

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Levantamento bibliográfico sobre análises genético-compartivas de sequências nucleotídicas do *Dengue virus 2 e 3* e identificação de possíveis correlações com a virulência e patogenicidade.

Daniela Lima Magalhães

Belo Horizonte

2011

Daniela Lima Magalhães

Levantamento bibliográfico sobre análises genético-compartivas de sequências nucleotídicas do *Dengue virus 2 e 3* e identificação de possíveis correlações com a virulência e patogenicidade.

Monografia apresentada como conclusão do curso de Especialização em Microbiologia.

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca
Co-orientador(a): Fabiana Magalhães Coelho

**Belo Horizonte
2011**

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela oportunidade e pela proteção;

Ao Flávio e a Fabiana pela paciência, orientação, e pela oportunidade de realizar este trabalho;

Aos meus pais pelo apoio incondicional;

Fernando e Felipe, irmãos sempre presentes, obrigada pelo carinho e companhia;

Ao João, por compartilhar comigo todos os passos dessa monografia, obrigada pelas idéias, pela ajuda nas horas complicadas, pela paciência, mas principalmente pelo carinho e pela companhia enriquecedora;

Aos amigos da especialização, agradeço a amizade, a troca de experiências, e os momentos de descontração ao longo de todo o ano;

Por fim, obrigada a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho!

A palavra mágica

*Certa palavra dorme na sombra
de um livro raro.
Como desencantá-la?
É a senha da vida
a senha do mundo.
Vou procurá-la.*

*Vou procurá-la a vida inteira
no mundo todo.
Se tarda o encontro, se não a encontro,
não desanimo,
procuro sempre.*

*Procuro sempre, e minha procura
ficará sendo
minha palavra.*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

A dengue é a principal arbovirose tropical transmitida ao homem por meio da picada das fêmeas de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, doença de extrema importância para a saúde pública devido às epidemias observadas em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e Américas onde o vetor encontra-se amplamente disseminado. O *Dengue virus* pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, designados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, subdivididos em genótipos. A doença caracteriza-se por manifestações que variam desde uma febre indiferenciada (FD) até a febre hemorrágica da dengue (FHD), que pode evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) e morte. O(s) mecanismo(s) pelo qual o DENV pode causar doença grave e a contribuição de fatores virais e do hospedeiro para o desenvolvimento dos quadros clínicos severos, não está completamente compreendido. Neste trabalho de revisão, foram investigados os sorotipos e genótipos do *Dengue virus* que estão correlacionados com possíveis implicações na patogenicidade da doença, procurando identificar a presença de alguns marcadores genéticos de virulência. As substituições de aminoácidos dentro de regiões codificadoras que possam interferir na antigenicidade ou ligação celular, e as mudanças de nucleotídeos dentro das regiões não-codificadoras podem interferir na estrutura secundária do ácido nucléico ou da proteína, e assim a replicação pode ser o determinante viral de doença grave em humanos. Apesar do avanço no conhecimento da estrutura viral assim como da dinâmica da biologia do vírus da dengue, a patogenia continua sendo um grande desafio, principalmente devido à interposição de fatores virais e do hospedeiro. Considerando que o aumento de casos de FHD pode estar diretamente relacionado ao aparecimento de amostras mais virulentas, é importante que se conheça as seqüências genéticas de isolados virais associados a infecções mais graves, mapeando-se as mutações que possam eventualmente estar implicadas nos casos severos de dengue. Tal enfoque pode, portanto, contribuir para o conhecimento sobre a patogênese da dengue e direcionar pesquisas para o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas.

ABSTRACT

Dengue fever, the main arboviral infection transmitted to humans through the bite of hematophagous female mosquitoes from the genus *Aedes*, is one of the most important disease for the public health.. Te importance is due to the observed explosive epidemic patterns in tropical and sub-tropical areas of the globe, where the mosquito vector is widely disseminated. The four antigenically distinct serotypes of dengue fever viruses designated DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4, belong to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*. The precise mechanism(s) by which DEN viruses cause severe disease is still not understood. It has been inferred that both immunological and viral factors determine the severity of disease. In this review article, we investigated the serotypes and genotypes of dengue virus that are correlated with possible implications in the pathogenesis of the disease, identifying the presence of genetic markers of virulence. Amino acid substitutions within coding regions, which may interfere with the antigenicity or cell-virus connection, and the nucleotide changes within the noncoding regions, secondary structure and dynamics of the biology of dengue virus pathogenesis remains a major challenge, mainly due to the interposition of viral and host factors. Whereas the increasing number of cases of DHF can be directly related to the emergence of more virulent samples, it is important to know the genetic sequences of viral isolates associated with infections of greater virulence, mapping to the mutations that may eventually be implicated in serious cases dengue. This approach may therefore contribute to knowledge about the pathogenesis of dengue directing research for the development of antiviral drugs and vaccines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número médio anual de casos de dengue clássico/febre hemorrágica do dengue, ocorridos no mundo.	16
Figura 2- Estimativa do risco de dengue no território nacional para 2011.	20
Figura 3- Imagem do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 4- Distribuição Global do mosquito vetor da dengue.	23
Figura 5- Representações esquemáticas da estrutura da partícula do vírus da dengue.	30
Figura 6- Representação esquemática da organização estrutural e funcional do genoma do vírus da dengue.	33
Figura 7- Representação esquemática do ciclo de multiplicação do vírus da dengue.	36
Figura 8- Modelo para amplificação dependente de anticorpos da replicação do vírus da dengue.	38
Figura 9- Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da região 3'NC, de 15 amostras de DENV-3, genótipo III.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição do Isolamento de Dengue por Unidade Federada 2010.	18
Tabela 2- Resumo das mudanças de aminoácidos entre amostras de vírus do Sudeste Asiático e de vírus de genótipo Americano.	41
Tabela 3- Resumo das diferenças nas seqüências de aminoácidos entre todos os oito DENV-2 isolados.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A-Alanina

ADE - Aumento da infecção mediada por anticorpos (*antibody dependent enhancement*)

Asn - Asparagina

Asp - Aspartato

C - Capsídeo

C- Cisteína

CD- Célula Dendrítica

cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar

D- Asparatato

DC - Dengue Clássica

DC-SIGN - Recptores de membrana tipo C (ligante de ICAM-3 específico de células dendríticas)

DENV- *Dengue virus*

DENV1- *Dengue virus 1*

DENV2- *Dengue virus 2*

DENV3- *Dengue virus 3*

DENV4- *Dengue virus 4*

DNA- Ácido desoxirribonucléico

E - Envelope

E- Glutamato

F- Fenilalanina

FD - Febre de dengue

FHD - Febre hemorrágica de dengue

G- Glicina

Gln - Glutamina

Glu - Glutamato

Gly - Glicina

H- Histitina

His - Histina

ICAM-3 - Intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin

ICTV- Comitê internacional de taxonomia de vírus

Fc - Porção do anticorpo

I- Isoleucina

IFN - Interferon

IL - Interleucina

Ile - Isoleucina

JEV- Vírus da encefalite japonesa

K- Lisina

Kda- kilodalton

L- Leucina

Leu - Leucina

Lys - Lisina

M - Membrana

M- Metionina

Met - Metionina

mRNA- Ácido ribonucléico mensageiro

MS - Ministério da Saúde

MVV- *Murray Valey Virus*

N- Asparagina

NC - Não codificadora

NS - Não-estrutural

Nt- nucleotídeo

OMS- Organização Mundial da Saúde

ORF- janela aberta de leitura (*open reading frame*)

P- Prolina

Phe- Fenilalanina

prM - Precursora de membrana

Pro - Prolina

Q- Glutamina

R- Arginina

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RER- Retículo endoplasmático rugoso

RNA - Ácido ribonucléico

RTPase- RNA 5'-trifosfatase

SCD- Síndrome do choque da dengue

S- serina

Ser- Serina

SL - Estrutura em forma de grampo de cabelo (*stem-loop*)

TBEV - Vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*tick-borne encephalitis vírus*)

T- Treonina

Thr - Treonina

UF- Unidade federativa

V- Valina

Val - Valina

W- Triptofano

WNV- Vírus do oeste do Nilo (*West Nile vírus*)

WHO- World Health Organization

Y- Tirosina

YFV- Vírus da febre amarela (*yellow fever virus*)

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	14
1.1 Histórico da Dengue	14
1.1.1 Histórico da Dengue da América Latina e no Brasil	17
1.2 Taxonomia do vírus da Dengue	20
1.3 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão	21
1.4 Sorotipos	23
1.5 Manifestações clínicas da Dengue	25
1.5.1 Dengue Hemorrágica(FHD/SCD)	25
2.0 JUSTIFICATIVA	26
3.0 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
4.1 Estrutura e genoma do vírus da dengue	29
4.2 Multiplicação	33
4.3 Patologia e Patogenia	36
4.4 Identificação de marcadores moleculares para patogenicidade	39
5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	46
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da Dengue

Os primeiros relatos conhecidos sobre uma síndrome semelhante à dengue foram encontrados na literatura chinesa durante as Dinastias Chin (265-420 a.C.), Tang (610 a.C.) e Northern Sung (992 a.C.) (GUBLER, 1998). Esses estudos descreviam uma doença chamada "água envenenada", devido a sua relação com "insetos voadores associados à água". A descrição clínica incluía febre, exantema, artralgia, mialgia e manifestações hemorrágicas. Novos relatos de uma doença não identificada, mas semelhante à dengue, apareceram no século XVII, no Oeste da Índia e no Panamá (GUBLER, 1998). A primeira pandemia documentada ocorreu entre os anos de 1779 e 1788, acometendo a Batávia (atual Jakarta), Cairo, Filadélfia, Cadiz e Sevilha, na Espanha (VASILAKIS; WEAVER, 2009). Esta distribuição geográfica generalizada coincidiu com o aumento do comércio global que era realizado por embarcações à vela (VASILAKIS; WEAVER, 2009).

O registro histórico também indica que uma segunda série de pandemias da dengue ou de uma doença semelhante a ela, ocorreu entre 1823 e 1916, atravessando o globo, da África à Índia e da Oceania às Américas, com duração média de 3 a 7 anos. Embora seja impossível determinar qual foi o sorotipo envolvido, supõe-se que estes surtos, provavelmente, foram causados pelo mesmo

sorotipo do *Dengue virus* (DENV), transportados entre as regiões geográficas pelo comércio ilegal de escravos (GUBLER, 1998).

Uma nova relação entre seres humanos e DENV, surgiu com o início da II Guerra Mundial, que provocou intensas mudanças ecológicas, demográficas e epidemiológicas, levando ao estabelecimento de comissões científicas para estudar a doença, sua etiologia, agente e desenvolvimento de testes diagnósticos (VASILAKIS; WEAVER, 2009). Contudo, o término da II Guerra Mundial levou a uma urbanização descontrolada, em que a inadequação das habitações, dos sistemas de abastecimento e distribuição de água e esgotos permitiu ao vetor (*Aedes Aegypti*) atingir alta densidade e, assim, facilitar a dispersão dos sorotipos do DENV entre diversas regiões geográficas. As intensas transformações ecológicas e demográficas pós-guerra criaram as condições ideais para o surgimento de dengue hemorrágica no Sudeste da Ásia (VASILAKIS; WEAVER, 2009).

