

LEANDRA BARCELOS FIGUEIREDO

***CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE
DENGUE VIRUS 1, 2 E 3 E ANÁLISE
COMPLETA DO GENOMA DE DENGUE
VIRUS 1 E 3 CIRCULANTES NOS ESTADOS
DO PIAUÍ E MINAS GERAIS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Professora Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte
Dezembro-2009

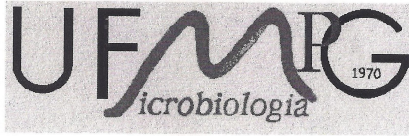
Figueiredo, Leandra Barcelos.
Caracterização de amostras de dengue vírus 1,2 e 3 e análise completa do genoma de dengue vírus 1 e 3 circulantes nos Estados de Minas Gerais e Piauí. [manuscrito] / Leandra Barcelos Figueiredo. – 2009.
184 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Erna Geessien Kroon.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Dengue – Minas Gerais - Teses. 2. Dengue – Piauí – Teses. 3. Vírus da dengue – Teses. 4. Genótipo - Teses. 5. Proteínas virais – Teses. 6. Microbiologia – Teses. 7. Virologia – Teses. 8. Caracterização molecular. I. Kroon, Erna Geessien. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616.988



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: LEANDRA BARCELOS FIGUEIREDO

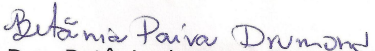
Nº matrícula: 2006221927

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL DOUTORADO


Defesa de Tese: 21 de dezembro de 2009

Título: "Caracterização de amostras de *Dengue virus* 1, 2 e 3 e análise completa do genoma de *Dengue virus* 1 e 3 circulantes nos Estados de Minas Gerais e Piauí"

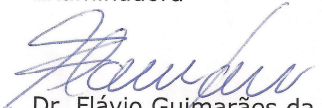
A Tese foi submetida à apreciação da Profa. Giliane de Souza Trindade que emitiu parecer favorável.


Dra. Betânia de Paiva Drumond
Examinadora

Aprovada: SIM


Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Examinadora

Aprovada: SIM


Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Examinador

Aprovada: SIM


Prof. Luiz Felipe Leomil Coelho
Examinador

Aprovada: SIM


Dra. Erna Geessien Kroon
Orientadora

Aprovada: SIM


Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

“Acredito que os filósofos voam como as águias e não como pássaros pretos. É bem verdade que as águias, por serem raras, oferecem pouca chance de serem vistas e muito menos de serem ouvidas, e os pássaros pretos, que voam em bando, param em todos os cantos enchendo o céu de gritos e rumores, tirando o sossego do mundo.”

Galileu Galilei

Dedico essa tese de doutorado à minha avó Sebastiana Antero (in memoriam); aos meus pais Carlos e Maria pelo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Seria impossível chegar à conclusão deste trabalho sem o encorajamento, o apoio e a paciência de nossos familiares e amigos. Inúmeras pessoas foram de extrema importância, difícil é citar todas nominalmente, mas ficam aqui registrados meus agradecimentos.

Agradeço, antes de tudo, a Deus, por este momento, pelo dom da vida, pela saúde, força e presença constante. As lutas foram grandes e as dificuldades inúmeras, mas sabia que havia algo maior que me fazia continuar e não desistir.

Aos meus pais, Carlos e Maria, que com carinho e solidariedade, esteve sempre presente nesta caminhada. Não teria chegado até aqui, sem o apoio de vocês, o alicerce de minha vida. Muito obrigada, porque hoje sou um pedaço de vocês e, acima de tudo, o resultado de seus sacrifícios e ensinamentos. Amo vocês!

Aos meus irmãos Alice e Everton por estar presente em minha vida e me ajudar sempre. Ao meu sobrinho João Victor, que transformou as nossas vidas e que ocupa um lugar tão grande no meu coração.

A toda minha família, meus tios, tias, primas e primos que torcem por mim e estão sempre ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Erna Geessien Krooon, por ser mais do que minha chefe e orientadora, por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional e pessoal, pelo apoio em todos os momentos. Obrigado pela atenção e por toda orientação recebida, que foi bem além do lado profissional, pelo apoio e seriedade profissional que você sabe transmitir. O contato com a Virologia, me fez encantar ainda mais por esta área belíssima. Você é uma pessoa especial e verdadeiro exemplo de que as vitórias são alcançadas com muito esforço, dedicação e, sobretudo, com muito trabalho.

