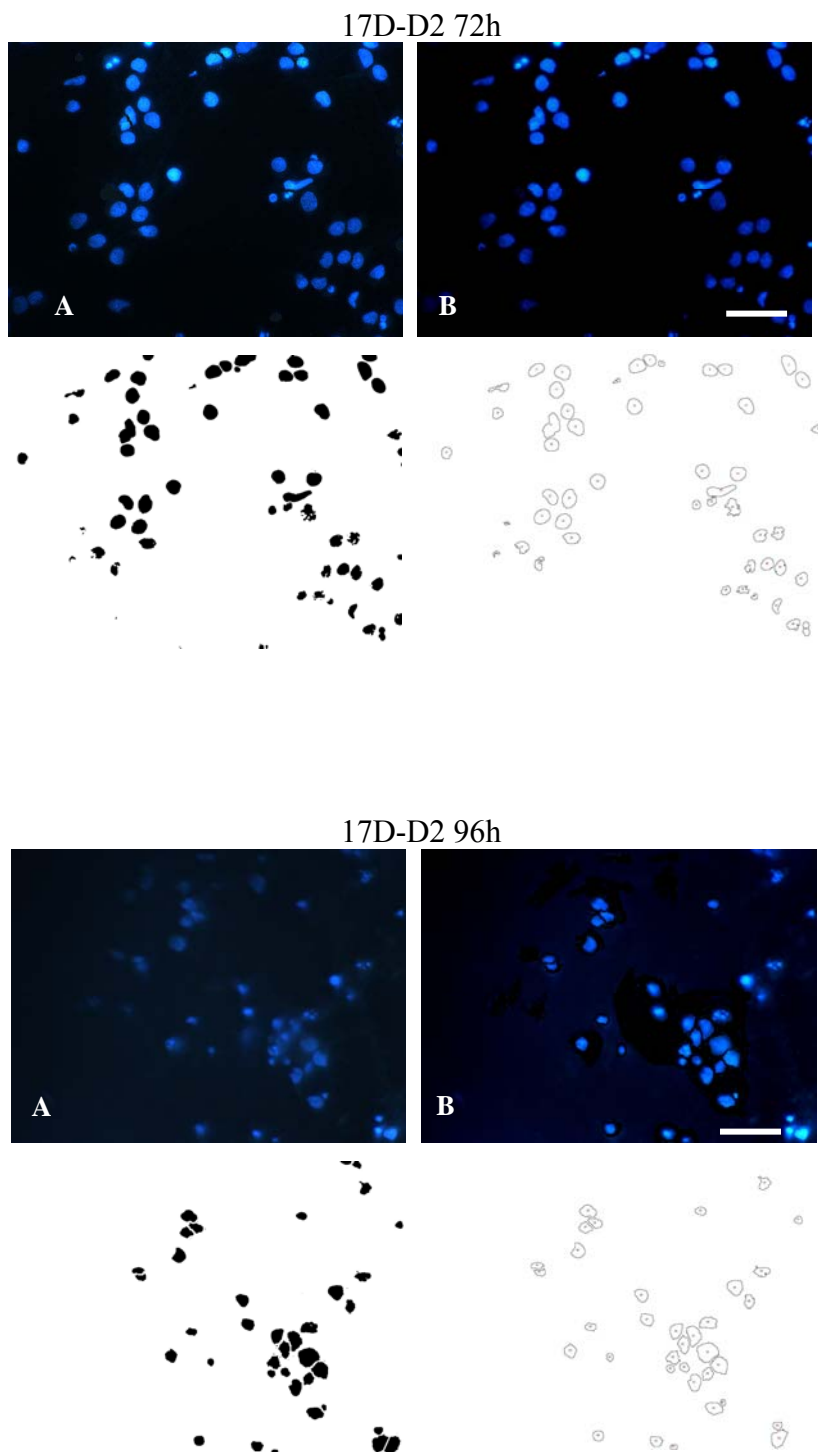
Fotomicrografia dos núcleos marcados com DAPI de células neuronais não infectadas e detecção dos núcleos por análise computacional. A) Núcleos sem tratamento da imagem; B) Núcleos após tratamento da imagem; c) Definição dos núcleos; D) Núcleos medidos. Barra= 25 μ m.



Fotomicrografia dos núcleos marcados com DAPI de células neuronais infectadas com vírus VDEN2 NGC e detecção dos núcleos por análise computacional. A) Núcleos sem tratamento da imagem; B) Núcleos após tratamento da imagem; c) Definição dos núcleos; D) Núcleos medidos. Barra= 25 μm .