A primeira epidemia documentada de dengue hemorrágica ocorreu em Manila, nas Filipinas em 1950, e em 20 anos a doença se espalhou e atingiu proporções epidêmicas, disseminando-se pelo sudeste asiático para, em meados de 1970, a febre hemorrágica do dengue (FHD) se transformar na principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região (GUBLER, 1998).

Em 1970 a dengue foi re-introduzida nas Ilhas do Pacífico onde atingiu proporções epidêmicas, juntamente com as Américas. Entre 1980 e 1990, a epidemia de dengue se intensificou, com expansão da distribuição geográfica tanto do vetor quanto do vírus, aumentando a incidência e emergência da FHD em muitos países (**figura 1**) (GUBLER, 1998). Na Ásia, epidemias de FHD se expandiram do

sudeste asiático ao oeste da Índia, Sri Lanka, Maldivas, Paquistão e leste da China (GUBLER, 1998).

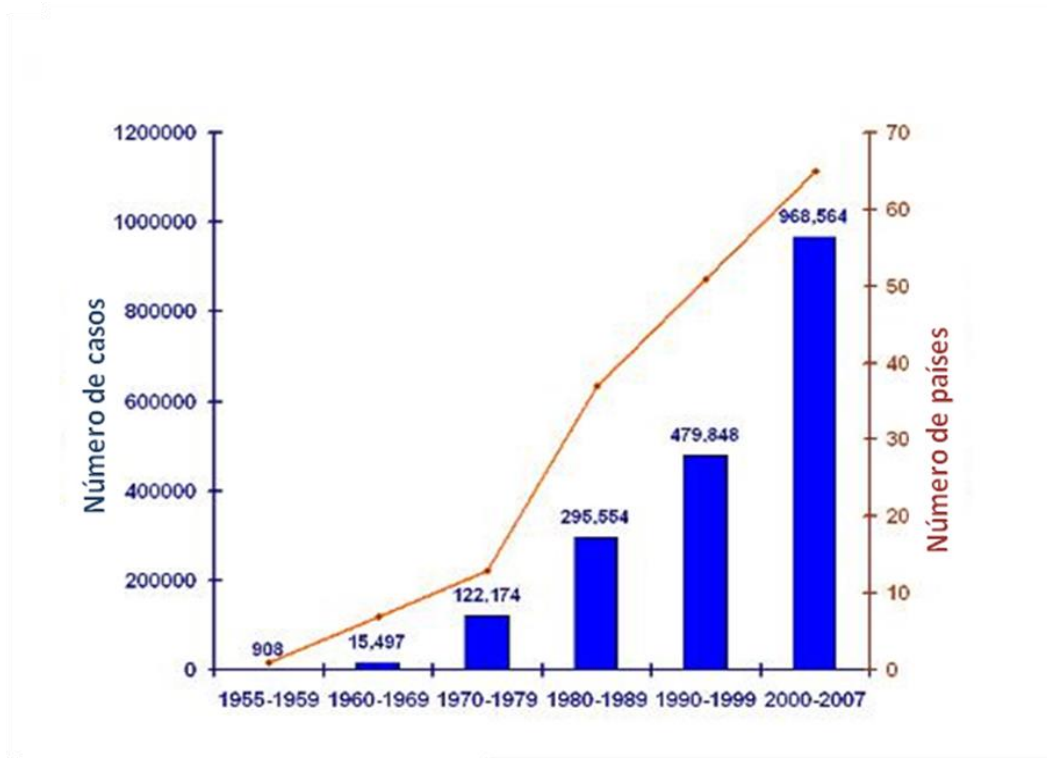


Figura 1: Número médio anual de casos de dengue clássico/ febre hemorrágica do dengue, ocorridos no mundo.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION/TDR, 2008.

Nas Américas, de 1950 até meados de 1970 o mosquito vetor foi erradicado da maior parte da América Central e do Sul (GUBLER, 1998). Os programas de erradicação foram descontinuados no início de 1970 e os vetores voltaram a ser detectados nos países dos quais tinham sido erradicados. Na década de 1980 ocorreu na região das Américas a maior epidemia de dengue em países que haviam ficado livres da doença por 35 a 130 anos (GUBLER, 1988).

1.1.1 Histórico da Dengue na América Latina e no Brasil

O *Dengue virus* sorotipo 1 (DENV-1) foi introduzido no Brasil em 1986 e o *Dengue virus* sorotipo 2 (DENV-2) em 1990, com a subsequente disseminação desses sorotipos pelo país (NOGUEIRA *et al.*, 2008). O *Dengue virus* sorotipo 3 (DENV-3) reapareceu na América Central (Nicarágua e Panamá) em 1994, após um período de 17 anos de ausência, espalhando-se para o México e Caribe (GUZMAN; KOURI, 1996). Em 2000 a presença deste sorotipo foi descrita em dois países da América do Sul: Brasil e Venezuela (NOGUEIRA *et al.*, 2008). O DENV-3 foi inicialmente isolado em dezembro de 2000 no estado do Rio de Janeiro. Desde então, este sorotipo tem sido detectado em quase todos os estados brasileiros, estabelecendo condições de hiperendemicidade com os outros sorotipos (DENV-1 e 2) circulantes. O genótipo III e V (Sri Lanka/Índia) do DENV-3 foi identificado em quase todos os Estados do Brasil envolvidos durante as epidemias de 2001-2004, originando uma das epidemias com o maior número de casos, maior gravidade, manifestações clínicas primárias, e maior número de mortes (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Segundo dados do Ministério da Saúde, o sorotipo 3 do vírus da dengue predominou na grande maioria dos estados do Brasil entre 2002 e 2006. No período entre 2007 e 2009, foi observada uma alteração no sorotipo predominante, com a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Essa alteração levou a ocorrência de epidemias em diversas unidades federais, com um deslocamento de casos graves para menores de 15 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O monitoramento de sorotipos circulantes ao longo de 2009 apontou para uma nova mudança no sorotipo predominante, com uma recirculação importante do

DENV-1 que passou a ser o sorotipo predominante, inicialmente, nos Estados de Roraima (desde 2008), Mato Grosso do Sul e Piauí. A recirculação do DENV-1 alerta para a possibilidade de grande circulação desse sorotipo nos estados, onde a população não esteve em contato com o vírus desde o início da década (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Segundo o informe epidemiológico da Dengue, até a 26ª semana de 2010, o DENV-1 predomina em todos os estados da federação, exceto no Nordeste (**Tabela 1**). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

UF	Isolados	Positivos		DENV-1	DENV-2	DENV-3
		n	%			
Brasil	10840	2948	27,2	2088	766	94
Norte	1249	175	14	116	59	0
Nordeste	2316	361	15,6	154	201	6
Sudeste	3634	1165	32,1	795	311	59
Sul	430	208	48,4	144	64	0
Centro-Oeste	3211	1039	32,4	879	131	29

Tabela 1- Distribuição do Isolamento dos sorotipos de Dengue por Unidade Federada 2010*

Fonte: Ministério da Saúde, 2010.

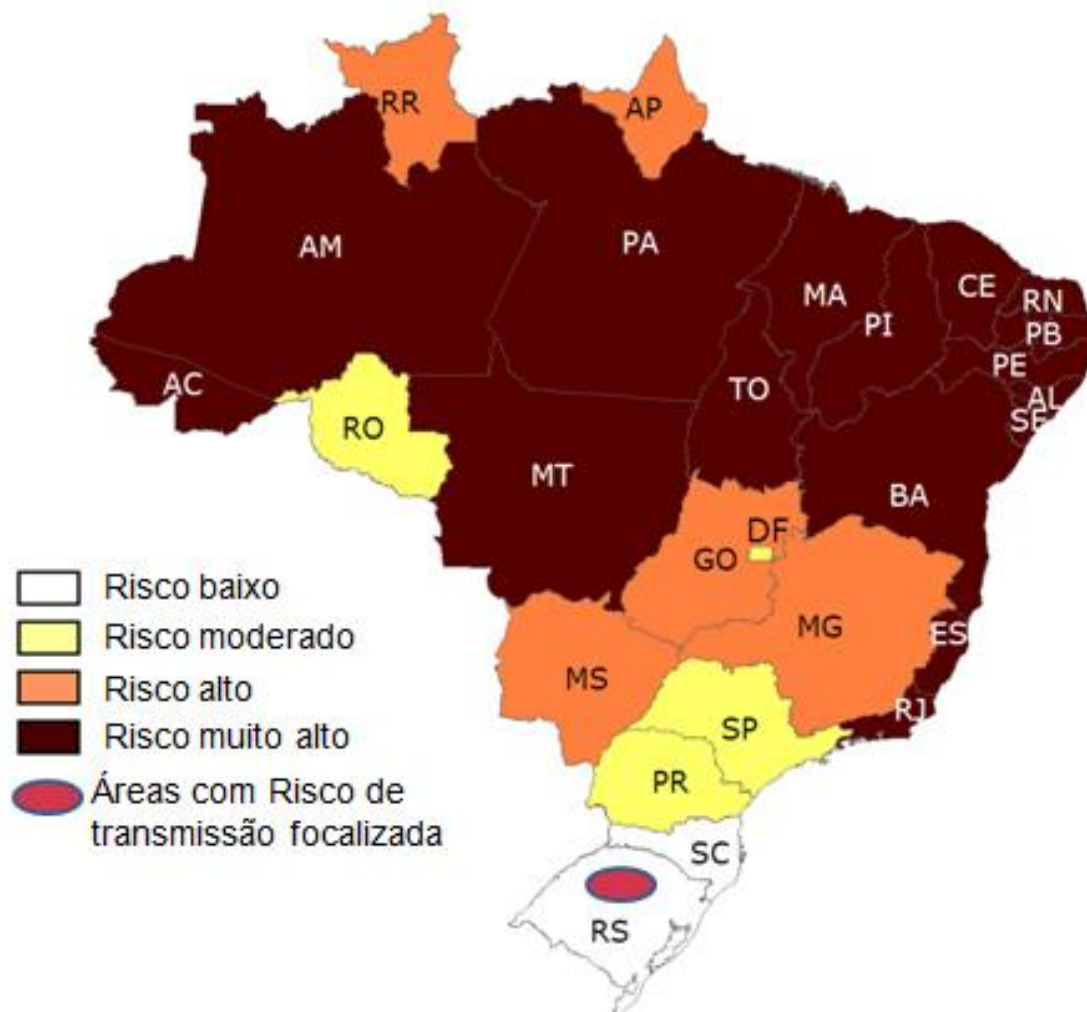
*Dados parciais até a semana epidemiológica 26

Já foi comprovado que o *Dengue virus* sorotipo 4 (DENV-4) já esteja presente em território brasileiro, como detectado em amostras analisadas de três pacientes residentes em Manaus (FIGUEIREDO et al., 2008) e em 10 pacientes residentes em Roraima (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O Sorotipo DENV-4 não circulava no Brasil há 28 anos. Foi constatado, por meio do seqüenciamento do genoma viral de um caso índice (autóctone), responsável pela reintrodução desse sorotipo no Brasil,

que esse vírus é procedente da Venezuela, onde o DENV-4 circula de forma endêmica há muitos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

As atividades de monitoramento da circulação do vírus da dengue em 2010, no país, demonstram a circulação dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em 2010, estados da federação, como Rondônia, Acre, Tocantins, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal obtiveram maior proporção de isolamentos do sorotipo DENV-1. Tal aspecto pode ter como consequência direta alterações importantes na situação epidemiológica dos estados com ocorrência de epidemias ao exemplo de Rondônia, Acre, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal (**figura 2**). Os Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Amapá e Bahia já mostraram alteração no padrão da circulação viral, com aumento de isolamentos positivos para o sorotipo DENV-1. Tal fato, reforça a necessidade de alerta do sistema de vigilância para um possível aumento de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Em Minas Gerais, no ano de 2010, foram confirmados 214.552 casos de dengue, destes, 185 foram caracterizados como FHD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Em 2011, a Secretaria do Estado de Minas Gerais confirmou a reintrodução do sorotipo DENV-4 em seu território. Esta reintrodução deixa susceptível a infecção parte da população com menos de 30 anos, pois esse sorotipo não circulava no Estado há mais de 30 anos. (SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2013).