Agradeço a Dra. Jaqueline Germano, por ter me apoiado e incentivado o tempo todo. Por ser um grande exemplo de mulher e de profissional a ser seguido. Pelos conhecimentos transmitidos e por me ensinar a fazer ciência, tendo sempre respeito ao próximo e promovendo a união do grupo.

Aos Professores Cláudio Antônio Bonjardim e Paulo César Peregrino Ferreira, pela atenção, apoio e o convívio agradável.

À Professora Giliane pela simpatia e espontaneidade que contagiam a todos. Você é uma pessoa de coração nobre. Pela grande atenção ao revisar esta tese.

Ao João Rodrigues dos Santos, *Jon Jon*, você é **incrível**. Serei eternamente grata a você, você é orientador, mestre e amigo. Você é essencial, obrigada pela inestimável colaboração junto ao meu trabalho e pelo enriquecimento do meu aprendizado. Você é uma pessoa que conquistou um lugar no meu coração, é um grande amigo, companheiro para todas as horas.

À Tia Ângela, por todo carinho e paciência com todos daqui. Pela sua tranquilidade e sabedoria transmitida sempre.

À Ilda e Andreza, obrigada pela dedicação, paciência e simplicidade. Vocês tiveram grande participação e importância em nossas conquistas. Ildinha, obrigada pelo bom humor e pelos momentos de descontração em sua casa.

Ao Douglas, a Gina, a Fatinha e todos os funcionários da Pós-graduação que sempre foram muito prestativos e atenciosos.

Ao Grupo de Dengue podemos ser considerados heróis. Trabalhar com dengue é um desafio, exemplo de coragem e persistência. Cada resultado alcançado é uma vitória diária. Nunca esqueçam que o trabalho em equipe rende bons frutos, sobretudo com muito trabalho. Somos fortes quando unidos.

À Marcela Cota por trabalhar arduamente ao meu lado, pela sua alegria e simpatia transmitida. Sua dedicação, esforço e trabalho renderam excelentes frutos. Adorei ter você como minha IC.

Ao Eliseu, pela ajuda inestimável na formatação das tabelas, figuras e até mesmo do meu computador. Muito obrigada pela boa vontade e paciência em todos os momentos de desespero. Seu companheirismo foi singular.

A Kátia pela amizade, pelos bons conselhos e pela boa vontade de ajudar sempre. Obrigada por está sempre comigo tanto nos momentos estressantes como os de descontração. Temos mais de 8 anos de convivência e amizade. Nossa como o tempo passa rápido!

Ao André, meu grande amigo carioca. Tenho certeza que a nossa amizade é aquela que fica para a vida toda. Obrigada por toda a atenção, carinho, dedicação e pelo apoio nas mais diferentes situações.

A TODOS meus amigos virologistas: Jônatas, Flávia Gama, Quelé, Marcelão, André Carioca e Baiano, Gabriel, Pedro, Bruninho, Luciana Bessa, Gra, Jonas, Luciana Garcia, Léo, Danilo, Geraldão, Alê, Bárbara, Alice, Gi, Mari, Ana Paula, Vianinha, Carlinha, Lu Amaral, Vanessa, Filipão, Jú, Lina, Gustavo, Jack, Cíntia, Landa e todos que convivi pelas discussões, conselhos, boas conversas, e sobretudo pelas festinhas, que nos renderam boas risadas e histórias.

À Marijalma e à Gigijalma, somos amigas e cúmplices nas conquistas, nas horas boas e nas difíceis. Amizade nem sempre é pensar do mesmo jeito, mas abrir mão de vez em quando. Obrigada por sempre estarem ao meu lado!

Aos amigos Gustavo, Lina e Ju (Bsb) pela amizade, sabedoria, bom humor e pelos ótimos momentos passados juntos. Se todos os labvirianos fossem como vocês, seríamos bem mais felizes. Vocês estarão sempre comigo!

Ao Dr. Fabrício Rodrigues Santos, estudantes e funcionários do LBEM pela realização dos seqüenciamentos.

Ao Luíz Felipe por ceder às amostras clínicas do Estado do Piauí.

A Dra. Betânia Drumond, por toda sabedoria, ensinamentos transmitidos, conselhos e sugestões preciosas.