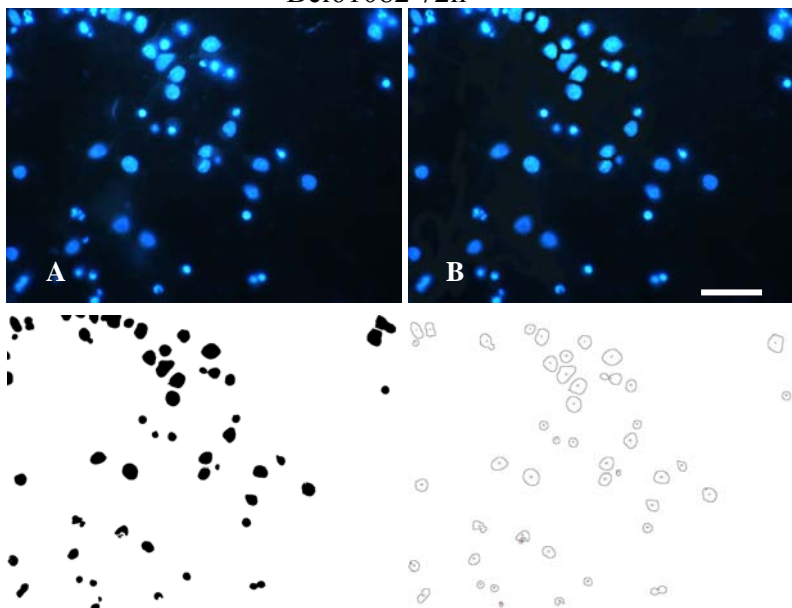


Fotomicrografia dos núcleos marcados com DAPI de células neuronais infectadas com vírus VDEN2 44-2 e detecção dos núcleos por análise computacional. A) Núcleos sem tratamento da imagem; B) Núcleos após tratamento da imagem; C) Definição dos núcleos; D) Núcleos medidos. Barra= 25 μm .

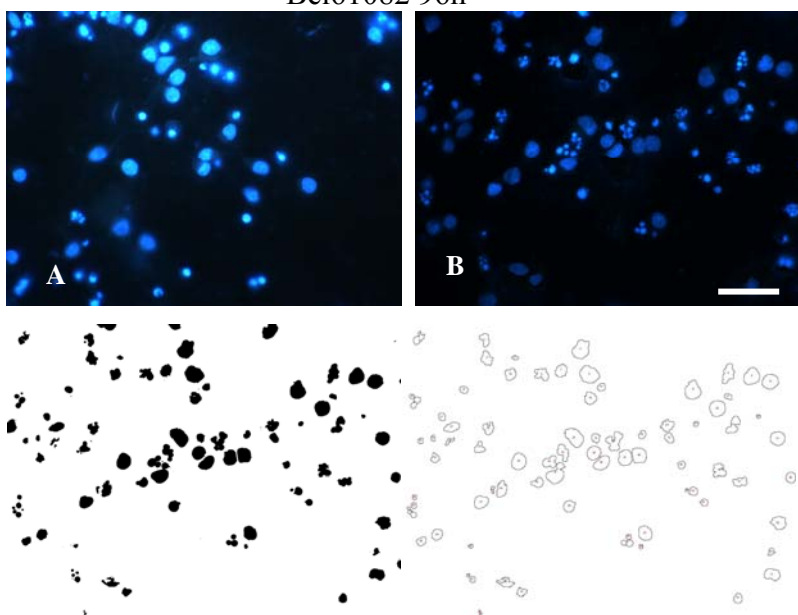


Fotomicrografia dos núcleos marcados com DAPI de células neuronais infectadas com vírus quimérico 17D-D2 e detecção dos núcleos por análise computacional. A) Núcleos sem tratamento da imagem; B) Núcleos após tratamento da imagem; C) Definição dos núcleos; D) Núcleos medidos. Barra= 25 μ m.

Bel61082 72h



Bel61082 96h



Fotomicrografia dos núcleos marcados com DAPI de células neuronais infectadas com vírus VDEN2 Bel61082 e detecção dos núcleos por análise computacional. A) Núcleos sem tratamento da imagem; B) Núcleos após tratamento da imagem; c) Definição dos núcleos; D) Núcleos medidos. Barra= 25 μm .

APÊNDICE 05

Detection of Dengue virus serotype 3 by RT-PCR in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus-Amazonas

^{1,2}Valéria CS Pinheiro, ²Wanderli P Tadei, ³Patrícia MSS Barros, ³Pedro FC Vasconcelos, ³**Ana Cecília R Cruz.**

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas.

²Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias, Maranhão.

³ Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará.

Financial support: CNPq-PNOPG/INPA-MCT/SUSAM

Corresponding author. Fax: 55 92 642-3435 643-3364. E-mail: valeria@cesc.uema.br