OBS 1: O mapa não considera a dispersão do DEN-4 para outros estados
OBS 2: SC nunca teve transmissão autóctone de dengue

Figura 2 – Estimativa do risco de dengue no território nacional para 2011.

Fonte: Ministério da Saúde, 2010

1.2 Taxonomia do *Dengue virus*

O *Dengue virus* pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Esta família inclui também os gêneros *Pestivirus* e *Hepacivirus* (LEYSSSEN, CLERCQ e NEYTS, 2000). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2009 - <http://www.ictvonline.org/>), a família *Flaviviridae* está entre as famílias de vírus que não possuem uma ordem atribuída à ela. Representantes do gênero *Flavivirus*, além

do *Dengue virus* (DENV), são o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV). Esse gênero é constituído por mais de 70 vírus e apresentam grande importância clínica uma vez que possuem representantes que causam doenças humanas como a Febre Amarela e a Dengue (LEYSSSEN, CLERCQ e NEYTS, 2000).

A maioria dos *Flavivirus* patogênicos aos humanos é transmitida por vetores artrópodes, carrapatos e mosquitos, e por esta razão estes vírus são também denominados arbovírus (LEYSSSEN, CLERCQ e NEYTS, 2000).

1.3 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão

Os primeiros relatos da dengue coincidem com o período de expansão geográfica do mosquito hematófago, *Aedes aegypti*, da África para os trópicos. O *A. aegypti* (**figura 3**) é o principal vetor envolvido na transmissão urbana do vírus da dengue ao hospedeiro humano (GUBLER, 1998). As características antropofílicas, o habitat urbano doméstico e a alta eficiência na transmissão do vírus da dengue, tornam o *A. aegypti* um agente altamente competente para a disseminação da doença em ambientes urbanos e peri-urbanos. As espécies *A. albopictus* e o *A. polynesiensis* também podem sustentar a transmissão do vírus da dengue ao hospedeiro humano (GUBLER, 1998).



Figura 3- Imagem do mosquito *Aedes aegypti*

Fonte: Portal da Saúde: <http://portal.saude.gov.br>

O mosquito *A. aegypti* é altamente susceptível às temperaturas extremas e climas secos e encontra-se amplamente disseminado entre os limites de latitude 40°N e 40°S, oferecendo um grande risco de novas epidemias para as populações residentes nessas áreas (**figura 4**) (MACKENZIE et al., 2004).

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas adultas de mosquitos do gênero *Aedes* transmitem o *Dengue virus* ao hospedeiro humano. O ciclo de transmissão envolve a ingestão de sangue virêmico (partículas virais circulantes no sangue periférico) pelo mosquito vetor e após um período de incubação extrínseco ocorre a transferência do vírus ao hospedeiro vertebrado (GUBLER, 1998). O período de incubação extrínseco no vetor dura de 8 a 12 dias e é necessário para que ocorra a replicação e disseminação viral na hemocele e em todos os tecidos do inseto, até finalmente infectar as glândulas salivares e poder transmitir o vírus para um novo hospedeiro humano susceptível. O mosquito permanece infectado e assintomático durante toda sua vida e é capaz de transmitir o *Dengue virus* para diversas pessoas, devido a sua capacidade de se alimentar em múltiplos indivíduos em sucessão (GUBLER, 1998). Outra forma importante de transmissão entre os mosquitos do

gênero *Aedes* é a transovariana, em que o *Dengue virus* é transmitido diretamente para a prole, dispensando o homem no ciclo mantenedor (HENCHAL e PUTNAK, 1990).

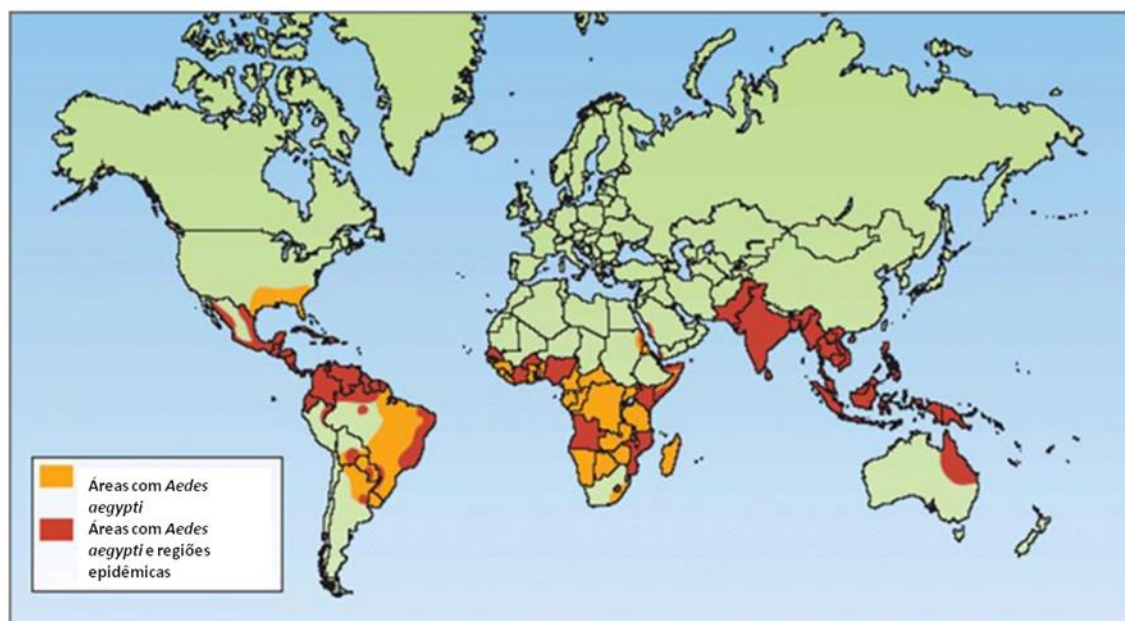


Figura 4- Distribuição Global do mosquito vetor da dengue: As áreas infectadas com o mosquito vetor da dengue estão em laranja e as áreas com dengue epidêmica estão em vermelho.
Fonte- Modificado de Mackenzie et al., 2004

O hospedeiro humano torna-se virêmico após um período de incubação de 3 a 14 dias, após a picada por um mosquito infectado, concomitante ao início do período febril (GUBLER, 1998).

1.4 Sorotipos

O agente etiológico da dengue foi isolado pela primeira vez a partir de soro humano em 1950 através de passagens seriadas em cérebro de camundongos

neonatos, na tentativa de se obter uma vacina viva atenuada contra a dengue. Dessa forma, foi possível identificar e definir os sorotipos DENV-1 (amostra Hawaii) e DENV-2 (amostra New Guinea) (SABIN; SCHLESINGER, 1945; HOTTA, 1952). No ano de 1957, durante a epidemia de dengue em Manila, Filipinas, novos sorotipos do vírus da dengue, DENV-3 e DENV-4, foram isolados (HAMMOM et al., 1960). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o *Dengue virus* está caracterizado em quatro sorotipos distintos antigenicamente: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, os quais podem apresentar variantes genéticas dentro de um mesmo sorotipo, relacionadas com a virulência e a origem geográfica da amostra (HEINZ et al. 2000; RICO-HESSE, 1990). Atualmente, nas regiões tropicais co-circulam todos os sorotipos do vírus da dengue e os quatro subtipos estão associados tanto com febre da dengue (FD) quanto com FHD.

Dentro de cada sorotipo, há considerável variação genética, possibilitando classificá-los em diferentes genótipos (HOLMES e BURCH, 2000; RICO-HESSE, 1990). Para DENV-1 e DENV-2, 5 genótipos foram descritos (RICO-HESSE, 1990); já DENV-3 e DENV-4 foram subdivididos em 4 e 2 genótipos, respectivamente (LANCIOTTI et al, 1994). Definição de genótipo foi dado pela Rico-Hesse, (1990) que definiu genótipo como grupos de vírus que apresentam uma divergência na sequência nucleotídica de no máximo 6%, dentro de uma região genômica como, por exemplo, à junção entre as proteínas de envelope (E) e Não-Estrutural 1(NS1).

1.5 Manifestações clínicas da Dengue

A dengue clássica (DC) caracteriza-se por febre de início súbito e sintomas não específicos como dor de cabeça, dor retro-orbital, náuseas, vômito, fraqueza, artralgia, mialgia e exantema (GUBLER, 1998). Anorexia, alteração de paladar e sudorese podem também ser observadas (GUBLER, 1998). A febre pode chegar a 39-40 °C, permanecer por dois a sete dias ou apresentar um curso bifásico 12 a 24 horas depois do primeiro pico (desfervescência) As alterações típicas nos exames de laboratório são baixa contagem de leucócitos caracterizando-se por uma granulocitopenia e plaquetopenia (contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³ (GUBLER, 1998). A doença, com estas características, tende a evoluir para cura espontânea na grande maioria dos casos.