As minhas grandes amigas, Cristina, Aline, Ana Celi, Carlinha, Luana e Izabella pela amizade, conselhos e incentivo em todos os momentos. Pelas horas de desabafo no telefone, sem o apoio, amizade e carinho de vocês teria sido muito mais difícil. Vocês foram muito importantes nesta conquista. Amigos sabem quando serão amigos, pois compartilham momentos, dão força e estão sempre ao nosso lado. Amo vocês!

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível a execução deste projeto.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	3
ABREVIATURAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
I- INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
1.1- Histórico	Erro! Indicador não definido.
1.2- Família <i>Flaviviridae</i>	Erro! Indicador não definido.
1.2.1- Gênero <i>Flavivirus</i>	Erro! Indicador não definido.
1.3- Partícula Viral e Genoma	Erro! Indicador não definido.
1.3.1- Proteínas Virais	Erro! Indicador não definido.
1.4 - Ciclo de Multiplicação	Erro! Indicador não definido.
1.5- Variabilidade genética e filogenia do <i>Dengue virus</i>	Erro! Indicador não definido.
1.6- Manifestações Clínicas da Dengue.....	Erro! Indicador não definido.
1.7 – Patogênese da FHD	Erro! Indicador não definido.
1.8- Diagnóstico Laboratorial.....	Erro! Indicador não definido.
1.8.1- Isolamento Viral.....	Erro! Indicador não definido.
1.8.2- Diagnóstico Molecular.....	Erro! Indicador não definido.
1.9- Transmissão.....	Erro! Indicador não definido.
1.10- Epidemiologia.....	Erro! Indicador não definido.
1.10.1- Dengue no Brasil.....	Erro! Indicador não definido.
2- JUSTIFICATIVA	Erro! Indicador não definido.
3- OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
3.1- Objetivo Geral	Erro! Indicador não definido.
3.2- Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
4- ESTRATÉGIA DE TRABALHO	Erro! Indicador não definido.
5- MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
5.1- Amostras Clínicas	Erro! Indicador não definido.
5.1.1- Amostras do Estado do Piauí (PI)	Erro! Indicador não definido.
5.2- Células.....	Erro! Indicador não definido.
5.3- Isolamento viral (FIGUEIREDO, 2006).....	Erro! Indicador não definido.
5.4- Multiplicação dos DENV isolados dos soros de pacientes	Erro! Indicador não definido.
5.5- Titulação viral	Erro! Indicador não definido.
5.6- Extração de RNA viral (QIAGEN®, USA).....	Erro! Indicador não definido.
5.7- Reação em cadeia pela polimerase (PCR) (INNIS et al., 1990) ...	Erro! Indicador não definido.
5.7.1- Desenho dos Iniciadores	Erro! Indicador não definido.
5.7.1- Condições empregadas nas reações de ampliações.....	Erro! Indicador não definido.
5.7.2- Eletroforese – fracionamento e visualização do DNA amplificado	Erro! Indicador não definido.
5.8– Ligação dos fragmentos de PCR ao vetor pGEM-T	Erro! Indicador não definido.
5.9- Transformação Bacteriana (SAMBROOK & RUSSEL, 2001)..	Erro! Indicador não definido.
5.10- Triagem das colônias	Erro! Indicador não definido.
5.11- Obtenção de DNA Plasmidial em Pequena Escala	Erro! Indicador não definido.