1.5.1 Dengue Hemorrágica (FHD/SCD)

A FHD é caracterizada por febre alta que permanece por 2 a 7 dias. Os sinais e sintomas iniciais são semelhantes aos da FD, mas o quadro clínico evolui rapidamente e manifestações hemorrágicas tais como epistaxe, gengivorragia e hemorragia em diversos órgãos são comuns. O agravamento da sintomatologia na FHD é decorrente do aumento da permeabilidade vascular seguida de hemoconcentração e falência circulatória. Em casos leves e moderados, os sinais e sintomas desaparecem logo após o desaparecimento da febre. No entanto, em casos severos pode haver comprometimento do sistema circulatório e o quadro clínico do paciente pode progredir rapidamente para choque hipovolêmico,

denominado síndrome do choque da dengue (SCD), e pode ser fatal (GUBLER, 1998). O estágio crítico da FHD é o momento da desfervescência, quando podem ser observados problemas circulatórios ou manifestações hemorrágicas. A SCD é causada pelo extravasamento do plasma para o espaço intersticial. Pode evoluir para choque profundo com pulso e pressão sanguínea indetectáveis. Alterações hemostáticas na FHD e SCD envolvem três fatores: alterações vasculares, de coagulação e trombocitopenia (GUBLER, 1998).

O diagnóstico clínico diferencial da dengue hemorrágica deve ser feito com outras infecções, como febre amarela, sarampo, rubéola, influenza, malária, leptospirose, outras febres hemorrágicas virais ou outras doenças virais não específicas (GUBLER, 1998). Algumas dessas infecções são endêmicas nas mesmas regiões que a dengue, o que dificulta o diagnóstico.

A maioria dos casos FHD/SCD ocorre como resultado de uma infecção secundária com um diferente sorotipo do *Dengue vírus*. Essa teoria determinando a imunoamplificação da infecção dependente de anticorpos pré-existentes, é o modelo atual que melhor explica o fenômeno da FHD em pacientes secundariamente infectados (GLUBER, 1998).

2.0 JUSTIFICATIVA

A manutenção da epidemia de dengue está relacionada a alterações demográficas e sociais ocorridas nos últimos 50 anos, que incluem o aumento da

população global associada à urbanização não-controlada, à falência dos programas de combate ao vetor e a mudanças nas políticas de saúde pública. Todos esses fatores têm contribuído para o aumento de epidemias de dengue, o desenvolvimento da hiperendemicidade e o aumento de casos de FHD (GUBLER, 1998). Muitos casos de infecção pelo *Dengue virus* são subclínicos, por isso não são notificados e podem ser transmitidos silenciosamente (GUBLER et al., 1998).

A Organização Mundial de Saúde tem demonstrado muita preocupação com o elevado número de epidemias, crescente hiperendemicidade e com o aumento da gravidade dos casos de dengue. No Brasil, a dengue é um dos principais problemas de saúde pública. Assim, estudos que contribuam para a elucidação dos riscos de aumento do potencial patogênico de circulação de amostras de DENV são necessários uma vez que ainda não existem vacinas nem drogas específicas disponíveis. A introdução de novos sorotipos e genótipos é o principal fator de risco para o desenvolvimento de epidemias de dengue com manifestações graves.

Considerando que o aumento de casos de DHF pode estar diretamente relacionado ao aparecimento de amostras mais virulentas, é importante que se conheça as sequências genéticas de isolados virais associados a infecções de maior virulência, mapeando-se as mutações que possam eventualmente estar implicadas nos casos graves de dengue. Tal enfoque pode, portanto, contribuir para o conhecimento sobre a patogênese da dengue e direcionar pesquisas para o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar, identificar e avaliar, através de revisão literária, os sorotipos e genótipos do *Dengue virus* 2 e 3 que estão correlacionados com possíveis implicações na patogenicidade da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever a estrutura e o genoma do *Dengue virus*;
- Pesquisar sobre a patologia e a patogenia da doença;
- Identificar, por meio de revisão bibliográfica, os principais marcadores moleculares que possam estar correlacionados com a virulência viral e patogenicidade da doença em amostras de DENV-2 e DENV-3.

4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Estrutura e genoma do vírus da dengue

A partícula viral é esférica, possui um envelope lipídico e mede aproximadamente 50-70 nm de diâmetro (**figura 5**). O genoma é composto por uma molécula única de RNA cadeia simples, de polaridade positiva com aproximadamente 11.000 nucleotídeos e uma única janela aberta de leitura (ORF - *open reading frame*) codificando uma poliproteína precursora. Proteases virais e do hospedeiro clivam a poliproteína para gerar o conjunto de proteínas estruturais: capsídeo (C), precursora da proteína de membrana (prM), envelope (E) e as não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (**figura 6**) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Além disso, a região codificadora é flanqueada por regiões não traduzidas conservadas (5'NC e 3'NC), que parecem desempenhar um importante papel na modulação da replicação e tradução do genoma viral (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A região 5'NC dos flavivírus é relativamente curta , enquanto a região 3'NC é usualmente mais longa e demonstra extensiva heterogeneidade no tamanho e na sequência entre espécies virais diferentes e mesmo entre linhagens diferentes da mesma espécie (WALLNER et al., 1995 ; WEAVER & VASILAKS, 2009).

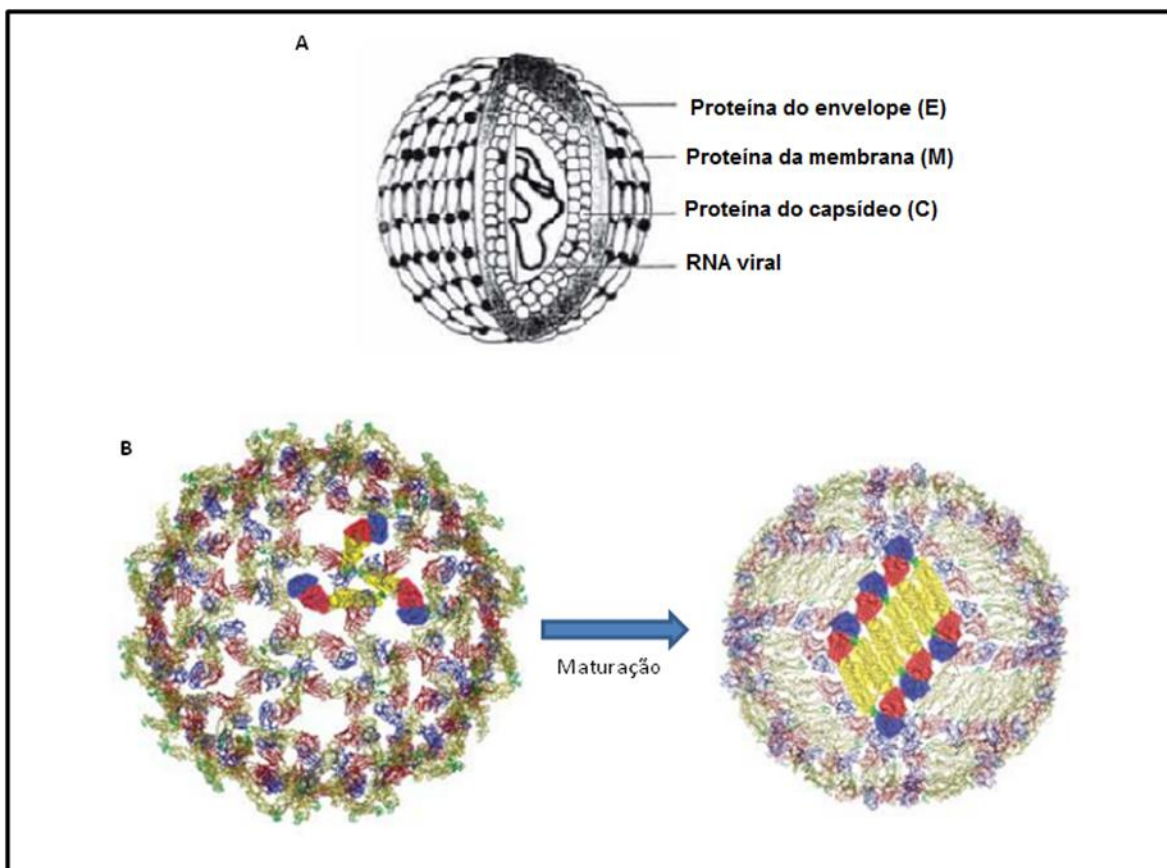


Figura 5- Representações esquemáticas da estrutura da partícula do vírus da dengue:

A) Esquema da estrutura dos *Flavivirus*. O RNA genômico encontra-se envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto pela proteína C. O nucleocapsídeo é, por sua vez, envolto por uma bicamada lipídica que contém as proteínas M e E. **B)** Transição da partícula do vírus da dengue de sua forma imatura (esquerda) para a forma madura (direita) antes de sua liberação das células infectadas. Os domínios I, II e III estão em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. O peptídeo de fusão está em verde.

Fonte: Modificado de Cabezas (2005) e Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann (2005)

A região 3'NC inclui sequências conservadas e estruturas que desempenham papel importante na replicação e tradução viral: uma sequência de 90-120 nucleotídeos que forma o stem-loop (3'SL), que é a estrutura mais comum compartilhada por todos os flavivírus transmitidos por mosquitos; as sequências altamente conservadas CS1 e CS2, e a sequência repetida conservada RCS2 (WEAVER & VASILAKS, 2009).

Dentre as proteínas que compõem a estrutura viral a proteína do capsídeo (C), é uma proteína de 11 kDa, de caráter básico, necessária para encapsular o RNA (CHANG et al., 2001). A proteína precursora de membrana (prM) é glicosilada, tem 26 kDa e é clivada durante a replicação viral por uma protease do tipo furina, gerando a proteína estrutural M de 8kDa. O revestimento externo da partícula viral é formado pelo envelope lipídico, e neste estão inseridas as proteínas E e M. (KUHN et al., 2002; WEAVER & VASILAKS, 2009).

A proteína E é a principal proteína de superfície da partícula viral, contém determinantes antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes, interage com receptores celulares e participa do processo de fusão de membranas da célula e do envelope viral (MODIS et al., 2004; WEAVER & VASILAKS, 2009). Estudos mostram que mutações no gene que codifica a proteína E, podem interferir na virulência (SANCHEZ & RUIZ, 1996; LEITMEYER et al., 1999).

Por meio de estudos de cristalografia foi possível identificar que a proteína E possui três domínios: o primeiro (I) central, o segundo (II) que contém a região de dimerização e o peptídeo de fusão, e o terceiro (III), que apresenta o sítio de ligação ao receptor (HUANG et al., 2004). Esta proteína se organiza em forma de homodímero na partícula viral madura (MODIS et al., 2004); quando em ambiente ácido, como no endossomo tardio, ocorre a trimerização irreversível da proteína E, resultando na sua fusão com membranas dos endossomos e a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN 2005) .

As proteínas não estruturais são encontradas dentro de células infectadas como parte de um complexo de replicação (CR) que por sua vez, está envolvido na replicação do RNA viral. A proteína NS1 (46 kDa) pode ser encontrada associada à célula, atuando como possível cofator na replicação viral, na superfície celular, onde pode estar envolvida na transdução de sinal ou na forma extracelular no hospedeiro vertebrado (JACOBS et al., 2000). Além disso, tanto as formas solúveis da proteína NS1 quanto as que estão associadas à superfície celular podem ter relevância na patogênese da infecção (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A proteína NS3 (70 kDa) que está associada às membranas do RER, via interação com a NS2B (WEAVER & VASILAKS, 2009), desempenha atividades de protease, helicase, nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RNA 5'-trifosfatase (RTPase) que são fundamentais na replicação viral e na reação de *capping* do RNA viral (CHEN et al., 1997).

A proteína NS2A é necessária para a clivagem proteolítica da região C-terminal da NS1. Recentemente, foi demonstrado que a NS4B e, com menor importância, a NS2A e NS4A são capazes de bloquear a via de interferon (IFN) (MUNOZ-JORDAN et al., 2003; WEAVER & VASILAKS, 2009). A NS5 (103 kDa), a maior e mais conservada proteína não estrutural dos flavivírus, apresenta caráter básico e atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP, replicase viral) e de metiltransferase que são essenciais para replicação do vírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007; WEAVER & VASILAKS, 2009). Durante a replicação viral foi demonstrado que a proteína NS5 migra para o núcleo das células e induz a transcrição e tradução da interleucina 8 (IL-8), um importante mediador na patogênese da infecção (MEDIN et al, 2005; WEAVER & VASILAKS, 2009).

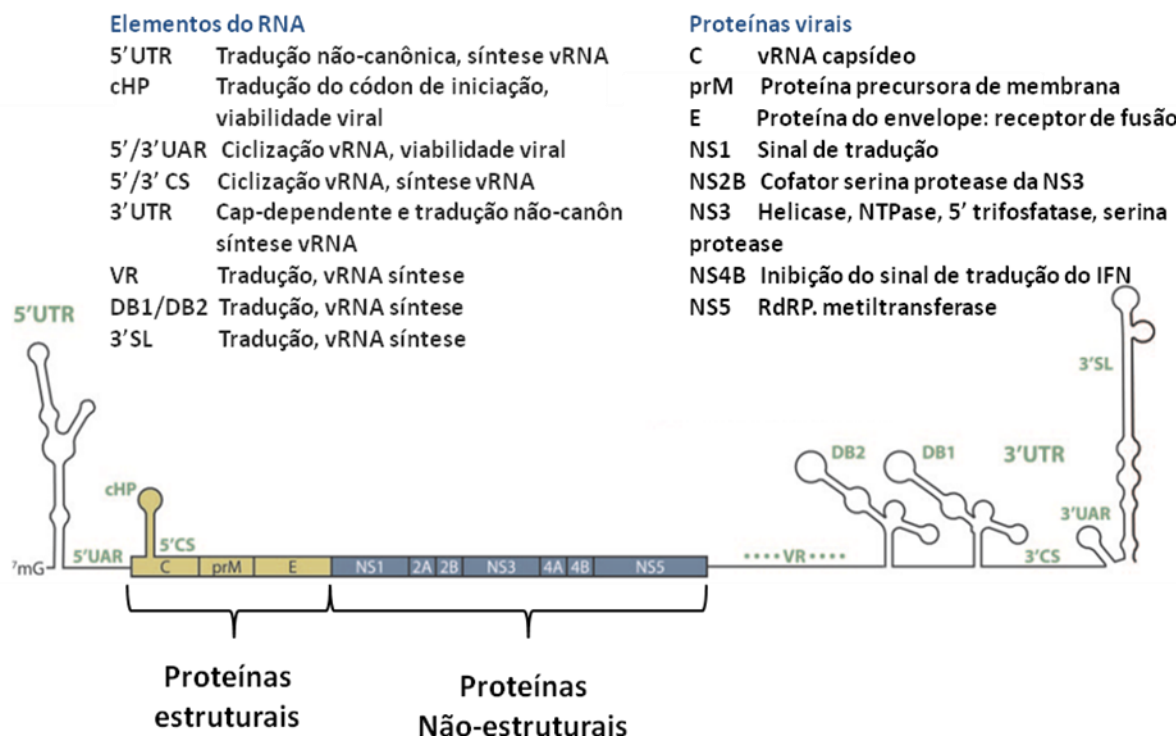


Figura 6- Representação esquemática da organização estrutural e funcional do genoma do vírus da dengue. O genoma dos *Flavivirus* possui uma única janela de leitura que codifica para uma poliproteína, que é co- e pós-traducionalmente processada. A poliproteína é clivada por proteases celulares e viral produzindo 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais. As proteínas estruturais e não estruturais estão coloridas em verde e azul, respectivamente. Nas extremidades 5' (5'UAR, cHP e 5'CS) e 3' UTRs (VR, DB1, DB2, 3'CS, 3'UAR e 3'SL) pode-se observar as estruturas secundárias essenciais para tradução, replicação e montagem da partícula viral. Além disso, a extremidade 5' do genoma possui um "cap" do tipo 1 e a extremidade 3' é desprovida de cauda poli(A).

Fonte- Modificado de Clyde, Kyle & Harris (2006)

4.1 Multiplicação

Os *Dengue virus* são introduzidos em células localizadas na pele do hospedeiro humano, por endocitose mediada por clatrina, via interação entre as glicoproteínas de superfície viral e receptores específicos de superfície celular (LINDENBACH, THIEL e RICE, 2007). Um dos receptores melhor caracterizado até o momento é a molécula de adesão intercelular (ICAM-3) (Intercellular adhesion

molecule-3), também conhecida como CD209 ou DC-SIGN. Estes receptores são principalmente expressos em células da linhagem mononuclear fagocítica em células dendríticas (CD) e macrófagos (RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHT & SMIT, 2010). Durante o processo de maturação, as CDs, que não são células altamente especializadas na apresentação de antígenos aos linfócitos T, poderiam facilitar a infecção sistêmica em fagócitos mononucleares, principal alvo celular para a replicação do *Dengue virus* (RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHT & SMIT, 2010).

Logo após a partícula viral ser internalizada na célula hospedeira, a acidificação da vesícula endossomal promove a dissociação dos dímeros da proteína E e a re-associação irreversível dos monômeros na forma de trímeros. Essa mudança conformacional na proteína expõe o peptídeo de fusão que promove a fusão das membranas virais e do endossoma (**figura 7**). Em seguida, o nucleocapsídeo é liberado e degradado no citoplasma da célula, onde ocorre a tradução e replicação simultânea do RNA viral (MODIS et al., 2004).

A tradução do RNA ocorre em associação com as membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A replicação viral é capaz de inibir a síntese dos mRNAs celulares. O RNA viral é replicado via uma molécula de RNA intermediário de polaridade negativa (3'-5'), que serve como molde para a síntese de várias cópias do RNA genômico de polaridade positiva (5'-3') (WESTAWAY, 1987, RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHT & SMIT, 2010).

Ciclos sucessivos de tradução produzem múltiplas cópias das três proteínas estruturais e das sete não-estruturais, as quais juntamente com o RNA viral irão participar da morfogênese do vírus, que ocorre no RER e no Complexo de Golgi;

enquanto a liberação ocorre junto a membrana plasmática, por exocitose. (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHT & SMIT, 2010).

A proteína prM é clivada, gerando a proteína M madura, o que tem como consequência a própria maturação da partícula viral, infectiva. Partículas subvirais incompletas também são clivadas pelas furinas celulares e proteases virais. As partículas infecciosas e as partículas subvirais resultantes são liberadas da célula hospedeira por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

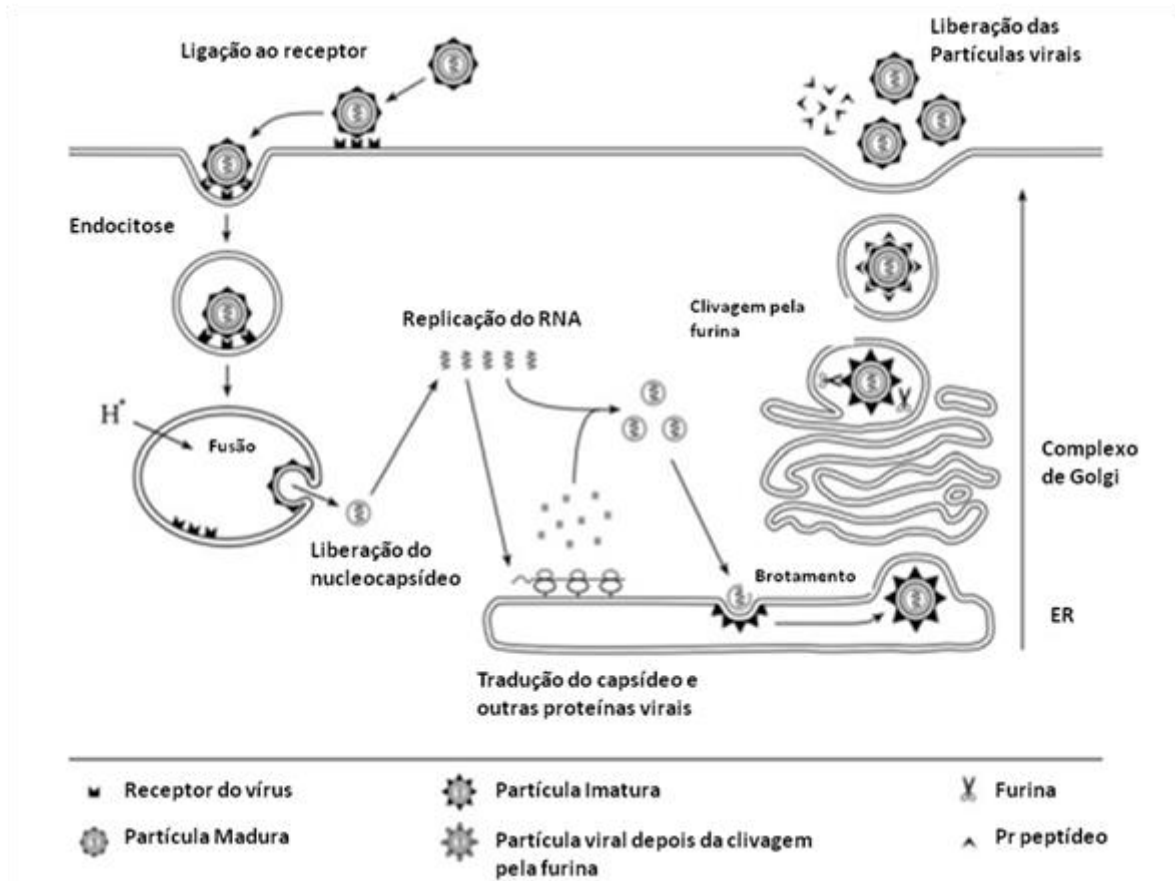


Figura 7- Representação esquemática do ciclo de multiplicação do *Dengue virus*:

As partículas virais sofrem adsorção na superfície da célula hospedeira e, em seguida, penetram por meio de endocitose mediada por receptores. A acidificação do endossomo promove mudanças conformacionais na partícula, fusão das membranas celular e viral, e desnudamento da partícula. O genoma livre no citoplasma é traduzido em uma poliproteína que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases celulares e viral. A replicação do genoma ocorre em membranas intracelulares. A montagem ocorre na superfície do RE quando o nucleocapsídeo brota dentro do lúmen do RE. As partículas imaturas e subvirais são transportadas através do Golgi. As partículas imaturas são clivadas pela protease celular furina, resultando em partículas maduras e infecciosas. As partículas subvirais também são clivadas pela furina. Ambas as partículas, madura e subvirais, são liberadas por exocitose.