5.11.1- Purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento	Erro! Indicador não definido.
5.12- Sequenciamento	Erro! Indicador não definido.
5.12- Análise das sequências.....	Erro! Indicador não definido.
5.12.1- Montagem e edição das sequências nucleotídicas.....	Erro! Indicador não definido.
5.12.2- Busca de similaridades em bancos de dados....	Erro! Indicador não definido.
5.12.3- Alinhamento de sequências.....	Erro! Indicador não definido.
5.12.4- Inferências filogenéticas.....	Erro! Indicador não definido.
6- RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
6.1- Caracterização de amostras de DENV do Estado do Piauí.....	Erro! Indicador não definido.
6.1.1- Espécimes clínicos dos pacientes com suspeita de Dengue	Erro! Indicador não definido.
6.1.2- Manifestações clínicas dos pacientes.....	Erro! Indicador não definido.
6.2.- Isolamento Viral	Erro! Indicador não definido.
6.2.1- Soros dos pacientes	Erro! Indicador não definido.
6.2.2- Efeito citopático (ECP) das amostras de DENV isolados de pacientes.....	Erro! Indicador não definido.
6.3- Amplificações e sequenciamento das amostras virais	Erro! Indicador não definido.
6.3.1- Amplificações da região C-prM de amostras de DENV-2 e 3...	Erro! Indicador não definido.
6.3.2- Sequenciamento do gene c-prM das amostras de DENV-2 e 3.	Erro! Indicador não definido.
6.3.4- Amplificações e sequenciamento do gene E de amostras de DENV-2 e 3 do Piauí	Erro! Indicador não definido.
6.3.5- Análise de similaridade, da sequência inferida de aminoácido do gene E de amostras de DENV-2 e 3 do Piauí	Erro! Indicador não definido.
6.3.6- Análise filogenética com base no gene E de amostras de DENV-2 e 3 do Piauí.....	Erro! Indicador não definido.
6.4- Amplificação e análise do gene E de amostras de DENV-3 isoladas de pacientes do Estado de Minas Gerais (FIGUEIREDO et al.,2008)	Erro! Indicador não definido.
6.4.1- Análise Filogenética do gene E de amostras de DENV-3 isoladas de pacientes do Estado de Minas Gerais.....	Erro! Indicador não definido.
6.5- Amostras utilizadas para o sequenciamento completo do genoma de DENV-3 e DENV-1	Erro! Indicador não definido.
6.5.1- Amplificação de fragmentos do genoma de DENV-3 e DENV-1.....	Erro! Indicador não definido.
6.5.2- Montagem das sequências	Erro! Indicador não definido.
6.6- Análise dos genes C, prM/M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5.....	Erro! Indicador não definido.
6.6.1- Genes C e prM/M.....	Erro! Indicador não definido.
6.6.2- Gene E	Erro! Indicador não definido.
6.6.3- Gene NS1	Erro! Indicador não definido.
6.6.4- Genes NS2a e NS2b	Erro! Indicador não definido.
6.6.5- Gene NS3	Erro! Indicador não definido.
6.6.6- Gene NS4a e NS4b	Erro! Indicador não definido.

6.6.7- <i>Gene NS5</i>	Erro! Indicador não definido.
6.6.7. 1- <i>Análise filogenética do gene NS5</i>	Erro! Indicador não definido.
7- DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Erro! Indicador não definido.
9- ANEXOS.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição da Dengue, países com vetor <i>Aedes aegypti</i> e com risco de introdução da doença.....	11
FIGURA 2: Distribuição do vetor <i>Aedes aegypti</i> nas Américas em: 1930 1970 e 2001.....	13
FIGURA 3: Classificação dos <i>Flavivirus</i>	16
FIGURA 4: Partícula viral do vírus do gênero <i>flavivirus</i>	17
FIGURA 5: Organização do genoma dos <i>Flavivirus</i>	18
FIGURA 6: Estrutura da proteína E e a sua organização na partícula viral madura	21
FIGURA 7: Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	24
FIGURA 8: Sintomatologia mais freqüente dos pacientes com Febre do Dengue do Piauí	66
FIGURA 9: Células C6/36 infectadas com isolados de DENV-2.....	69
FIGURA 10: Amplificações por RT-PCR de amostras isoladas em células C6/36 e de soros de pacientes com FD, utilizando temperatura de pareamento de 58°C.....	71
FIGURA 11: Gráfico de similaridade de nt entre o DENV-2 (PI-62/2006)	74
FIGURA 12: Gráfico de similaridade de nt comparando o DENV-3 (PI-104/2006)	75
FIGURA 13: Alinhamento da sequência de nt de junção dos genes C-prM das amostras de DENV 3 do Estado do Piauí.....	76
FIGURA 14:Árvore filogenética de amostras de DENV-2 baseada na sequência do gene C-prM.....	81
FIGURA 15: Alinhamento da sequência inferida de aa da proteína E com amostras.....	89
FIGURA 16: Alinhamento da sequência inferida de aa codificada pelo gene E	90
FIGURA 17:Árvore filogenética de amostras de DENV-2 baseada na sequência do gene C-prM.....	94
FIGURA 18: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene E do DENV-3.	96
FIGURA 19: Árvore filogenética construída a partir das sequências do gene E do DENV-3 (MG)	99
FIGURA 20: Diagrama esquemático do genoma do DENV, mostrando as localizações dos iniciadores desenhados para amplificação dos 10 genes do DENV	102
FIGURA 21: Gráfico de similaridade de nt entre os genes C, prM/M da sequência Filipinas e as sequências MG-20, BH-17, PI-64, PI-104, Brasil e China	105
FIGURA 22: Alinhamento da sequência de aa codificada pelo gene E do DENV-3.....	106
FIGURA 23: Árvores filogenéticas construídas a partir das sequências do gene C do DENV-3.....	110
FIGURA 24 Árvore filogenética baseada na sequência do gene C de amostras de DENV-1	111
FIGURA 25: Alinhamento da sequência inferida de aa codificada pelo gene E do DENV-1.....	116
FIGURA 26: Árvore filogenética baseada na sequência do gene E de amostras de DENV-1	118
FIGURA 27: Gráfico de similaridade de nt com base no gene NS1	120
FIGURA 28: Alinhamento da sequência inferida de aa codificada pelo gene NS1 das amostras de DENV 3 do Estado de Minas Gerais.....	123
FIGURA 29: Alinhamento da sequência inferida de aa do gene NS1 das amostras de DENV-1.....	127
FIGURA 30: Árvore filogenética construída a partir das sequências do NS1 do DENV-3	129
FIGURA 31: Árvore filogenética construída a partir das sequências do NS1 do DENV-1	131