Fonte- Modificado de Rodenhuis-Zybert, Wilscht & Smit, 2010.

4.2 Patologia e Patogenia

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode causar manifestações clínicas similares, que podem variar de doença inaparente ou com febre baixa, até doença hemorrágica grave e fatal (GIBBONS e VAUGHN, 2002),

dependendo de fatores de risco como: amostra e sorotipo viral, idade, estado imune e constituição genética do hospedeiro, assim como casos de primeira ou segunda infecção. (GUBLER, 1998).

Estudos recentes demonstram que o perfil clínico da doença tem se modificado e complicações como encefalopatia, hepatomegalia com falha hepática fulminante têm sido descritas nos casos de febre hemorrágica do dengue (FHD) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

A hipótese mais divulgada para explicar a patogênese da FHD/SCD parte da observação de que muitos casos de FHD ocorrem após uma infecção secundária por um sorotipo diferente do primeiro que seria responsável pelo efeito de amplificação dependente de anticorpos (GUBLER, 1998). O fenômeno de anticorpos potencializadores da infecção (*Antibody dependent-enhancement* - ADE) ocorre quando anticorpos heterotípicos não neutralizantes, provenientes de uma infecção primária por um dos sorotipos do *Dengue virus*, opsonizam a partícula viral infectiva durante uma infecção heterotípica subsequente, mas não são capazes de neutralizar o vírus (**figura 8**) (WHITEHEAD et al., 2007). O complexo anticorpo subneutralizante-vírus resultante liga-se a receptores Fcγ (FcγR) de monócitos circulantes, facilitando, dessa forma, a infecção do vírus nesse tipo celular, exacerbando a infecção e conseqüentemente conduzindo para o desenvolvimento de uma doença mais grave (WHITEHEAD et al., 2007).

Outra hipótese é que essa forma mais grave da doença poderia ser causada por uma amostra viral altamente virulenta já que nem todas as infecções secundárias são graves e muitas infecções primárias podem apresentar

manifestações graves. Essas hipóteses não são mutuamente exclusivas e comumente ambas podem contribuir no desenvolvimento de formas graves de doença (GUBLER, 1998). Outro fator relevante para explicar a maior gravidade dos casos de FHD/SCD é que os *Dengue virus*, como outros vírus RNA, sofrem mutações em seu genoma, como resultado de pressão seletiva para que possam replicar em humanos e mosquitos, e algumas amostras virais estão associadas a um maior potencial epidêmico (GUBLER, 1998). A expressão fenotípica dessas mudanças no genoma viral pode incluir maior replicação viral e viremia, ocasionando aumento na gravidade da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Alguns autores demonstraram que uma única mutação de aminoácido no genoma dos flavivírus pode alterar a patogenicidade da amostra *in vivo* e *in vitro* (LUI et al. 2006; BEASLEY et al., 2005).

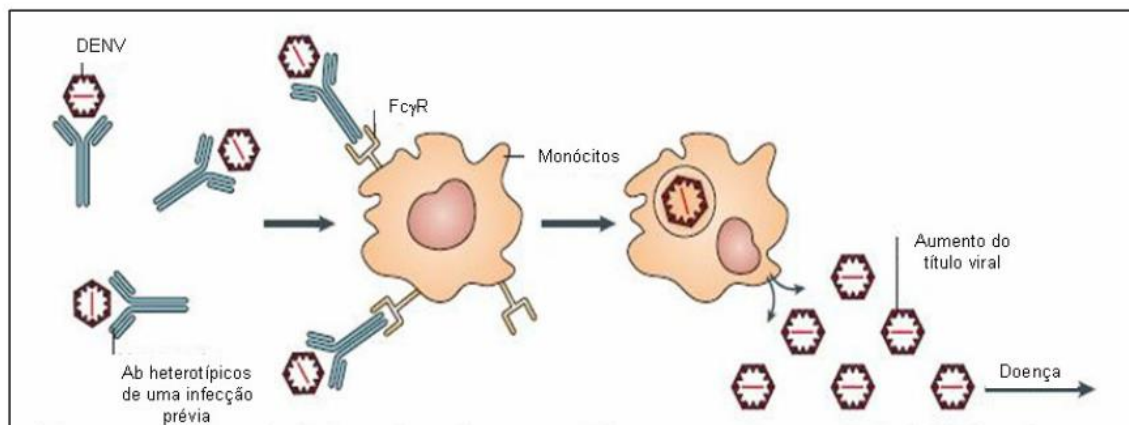


Figura 8- Modelo para amplificação dependente de anticorpos da replicação do vírus da dengue: anticorpos heterotípicos de uma infecção primária por um dos sorotipos do vírus da dengue, opsonizam a partícula viral infectiva durante uma infecção heterotípica subsequente, mas não são capazes de neutralizar o vírus. O complexo anticorpo subneutralizante-vírus resultante liga-se a receptores Fcγ (FcγR) de monócitos circulantes, facilitando a infecção do vírus nesse tipo celular, exacerbando a infecção e conduzindo para o desenvolvimento de uma doença mais grave. Fonte- Modificado de Whitehead et. al, 2007

4.3 Identificação de marcadores moleculares para patogenicidade

A automação da técnica de seqüenciamento nucleotídico permitiu um acúmulo sem precedentes de dados referentes à sequência genômica de diversos organismos. O genoma viral de diferentes genótipos dos quatro sorotipos do vírus da dengue foi determinado; entretanto, as informações sobre a relação das substituições de aminoácidos com fenótipo viral ainda são escassas (WITTKÉ et al., 2002; RICO-HESSE et al., 1997; MANGADA; IGARASHI, 1998). Considerando que o aumento de casos de FHD pode estar diretamente relacionado com o aparecimento de amostras mais virulentas, é importante que se determinem marcadores moleculares de virulência, para mapear as mutações que possam, eventualmente, estar relacionadas nos casos graves de dengue. Este mapeamento poderá servir para se direcionar o desenvolvimento de drogas antivirais até mesmo vacinas (MANGADA; IGARASHI, 1998; MONATH et al., 2002).

Nesse sentido, inúmeros trabalhos têm sido realizados nos últimos anos com o intuito de identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas ao aumento da gravidade dos casos de dengue, assim como alterações no fenótipo viral em diferentes linhagens de células. No entanto, a primeira forte evidência da presença de determinantes genéticos associado à maior gravidade dos casos de dengue, vem de estudos com DENV-2, que indicam que o genótipo asiático é associado à doença grave enquanto o genótipo americano não o é (RICO-HESSE et al., 1997). Esses pesquisadores compararam a sequência de aminoácidos da junção entre as proteínas E/NS1 de amostras de DENV-2 do Brasil, Colômbia, Venezuela e México. O estudo incluiu cinco amostras do Brasil (epidemia de

1990), quatro da Colômbia (1987, 1988 e 1992), duas da Venezuela (1990) e duas do México (1995). Em relação à apresentação clínica da doença (FD e/ou FHD), não houve segregação das amostras na árvore filogenética (RICO-HESSE et al., 1997).

Leitmeyer et al. (1999) estudaram o genoma completo de 11 amostras de DENV-2, associados à FD ou FHD (**tabela 2**). Foram observadas seis diferenças na sequência deduzida de aminoácidos de genes que codificam as proteínas prM, E, NS4B e NS5. Essas mudanças alteram a carga dos aminoácidos, e diferenças na sequência das regiões 5' e 3'NC são associadas a mudanças na estrutura secundária do RNA. Foram identificadas duas alterações, nas posições prM-28 e prM-31, que diferenciam o genótipo americano do genótipo asiático. Uma mudança de aminoácido na proteína NS4B (NS4B-17) não altera a carga da proteína e sua importância na função da proteína não é conhecida. Das cinco substituições observadas na NS5, três: NS5-645 (Asn→Asp), NS5-676 (Ser→Arg/Lys) e NS5-800 (Lys→Ser) conferem alterações de carga, porém não interferem na estrutura da proteína, enquanto as alterações nas posições NS5-271 (Ile→Thr) e NS5-819 (Gln→Leu) resultam em diferenças significativas na hidrofobicidade e antigenicidade. A mutação na posição 69 (de A para U), observada na região 5'NC, distingue vírus do genótipo americano de vírus do sudoeste asiático. Esses autores não encontraram associação direta destas mutações com FD ou FHD. No entanto, suas hipóteses são que os determinantes primários do DENV-2 para a FHD residem: (I) na posição E-390, que presumivelmente altera a ligação do vírus a célula hospedeira; (II) nos nucleotídeos 68 a 80 da região 5'NC, que podem estar envolvidos no início da tradução, e (III) nos

primeiros 300 nucleotídeos da região 3'NC, que podem regular a replicação viral, via formação de intermediários replicativos (LEITMEYER et al., 1999).

Gene	Posição	Mudança do aminoácido													
		ThNHp11 (DF)	K00010 (DF)	CO371 (DF)	CO166 (DF)	ThNH7 (DSS) ^a	K0008 (DHF)	CO390 (DHF)	CO167 (DHF)	Mara4 (DHF)	102692 (DHF)	Ven2 (DF)	0131 (DF)	IQT1797 (DF)	IQT2913 (DF)
prM	28	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K	K
	31	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T
E	390	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
NS1	128	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	L	L	L	L
NS3	567	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	T	T	T	T
NS4b	17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>
NS5	271	I	I	I	I	I	I	I	I	I	—	T	T	T	T
	645	N	N	N	N	N	N	N	N	N	—	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
	676	S	S	S	S	S	S	S	S	S	—	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>K</i>	<i>K</i>
	800	K	K	K	K	K	K	K	K	K	—	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>
	819	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	—	L	L	L	L

Tabela 2- Resumo das mudanças de aminoácidos entre amostras de genótipos do DENV-2 do Sudeste Asiático e de vírus de genótipo Americano: algumas alterações de carga estão em itálico, e as mudanças na cadeia lateral estão em negrito. Aminoácidos de carga negativa: E (ácido glutâmico) e D (ácido aspártico); aminoácidos de carga positiva: K (lisina), H (histidina) e R (arginina); aminoácidos neutros com cadeias laterais polares, V (valina), L (leucina) e I (isoleucina); aminoácidos neutros com cadeias laterais apolares: T (treonina), N (asparagina), S (serina) e Q (glutamina). – Não realizado.