FIGURA 32: Alinhamento da sequência inferida de aminoácidos codificada pelo gene NS2a	134
FIGURA 33: Gráfico de similaridade de nt com base nos genes NS2a	136
FIGURA 34: Alinhamento da sequência inferida de aminoácidos codificada pelo gene NS2a	137
FIGURA 35: Árvore filogenética circular construída a partir da sequência do gene NS2a do DENV-3 e DENV-1.....	139
FIGURA 36: Alinhamento do gene NS3 das amostras de DENV-3 do Estado de Minas Gerais	141
FIGURA 37: Alinhamento do gene NS3 das amostras de DENV-1 do Estado de Minas Gerais	143
FIGURA 38: Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene NS3 do DENV-3.....	145
FIGURA 39: Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene NS2b do DENV-3.....	147
FIGURA 40: Árvore filogenética construída a partir da sequência dos genes NS4a4b	151
FIGURA 41: Alinhamento da sequência de aa codificada pelo gene NS5 das amostras	153
FIGURA 42: Árvore filogenética construída a partir da sequência do gene NS5	156

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relação dos genótipos do DENV-1 estabelecidos por Rico-Hesse (1990)	29
TABELA 2: Relação dos genótipos do DENV-2 estabelecidos por Rico-Hesse (1990)	29
TABELA 3: Relação dos genótipos do DENV-3 estabelecidos por Lanciotti <i>et al.</i> , (1994)	29
TABELA 4: Relação dos genótipos do DENV-4 estabelecidos por Lanciotti <i>et al.</i> , (1994)	30
TABELA 5: Amostras de soros coletados de pacientes	47
TABELA 6: Sequência, localização e tamanho dos fragmentos esperados dos iniciadores desenhados para amplificar o genoma completo do DENV-3	53
TABELA 7: Sequência, localização e tamanho dos fragmentos esperados dos iniciadores desenhados para amplificar o genoma completo do DENV-1	54
TABELA 8: Sequência, localização e tamanho dos fragmentos esperados dos iniciadores descritos por Lanciotti <i>et al.</i> (1992)	55
TABELA 9: Sequência e tamanho dos amplificadores esperados dos iniciadores desenhados pelo Dr. Flávio da Fonseca para amplificação do gene E do DENV-3.....	55
TABELA 10: Sequência e tamanho dos amplificadores esperados dos iniciadores desenhados para amplificação do gene E do DENV-2 e DENV-3 do Piauí	55
TABELA 11: Amostras isoladas e PCR de soros de pacientes com Febre do Dengue (FD), com FD e Manifestação Hemorrágica (MH) em células de linhagem contínua C6/36	68
TABELA 12- Identidade de nt e de aa entre a região de junção dos genes C-prM das amostras de DENV-2 do Estado do Piauí	73
TABELA 13: Identidade de nt e de aa entre a região de junção dos genes C-prM das amostras de DENV-3 do Estado do Piauí	74
TABELA 14: Tamanho da sequência obtida para o gene E dos isolados de DENV-2 e DENV	83
TABELA 15: Identidade de nt e de aa com base no gene E das amostras de do Estado do Piauí.....	84
TABELA 16: Comparação da sequência inferida do gene E das amostras de DENV-2.....	86
TABELA 17- Identidade de nt com base no gene E das amostras de DENV-3 do Estado do Piauí	88
TABELA 18: Descrição dos isolados de DENV-3 coletados em MG.....	97
TABELA 19: Similaridade de nt e de aa do gene E entre as sequências de DENV-3	98
TABELA 20: Amostras virais utilizadas para o sequenciamento do genoma	100
TABELA 21. Contigs das sequências relativos ao genoma viral das amostras BH-17, MG-20	103
TABELA 22. Alterações de aa encontradas nas sequências C, M	106
TABELA 23: Similaridade de nt e de aa do gene E entre as sequências BH-9 (FHD)	114
TABELA 24: Alterações de aa encontradas nas sequências das amostras BH-9	115
TABELA 25: Identidade de nt do gene NS1 entre as sequências PI-64.....	121
TABELA 26: Posições e alterações de aminoácidos na proteína NS1.....	122
TABELA 27: Identidade de nt do gene NS1 entre as sequências de DENV-1	125
TABELA 28: Tamanho das sequências obtidas relativa ao gene NS3.....	140
TABELA 29: Identidade de nt dos genes NS4a e 4b entre as sequências	146
TABELA 30: Tamanho das sequências obtidas relativa ao gene NS5.....	151

TABELA 31: Posições e alterações de aa na proteína NS5 das amostras de MG, do PI..... 152

ABREVIATURAS

aa: aminoácido
B. O. D: “ biologic oxygen demand “
C: proteína do capsídeo
CAP: capeamento
DNA : ácido desoxirribonucléico
DC-SIGN : ligante de ICAM-3 específico de células dendríticas
dNTP´s: Deoxint trifosfatados
FD: febre do dengue
FHD: Febre hemorrágica do dengue
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde
g:gramas
GRP78/BiP: proteína reguladora da glicose 78
IFN: interferon
IL: Interleucinas
E: proteína do envelope
ECP : efeito citopático
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
IPTG: isopropil β - D – tiogalactopiranosídeo
Kb : quilobases
KDa : quilodaltons
L-15-: meio Leibowitz-15
M: proteína de membrana
MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1
MH: manifestações hemorrágicas
MP: Máxima Parcimônia
 μ g : micrograma
 μ L: microlitro
M-MLV: Moloney murine leukemia virus
mRNA : ácido ribonucléico mensageiro
Mac-ELISA: ELISA de captura de imunoglobulina M (IgM)

NJ: "Neighbor-Joining"
nt: nucleotídeo:
NS: proteína não-estrutural
OMS: Organização Mundial de Saúde
ORF: janela aberta de leitura
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
pb : pares de bases do DNA
PBS : solução salina fosfatada
PCR : reação em cadeia da polimerase
PFU: unidade formadora de placa
pmol: picomoles
PrM: precursor da proteína de membrana
RE: retículo endoplasmático
RNA: ácido ribonucléico
rpm : rotações por minuto
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa
SCD: síndrome do choque da dengue
SFB: soro fetal bovino
SNPs: polimorfismos de base única
TBE: tampão Tris-borato-EDTA
TBEV: vírus da encefalite transmitida por carrapatos
TNF ∞ : fator de necrose tumoral ∞
TN: teste de neutralização
UTR: região não traduzida
UV : ultravioleta
WNV: vírus da encefalite do oeste do Nilo
YFV: vírus da febre amarela