Fonte: Modificado de Leitmeyer et al., 1999

Nas Américas, as evidências de seleção filogenética de uma linhagem de DENV-2, mais virulenta, proveniente do sudoeste asiático, têm sido corroboradas por dados experimentais. Estas amostras de DENV-2, associadas com FHD/SCD, geralmente se replicam de forma mais eficiente em células dendríticas do que as amostras americanas (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005).

Outro estudo demonstra que a mutação no aminoácido 390 (Asp→His) da proteína de envelope pode ser considerada determinante de virulência, já que alterações nesta posição, que está envolvida com a ligação a receptores na célula

hospedeira, endocitose mediada por receptor, tropismo celular e estímulo à produção de anticorpos neutralizantes (CHAO et al., 2005), aumentam a neurovirulência do DENV-2 em camundongos recém-nascidos (SÁNCHEZ; RUIZ, 1996). Situação análoga tem sido descrita para outros flavivírus: Zhao et al. (2005) demonstraram que uma única mutação no aminoácido 138 da proteína E (Glu→Lys), em um clone mutante do vírus da encefalite japonesa (JEV), afeta múltiplos passos do ciclo replicativo viral e pode induzir atenuação do JEV. Essa mutação inibe a disseminação do vírus célula a célula e explica o fenótipo de placas pequenas no teste de titulação de vírus (ZHAO et al., 2005). Substituições de um único aminoácido na proteína de envelope de outros flavivirus como o JEV, na posição E-52 (HASEGAWA et al., 1992); E-138 (SUMIYOSHI; TIGNOR; SHOPE, 1995); E-271 e E-336 (CECILIA; GOULD, 1991), do MVV (*Murray Valey vírus*) E-390 (LOBIGS et al., 1990) da quimera *tick-borne encephalitis virus* (TBEV) e *dengue virus 4* (TBEV-DENV4), E-104 e E-107 (PLETNEV; BLAY; LAY, 1993), demonstraram ter efeito considerável sobre a virulência in vitro ou in vivo (LEITMEYER et al., 1999).

Muitos pesquisadores têm comparado as sequências de isolados de DENV obtidos de pacientes que apresentaram doença grave (FHD/SCD) com outros isolados de casos de FD. Muitos desses estudos têm identificado variações genéticas entre os isolados, mas não há diferenças consistentes na sequência, que correlacionem com gravidade de doença (MANGADA; IGARASHI, 1998; UZCATEGUI et al., 2001). Um estudo comparou a sequência genômica completa de oito isolados de DENV-2 de pacientes com diferentes níveis de gravidade de doença em amostras provenientes de uma mesma epidemia. Os resultados

mostraram elevada similaridade na seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos entre todos os isolados, com o protótipo (Nova Guiné C). Poucas substituições de aminoácidos foram observadas nos diferentes genes da poliproteína, assim como não houve diferenças significativas nas estruturas secundárias das regiões 5' e 3'NC, entre todos os isolados virais. Foi observada uma única variação na estrutura secundária da região 3'NC da amostra ThNH-7/93, relacionada a uma região do genoma importante na replicação viral (MANGADA; IGARASHI,1998). A amostra ThNH-7/93 foi isolada de paciente com SCD e apresentou o maior número de alterações de aminoácidos ao longo do genoma (**tabela 3**), comparado aos outros isolados do estudo. Dentre as alterações de aminoácidos observadas, sete foram observadas apenas nessa amostra e destas, três (NS1-278:Gly→Asp; NS3-394:Val→Ala; NS2A-181:Leu→Ile) foram também observados em estudos anteriores (KINNEY et al., 1997; MANGADA; IGARASHI,1998). Em outro estudo, Uzcategui et al. (2001) analisaram seqüências do gene E de 34 isolados de DENV-2, de pacientes com FD e FHD, na Venezuela, entre 1997 e 2000 e compararam com amostras de diferentes regiões do mundo. Todos os isolados apresentaram o aminoácido asparagina (N) na posição 390 do gene que codifica para a proteína E (E-390). Essa alteração foi associada como provável determinante genético de FHD em amostras asiáticas (LEITMEYER et al., 1999).

Amino acid residue No. ^o		ThNH-7/93	ThNH-28/93	ThNH-52/93	ThNH-p11/93	ThNH-p12/93	ThNH-p14/93	ThNH-p16/93	ThNH-p36/93
prM	16	I	I	I	R	R	R	I	I
	81	T	T	T	A	A	A	T	T
E	334	K	R	R	K	K	K	R	R
NS1	227	R	K	K	K	K	K	K	K
	278	G	D	D	D	D	D	D	D
	281	D	D	D	E	E	E	D	D
NS2a	41	V	V	V	M	M	M	V	V
	63	A	T	T	A	A	A	T	T
	94	K	R	R	R	R	R	R	R
	136	I	I	I	M	M	M	I	I
	138	D	N	N	N	N	N	N	N
	167	A	V	V	V	V	V	V	V
	181	L	I	I	L	L	L	I	I
	215	N	N	N	S	S	S	N	N
NS3	12	I	M	M	M	M	M	M	M
	118	T	T	T	A	A	A	T	T
	201	R	R	K	R	R	R	R	K
	394	A	V	V	V	V	V	V	V
NS4a	3	T	A	A	T	T	T	A	A
	165	L	F	F	L	L	K	F	F
	169	A	A	A	V	V	V	A	A
NS4b	101	S	S	T	S	S	S	S	S
NS5	2	T	T	T	A	T	T	T	T
	196	T	A	A	T	T	T	A	A
	337	T	T	T	M	M	M	T	T
	412	I	I	I	V	V	V	I	I
	637	V	A	A	V	V	V	A	A
	701	N	N	N	N	N	S	N	N
	723	V	V	V	V	V	V	L	V
	793	T	T	T	I	T	T	T	T

Tabela 3- Resumo das diferenças nas seqüências de aminoácidos entre todos os oito DENV-2 isolados: O número de resíduos de aminoácidos corresponde à posição nas respectivas proteínas. A amostraThNH-7/93 corresponde a SCD.

Fonte: Mangada & Igarashi, 1998.

Inúmeros estudos têm sugerido que a sequência e as estruturas secundárias das regiões 5' e 3'NC dos flavivírus desempenham funções importantes na replicação viral e que diferenças nessas regiões entre linhagens podem influenciar a virulência da linhagem viral (LEITMEYER et al., 1999; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003). Silva et al. (2008) descreveram a análise das regiões 3' e 5'NC de 15 isolados recentes de DENV-3, genótipo III, representando duas regiões geográficas diferentes. Estas incluem oito isolados das Américas e do Caribe e sete do Sri Lanka. Os isolados do Sri Lanka, sequenciados naquele estudo, representaram dois subgrupos genéticos diferentes (A e B), dentro do genótipo III do DENV-3. O grupo A, compreende amostras do período anterior e o grupo B, posterior à emergência da

FHD em 1989, no Sri Lanka. As seqüências de nucleotídeo da região 5'NC de todos os isolados de DENV-3, genótipo III, mostraram-se altamente conservadas. A análise da sequência completa da região 3'NC, de 15 amostras de DENV-3, genótipo III revelou que todos os isolados continham uma inserção de 11 nucleotídeos após o código de terminação, quando comparado à amostra protótipo, D3-H87 (**figura 9**). Essa inserção, previamente descrita, parece ser um aspecto comum de todos os DENV-3, genótipo III, isolados das regiões da América Latina/Caribe e Sri Lanka, dando apoio à origem no Sri Lanka, das amostras circulantes nas Américas (SILVA et al., 2008). Os três isolados do Sri Lanka DENV-3, genótipo III (grupo A), compartilham de completa identidade de sequência na região 3'NC. A comparação da sequência de isolados do grupo A e B identificou três diferenças nas posições: nucleotídeo (nt) 10.274 (Gly→Ala), nt 10.307 (Thr→Cys) e 10.436 (Ala→Gly). As variantes do grupo A foram endêmicas no Sri Lanka antes de 1989 e foram associadas com baixa incidência de FHD, ao passo que as variantes do grupo B foram associadas com epidemia de casos graves de FHD (MESSER et al., 2003). Deleções e modificações na região 3'NC têm sido implicadas com mudanças na estrutura secundária do RNA dos DENV e com a atenuação da virulência dos vírus (LEITMEYER et al., 1999; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

```

(A) 10,265          10,289          10,305          10,364
85SriLan : .....A .....C..... C.C..... : 100
83SriLan2 : .....A .....C..... C.C..... : 100
89SriLan2 : .....A .....C..... C.C..... : 100
97SriLan1 : .....C..... C..... : 100
93SriLan1 : .....C..... C..... : 100
89SriLan1 : .....CA..... C..... : 100
SriLan1266 : .....G..... C..... : 100
98Nicara3 : .....T..... A..... : 100
98Nicara1 : .....T..... A..... : 100
D3Mart1234 : .....T..... A..... : 100
D3Mart1567 : .....T..... A..... : 100
D3Mart1706 : .....T..... A..... : 100
D3Mart2012 : .....T..... A..... : 100
D3Mart2023 : .....T..... A..... : 100
D3Mart2336 : .....T..... A..... : 100
D3-H87 : ...A.C... ..CA... ..C..... : 100
DENV3-III : TAAACGTAGG AAGTGAAAA GAGG-TAACT GTCAGGCCAC -TTAAGCCAC AGTACGGGAAAG AAGCTGTGCT GCCTGTGAGC CCCGTCCAAG GACGTTAAAA : 100

10,365          10,436          10,464
85SriLan : .....G..... : 200
83SriLan2 : .....G..... : 200
89SriLan2 : .....G..... : 200
97SriLan1 : .....G..... : 200
93SriLan1 : .....G..... : 200
89SriLan1 : .....G..... : 200
SriLan1266 : .....G..... : 200
98Nicara3 : .....T..... : 200
98Nicara1 : .....T..... : 200
D3Mart1234 : .....T..... : 200
D3Mart1567 : .....T..... : 200
D3Mart1706 : .....T..... : 200
D3Mart2012 : .....T..... : 200
D3Mart2023 : .....T..... : 200
D3Mart2336 : .....T..... : 200
D3-H87 : .....A..... .G..... .C..... : 200
DENV3-III : GAAGAAGTCA GGCCCCAAG CCACGGTTTG AGCAAACCGT GCTGCCTGTA GCTCCGTCGT GGGGACGTAA AACCTGGGAG GCTGCAAAC TGTGAAGCTG : 200

```

Figura 9- Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da região 3'NC, de 15 amostras de DENV-3, genótipo III: todos os isolados apresentam a inserção de 11 nucleotídeos (região em cinza) após o código de terminação, quando comparado à amostra protótipo, D3-H87.

Fonte: Silva, et al., 2008.