RESUMO

A Dengue é atualmente considerada uma das mais importantes arboviroses que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção pelo *Dengue virus* (DENV) e que mais de 100 países nas regiões tropicais possuem infecções endêmicas do DENV. O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. É classificado em quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A infecção com qualquer um dos sorotipos do DENV causa um espectro de manifestações que varia desde uma doença febril leve (FD) até um quadro hemorrágico grave, a febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (FHD/SCD). No presente trabalho foi analisado os genes C, prM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 das amostras de DENV-1 e DENV-3 circulantes nos Estados de Minas Gerais e do Piauí relacionadas com diferentes manifestações clínicas. Estas amostras foram isoladas em células de *Aedes albopictus* C6/36. A RT-PCR foi realizada para detecção do RNA viral utilizando inicialmente iniciadores descritos por Lanciotti *et al.* (1992), posteriormente foram utilizados iniciadores desenhados para amplificação do genoma completo de amostras de DENV-1 e DENV-3, obtidas nos Estados de Minas Gerais e do Piauí. As análises das sequências dessas amostras demonstram a presença de várias mutações de nucleotídeo e aminoácido distribuídas em todos os genes. Análises filogenéticas confirmaram que recentes epidemias de DENV-3 ocorridas no Brasil estão relacionadas com a circulação dos genótipos I e III. As amostras de DENV-3 do Estado de MG mostraram uma maior proximidade com isolados do Sudeste Asiático e Ilhas do Pacífico Sul, as quais são amostras pertencentes ao genótipo I. No entanto, as amostras do Piauí ficaram agrupadas com isolados que são identificados como genótipo III, onde estão incluídos isolados da Sri-Lanka, América Central e Leste da África. Com relação ao DENV-1 foi observado uma baixa porcentagem de similaridade entre os isolados de pacientes com FD e FHD em todos os genes analisados. A amostra obtida de paciente com FHD apresentou maior proximidade com isolado do Reunion, enquanto que a amostra obtida de

paciente com FD ficou agrupada com isolados do Brasil, da Argentina, do Paraguai e de outros países da América. Adicionalmente, foi feita a caracterização molecular com base nos genes c-prM e E de 8 amostras de DENV-2 e 5 de DENV-3 coletadas no Estado do Piauí. Os resultados das análises desses genes indicaram uma alta similaridade entre essas amostras, assim como outras seqüências de DENV-2 e DENV-3 circulantes no Brasil, na América Central e do Sul. As inferências filogenéticas do DENV-2 feitas tanto pelo gene C-prM, quanto pelo gene E demonstraram que essas amostras são agrupadas juntamente com os isolados pertencentes ao genotipo "Americano-Asiático".

Palavras-chave: *Dengue virus* 1, 2 e 3, genotipo I e III, genotipo America-Asiático, caracterização molecular, proteína E.

ABSTRACT

In terms of morbidity and mortality, *Dengue virus* (DENV) is currently considered one of the most important arboviruses affecting humans. The World Health Organization estimates that more than 2.5 billion people are at risk of infection with DENV and more than 100 countries in tropical regions have endemic DENV infections. DENV belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. It is classified into four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. DENV infection causes a spectrum of symptoms ranging from mild febrile illness (DF) to a severe hemorrhagic manifestations, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (DHF / DSS). In the present work the genes C, prM / M, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4A, NS4B and NS5 of the samples of DENV-1 and DENV-3 circulating at Minas Gerais and Piauí states were analysed and related to different clinical manifestations. These samples were used for virus isolation in C6/36 *Aedes albopictus* cells. RT-PCR to detect DENV RNA was performed as described by Lanciotti et al. (1992) and then was used others primers that designed to amplify full-length of Brazilian DENV-1 and DENV-3 samples. Sequencing of these samples shows several nucleotides and therefore aminoacid mutations in all analyzed genes. Phylogenetic analysis confirmed that recent Brazilian DENV-3 outbreaks are related to circulation of genotypes I and III. DENV-3 samples from Minas Gerais state showed a closer relationship with isolates from Southeast Asia and South Pacific Islands, which are samples from genotype I. However, Piauí samples were grouped with isolates identified as genotype III, which includes isolates from Sri Lanka, Central America and East Africa. Regarding DENV-1 samples, a low percentage of similarity among isolates from patients with DF and DHF was observed in all genes. The sample obtained from a patient with DHF had greater proximity to isolate Reunion, while the sample obtained from a patient with FD was grouped with isolates from Brazil, Argentina, Paraguay and other countries in America. Additionally, molecular characterization was made using the genes c-prM and E of eight samples of DENV-2 and five of DENV-3 collected in the state of Piauí. The results of analysis of these genes indicated a high similarity among these

samples, as well as other sequences of DENV-2 and DENV-3 circulating in Brazil, Central and South America. Phylogenetic inferences of DENV-2 using the C-prM E genes showed that these samples are grouped together with isolates from “Asian-American” genotype.

Key words: *Dengue virus* 1, 2 e 3, genotype I and III, Asian-American genotype, molecular characterization, proteína E.