5.0 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Muito se tem avançado no estudo dos genomas virais, no sentido de entender a associação de alterações de seqüências ao longo do genoma que possam estar associadas a manifestações clínicas mais graves. Apesar do avanço no conhecimento da estrutura viral assim como da dinâmica da biologia do vírus da dengue, a patogenia continua sendo um grande desafio, principalmente devido à interposição de fatores virais e do hospedeiro. Casos de infecção prévia, idade, sorotipo, genótipo viral infectante e a genética do hospedeiro têm sido implicados no

desencadeamento das formas graves da doença: a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Estudos sobre evolução e biologia molecular de DENV têm demonstrado a ocorrência de diferentes genótipos dentro de cada sorotipo do vírus da dengue (LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997). Por isso, a caracterização genética dos DENV tem se tornado importante para o entendimento dos padrões de epidemia e da disseminação viral. O aumento da transmissão do vírus nos últimos 50 anos tem possivelmente aumentado seu potencial adaptativo, resultando em genótipos mais virulentos que podem estar associados à FHD/SCD (MESSER et al., 2003; RICO-HESSE et al., 1997).

Embora o papel das variações genéticas virais esteja relacionado, há alguns anos, com a gravidade da doença, somente com a aplicação combinada de estudos sobre a evolução do vírus, de dados epidemiológicos, juntamente com o desenvolvimento dos estudos filogenéticos com a posterior construção de árvores evolutivas, é que indicaram que genótipos específicos dentro de um mesmo sorotipo, podem estar associados a menor ou maior severidade da doença (RICO-HESSE, 2007).

Como exemplo da importância de tal conjunto de aplicações, estudos de filogeografia e história evolucionária do DENV-3 estimam que este sorotipo tenha sido originado em torno do ano 1890, e a emergência da diversidade observada atualmente, para os principais genótipos do DENV-3, tem sido inferida para a metade de 1960 e 1970, coincidindo com o aumento populacional, a urbanização, os

movimentos de pessoas e com a descrição do primeiro caso de FHD na Ásia (ARAÚJO et al., 2009).

Com isso, é possível que a patogênese da dengue seja o resultado da atividade coesiva de inúmeros pontos além de fatores imunológicos do hospedeiro. As substituições de aminoácidos dentro de regiões codificadoras, que possam interferir na antigenicidade ou ligação celular e as mudanças de nucleotídeos dentro das regiões não-codificadoras, podem interferir na estrutura secundária e assim a replicação pode ser o determinante viral de doença grave em humanos (LEITMEYER et al., 1999).

Diante dos estudos já realizados as diferenças entre as sequências genéticas dos 4 sorotipos do vírus dengue, juntamente com a susceptibilidade do hospedeiro e fatores ambientais, estão entre os fatores associados à patogenicidade da dengue. Assim, dentre estes, a análise das variações nas sequências genéticas dos sorotipos são de grande importância, pois ajudam a identificar regiões do genoma viral que poderiam estar relacionadas diretamente com a virulência.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; ZANOTTO, P. M. A.; BELLO, G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infect Genet Evol*, v.9, p.716-25, 2009.

BEASLEY, D. W. C.; WHITEMAN, M. C.; ZHANG, S.; HUANG, C. Y. H.; HIGGS, S.; KINNEY, R. M.; BARRET, A. D. T. Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neurinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *J Virol*, v.79, n.13, p.8339-47, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Julho de 2010. In: BRASIL. Ministério da saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CABEZAS, C.S.; Dengue em el Perú: aportes para su diagnóstico y control. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. v.22, n.3, p. 212-228.

CECILIA, D.; GOULD, E. A. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. *Virology*, n.181, p.70-7, 1991.

CHANG,C.J.; LUH,H.W.; WANG,S.H.; LIN,H.J.; LEE, S.C.; HU,S.T. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue viruscore protein. *DNA Cell Biol*. v.20, n.9, p. 569–577, 2001

CHAO, D. Y.; KING, C. C.; WANG, W. K.; CHEN, W. J.; WU, H. L.; CHANG, G. J. J.Strategically examining the full-genome of dengue virus type3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virol J*, v.2, p.72, 2005.

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*, v.71, n.5, p.3466-73, 1997.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*, v.80, n.23, p.11418-31, 2006.

COLOGNA, R.; ARMSTRONG, P. M.; RICO-HESSE, R. Selection for Virulent Dengue Viruses Occurs in Humans and Mosquitos. *J Virol*, v.79, n.2, p.853-9, 2005.

COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue vírus output from human monocytes dedritic cells. *J Virol*, v.77, p.3929-38, 2003.

FIGUEIREDO, R. M. P., NAVECA, F. G., BASTOS, M. S., MELO, M. N., VIANA, S.S., MOURÃO, M. P. G., COSTA, C. A., FARIAS, I. P. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (4), 667-669, 2008.

GIBBONS, R. V., VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. *BJM*, v.324, p.1563-1566, 2002.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*, v.11, n.3, p.480-496, 1998.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in Dengue Diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.3, n.6, p.621-27, 1996.

HAMMOM, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of Philippine and Thailand. *Science*, v. 131, p. 1.102-03, 1960.

HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *J Virol*, v.191, p.158-65, 1992.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Adv. Virus Res.* v. 55, p. 231-69, 2000.

HENCHAL, E. A., PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 3 (4), 376-396, 1990.

HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol*, v.8, n.2, p.74-7, 2000.

HOLMES, E. C.; WOROBEY M.; RAMBAUT A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.*, v. 16, n.3, p.405-9, 1999.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. Isolation, identification and modification of the virus. *J. Infec. Dis.* v. 90, p. 1-9, 1952.

HUANG, J. J.; HSICH M. T.; YOUNG, M. J.; KAO, C. L.; KING, C. C.; CHANG, W. Na external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol*, v.78, n.1, p.378-88, 2004.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

JACOBS, M. G.; ROBINSON, P. J.; BLETCHLY, C.; MACKENZIE, J. M.; YOUNG, P. R. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosylphosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*, v.14, n.11, p.1603-10, 2000.

KINNEY, R. M.; BUTRAPET, S.; CHANG, G. J.; TSUCHIYA, K. R.; ROEHRIG, J. T.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D. J. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*, v.230, n.2, p.300-8, 1997.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. *Cell*, v.108, n.5, p.717-25, 2002.

LANCIOTTI, R. S.; LEWIS, J. G.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution

and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, v.75, p.65-75, 1994.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, v.78, p.2279-86, 1997.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *J Virol*, v.73, p.4738-47, 1999.

LEONG, A.S.; WONG, K.T.; LEONG, T.Y., TAN, P.H, WANNAKRAIROT, P. The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin. Diagn. Pathol.*, v. 24, n. 4, p. 227-36, 2007.

LEYSSSEN, P., CLERCQ, E., NEYTS, J. Perspectives for the Treatment of Infections with *Flaviviridae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (1), 67-82, 2000.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H-J.; RICE, M. R. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, M. D.; HOWLEY, M. P. (Ed.). *Fields Virology*. 5 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1102-52.

LOBIGS, M.; USHA, R.; NESTOROWICZ, A.; MARSHALL, I. D.; 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*, v.176, n.2, p.587-95, 1990.

LUI, W. J.; WANG, X. J.; CLARCK, D. C.; LOBIGS, M.; HALL, R. A.; KHROMYKH, A. A. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuated virus virulence in mice. *J Virol*, v.80, p.2396-2404, 2006.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.*, v. 10, n. 12, p. s98-s109, 2004.

MANGADA, M. N. M.; IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology*, v.244, p.458-66, 1998.

MEDIN, C. L.; FITZGERALD, K. A.; ROTHMAN, A. L. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol*, v.79, p.11053-61, 2005.

MESSER, W. B.; GUBLER, D. J.; HARRIS, E.; SIVANANTHAN, K.; SILVA, A. M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*, v.9, n.7, p.800-9, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos de Dengue. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_classica_2012_at032013.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dengue_graves_2012_at032013.pdf> Acesso em: 30 abr 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Informe epidemiológico da dengue: 26 semana 2010* Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Nota Técnica N.º 118 / 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS* Disponível em : <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_aval_vul_epid_dengue_verao_10_11.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2011.

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

MONATH, T. P.; ARROYO, J.; LEVENBOOK, I.; ZHANG, Z-X.; CATALAN, J.; DRAPER, K.; GUIRAKHOO, F. Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J Virol*, v.76, n.4, 2002.

MUÑOZ-JORDÁN JL, SÁNCHEZ-BURGOS GG, LAURENT-ROLLE M, GARCÍA-SASTRE A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p.14.333–38, 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, v.3, p.13-22, 2005.

NOGUEIRA, M. B.; STELLA, V.; BORDIGNON, J.; BATISTA, W. C.; DE BORBA, L.; PEREIRA DA SILVA, L. H. P.; HOFFMANN, F. G.; PROBST, C. M.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.103, n.5, p.483-88, 2008.

PLETNEV, A. G.; BRAY, M.; LAI, C-J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J Virol*, v.67, n.8, p.4956-4963, 1993.

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

RICO-HESSE, R. Dengue Virus Evolution and Virulence Models. *Clin Infect Dis*. v.44, n.8, p.1462-1466, 2007.

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.; ROSA, A. T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, v.230, p.244-51, 1997.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J. & SMIT, J.M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.67, p.2773-2786, 2010.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. *Am, J, Trop Med. Hyg.* v.1, p. 30-50, 1952.

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, v. 101, p. 640-42, 1945.

SÁNCHEZ, I. J.; RUIZ, B. H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J Gen Virol*, v.77, n.10, p.2541-5, 1996.

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE MINAS GERAIS. Informe epidemiológico Dengue 26/04. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/4142-informe-epidemiologico-dengue-26-04>> Acesso em: 30 abr 2013.

SILVA, R. L. A.; SILVA, A. M.; HARRIS, E.; MACDONALD, G. H. Genetic analysis of Dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. *Virus Res*, v.135, p.320-25, 2008.

SUMIYOSHI, H.; TIGNOR, G. H.; SHOPE, R. E. Characterization of a highly attenuated Japanese encephalitis virus generated from molecular cloned cDNA. *J Infect Dis*, v.171, p.1144-1151, 1995.

UZCATEGUI, N. Y.; CAMACHO, D.; COMACH, G.; UZCATEGUI, R. C.; HOLMES, E. C.; GOULD, E. A. Molecular epidemiology of dengue type2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol*, v.82, p.2945-53, 2001.

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

WALLNER, G.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HEINZ, F. X. The flavivirus 3'-non-coding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, v.213, p.169-78, 1995.

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

WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res*, v.33, p.45-90, 1987

WITTKKE, V.; ROBB, T. E.; THU, H. M.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANROOL, S.; VAUGHN, D. W.; ENDY, T. P.; HOLMES, E. C.; AASKOV, J. G. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*, v.301, p.148-56, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/TDR. Experts propose simplified system of dengue classification. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION/TDR. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/svc/news-events/news/dengue-classification>>. Acesso em: jan. 2011.

WHITEHEAD, S.S.; BLANEY, J.E.; DURBIN, A.P.; MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.

ZHAO, Z.; DATE, T.; LI, Y.; KATO, T.; MIYAMOTO, M.; YASUI, K.; WAKITA, T. Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone. *J Gen Virol*, v.86, p.2209-2220, 2005.

